

**Analyse genetischer Veränderungen in einer Familie
Piperacillin-resistenter Mutanten
von *Streptococcus pneumoniae***

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

von

Diplom-Biologe Carsten Volz

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 15.08.2008

Vorsitzende der Promotionskommission: Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Bernhard Henrich
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn
3. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Udo Bläsi

D386

Kaiserslautern, 2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Lehrbereich Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Bernhard Henrich angefertigt.

Hiermit bestätige ich, Carsten Volz, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, daß ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Kaiserslautern, den 19.06.2008

Danken möchte ich an dieser Stelle:

Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck für die Vergabe des Themas und für die Bereitschaft zur Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Henrich für die wissenschaftliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für die Bereitschaft zur Übernahme der Zweitkorrektur.

Herrn PD Dr. Reinhold Brückner für die ständige Diskussionsbereitschaft und die vielzähligen Anregungen.

Herrn Dr. Stuart McKessar für die wertvollen Diskussionen und die gute Atmosphäre in und außerhalb unseres Labors.

Frau Dr. Dalia Denapaite, Frau Márta Kovács, Frau Petra Becker, Herrn Alexander Halfmann und Herrn Dr. Patrick Maurer für die gute Arbeitsatmosphäre, Kollegialität und Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Frau Márta, bei meiner Familie und bei meinen Freunden für ihre Unterstützung bedanken.

Szeretlek csiga!

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|--------------|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| Zusammenfassung | 7 |
| Abkürzungen | 10 |
| | |
| 1. Einleitung | 11 |
| 1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 11 |
| 1.2 Determinanten der β -Lactamresistenz in <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 14 |
| 1.3 Signaltransduzierende Zweikomponentensysteme | 15 |
| 1.4 Struktur und Funktion von Teichonsäuren | 18 |
| 1.5 Autolyse, Kompetenz und Allolyse in <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 22 |
| 1.6 Piperacillin-resistente Mutanten von <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 24 |
| 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit | 26 |
| | |
| 2. Material | 27 |
| 2.1 Bakterienstämme | 27 |
| 2.2 Plasmide | 31 |
| 2.3 Oligonukleotide | 31 |
| 2.4 Nährmedien | 37 |
| 2.4.1 CpH8-Medium (C-Medium) zur Kultur von <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 37 |
| 2.4.2 D-Blutagar | 38 |
| 2.4.3 Nährmedien zur Kultur von <i>E. coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i> | 38 |
| 2.4.4 Zusätze zu den Nährmedien | 39 |
| 2.5 Allgemeine Puffer | 39 |
| 2.6 Bezugsquellen | 40 |
| 2.6.1 Chemikalien | 40 |
| 2.6.2 Enzyme | 40 |
| 2.7 Computerprogramme und Datenbanken | 40 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3. | Methoden | 41 |
| 3.1 | Mikrobiologische Methoden | 41 |
| 3.1.1 | Dokumentation des Bakterienwachstums | 41 |
| 3.1.2 | Anzuchtbedingungen | 42 |
| 3.1.3 | Stammkonservierung | 42 |
| 3.1.4 | Mikroskopie | 42 |
| 3.1.5 | Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) | 42 |
| 3.1.6 | Transformation von <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 43 |
| 3.1.7 | Kompetenz-Testung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 43 |
| 3.1.8 | Transformation von <i>E. coli</i> | 44 |
| 3.2 | Isolierung und Reinigung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) | 45 |
| 3.2.1 | Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 45 |
| 3.2.2 | Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>Bacillus subtilis</i> | 46 |
| 3.2.3 | Plasmid-Mini-Präparation aus <i>E. coli</i> | 46 |
| 3.2.4 | Plasmid-Maxi-Präparation aus <i>E. coli</i> | 47 |
| 3.2.5 | Phenolisierung von DNA | 47 |
| 3.2.6 | Ethanolpräzipitation von DNA | 47 |
| 3.2.7 | Aufreinigung von PCR-Amplifikaten | 48 |
| 3.2.8 | DNA-Konzentrationsbestimmung | 48 |
| 3.3 | Isolierung und Reinigung von Ribonukleinsäuren (RNA) | 48 |
| 3.3.1 | Präparation von Gesamt-RNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 49 |
| 3.3.2 | Aufreinigung von Gesamt-RNA | 50 |
| 3.3.3 | Überprüfung der Qualität von RNA | 50 |
| 3.3.4 | Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit von RNA | 51 |
| 3.4 | Elektrophorese von Nukleinsäuren | 51 |
| 3.5 | DNA-Elution aus Agarosegelen | 52 |
| 3.6 | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) | 52 |
| 3.7 | Reverse Transkription (RT-PCR) | 54 |
| 3.8 | Real-Time PCR | 55 |
| 3.9 | Sequenzierung von DNA | 57 |
| 3.10 | Sonstige Enzymreaktionen mit DNA | 58 |
| 3.10.1 | Restriktion | 58 |
| 3.10.2 | Dephosphorylierung | 59 |
| 3.10.3 | Phosphorylierung | 60 |
| 3.10.4 | Ligation | 60 |
| 3.11 | Inaktivierung/Deletion von Genen | 61 |
| 3.11.1 | Verwendete Resistenzkassetten | 62 |
| 3.11.2 | Inaktivierung von Genen durch Integration von Resistenzkassetten | 62 |
| 3.11.3 | Deletion von Genen durch Konstruktion von Minigenen | 63 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3.12 | Bestimmung der 5'-Enden von mRNA durch 5'-RACE (<u>R</u>apid <u>A</u>mplification of 5'-<u>c</u>DNA <u>E</u>nds) | 65 |
| 3.13 | Bestimmung von Promotor-Aktivitäten | 67 |
| 3.13.1 | Das Pneumo-Promotor-Probe-Plasmid pPP2 | 67 |
| 3.13.2 | β-Galactosidaseassay | 68 |
| 3.14 | <u>E</u>lectrophoretic <u>M</u>obility <u>S</u>hift <u>A</u>ssay (EMSA) | 69 |
| 3.15 | Detektion von Transkripten | 70 |
| 3.15.1 | Detektion mittels PCR auf cDNA | 71 |
| 3.15.2 | Detektion mittels Northern-Blot-Analyse | 71 |
| 3.16 | Mikroarray-gestützte globale Transkriptomanalyse | 73 |
| 3.16.1 | Die Oligo-Sets für <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6 | 73 |
| 3.16.2 | Herstellung der Mikroarray-Slides | 74 |
| 3.16.3 | Markierung von Gesamt-RNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 75 |
| 3.16.4 | Hybridisierung | 76 |
| 3.16.5 | Scannen und Analyse der Hybridisierungen | 77 |
| 3.17 | Genomischer Southern-Blot | 78 |
| 3.18 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) | 80 |
| 3.18.1 | Herstellung der Gele und Elektrophorese | 80 |
| 3.18.2 | Färbung der Gele | 81 |
| 3.19 | Auftrennung und Markierung von Penicillin-Bindeproteinen | 81 |
| 3.20 | Bestimmung des Proteingehalts von Lösungen | 82 |
| 3.21 | Überexpression und Aufreinigung von Proteinen | 82 |
| 3.21.1 | Das pQE30-Expressionssystem | 82 |
| 3.21.2 | Überexpression | 82 |
| 3.21.3 | Herstellung von Lysaten | 82 |
| 3.21.4 | Aufreinigung unter nativen Bedingungen | 83 |
| 4. | Ergebnisse | 84 |
| 4.1 | Phänotypische Charakterisierung der Mutanten aus Familie P006 | 84 |
| 4.1.1 | Wachstum und Zellmorphologie | 84 |
| 4.1.2 | Genetische Kompetenz | 85 |
| 4.1.3 | MHK von Piperacillin | 86 |
| 4.2 | Globale Transkriptomanalysen der Mutanten aus Familie P006 | 87 |
| 4.2.1 | Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in den Mutanten aus Familie P006 | 87 |
| 4.2.2 | Gene und Cluster mit signifikant veränderten Transkriptmengen in P106 | 93 |
| 4.2.3 | Gene und Cluster mit signifikant veränderten Transkriptmengen im Vergleich von P306, P406 und P506 | 94 |
| 4.2.4 | Das Cytolysin-Gencluster (<i>cyl</i> -Cluster) | 96 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 4.2.5 | Das <i>ytrA</i> -Cluster | 98 |
| 4.2.6 | Das <i>licI</i> -Operon | 98 |
| 4.2.7 | Das Zweikomponentensystem-11-Cluster (TCS11-Cluster) | 99 |
| 4.3 | Phänotyp einer <i>cpoA</i>-Deletionsmutante (R6Δ<i>cpoA</i>) | 101 |
| 4.3.1 | Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von <i>cpoA</i> | 102 |
| 4.3.2 | In-frame Deletion des <i>cpoA</i> -Gens in <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6 | 103 |
| 4.3.3 | Charakterisierung der Deletionsmutante R6 Δ <i>cpoA</i> | 103 |
| 4.3.3.1 | Wachstum und Zellmorphologie | 103 |
| 4.3.3.2 | Einfluß von Mg ²⁺ und pH-Wert auf das Wachstum von R6 Δ <i>cpoA</i> | 105 |
| 4.3.3.3 | Genetische Kompetenz | 107 |
| 4.3.3.4 | MHK von Piperacillin für R6 Δ <i>cpoA</i> | 108 |
| 4.3.3.5 | Die Penicillin-Bindeproteine von R6 Δ <i>cpoA</i> | 108 |
| 4.4 | Vergleich der im Verhältnis zu R6 veränderten Transkriptmengen in R6Δ<i>cpoA</i> und P106 | 110 |
| 4.5 | Beitrag des <i>cyl</i>- und <i>ytrA</i>-Clusters zur Piperacillin-Resistenz in P406 und P506 | 112 |
| 4.6 | Chromosomale Veränderungen in P406 und P506 | 113 |
| 4.7 | Beitrag des TCS11-Clusters zur Piperacillin-Resistenz in P406 | 116 |
| 4.7.1 | Deletion der Histidin-Kinase- und Response-Regulator-Gene <i>kin11</i> und <i>reg11</i> in P406 | 117 |
| 4.7.2 | Charakterisierung der Deletionsmutante P406 Δ <i>kin11reg11</i> | 117 |
| 4.8 | Vergleich der im Verhältnis zu R6 veränderten Transkriptmengen in P406Δ<i>kin11reg11</i> und P406 | 119 |
| 4.9 | Beitrag der Gene des putativen ABC-Transporters im TCS11-Cluster zur Piperacillin-Resistenz in P406 | 121 |
| 4.9.1 | Deletion des ATPase-Gens <i>nbp11</i> im TCS11-Cluster von P406 | 122 |
| 4.9.2 | Charakterisierung der <i>nbp11</i> -Mutante P406 Δ <i>nbp11::janus</i> | 123 |
| 4.10 | Charakterisierung des TCS11-Clusters von <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6 | 124 |
| 4.10.1 | Genetische Organisation des TCS11-Clusters und Homologe in Gram-positiven Bakterien | 124 |
| 4.10.2 | Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte im TCS11-Cluster | 128 |
| 4.10.3 | Aktivitäten der Promotoren P _{11.1} , P _{11.2} und P _{11.3} in P406, P406 Δ <i>kin11reg11</i> , sowie in R6 und R6 Δ <i>kin11reg11</i> | 130 |
| 4.10.4 | Bestimmung der Transkripte im TCS11-Cluster | 133 |
| 4.10.5 | Interaktion des Response-Regulator 11 (Reg11) mit den Promotoren P _{11.1} und P _{11.2} | 137 |
| 4.10.6 | Identifizierung der DNA-Bindestelle des Response-Regulators Reg11 | 139 |
| 4.10.6.1 | Sequenzanalyse der Promotorregion um P _{11.1} | 139 |
| 4.10.6.2 | Interaktion von His ₆ -Reg11 mit den Promotor-Regionen von P _{des} und P _{yyf} aus <i>B. subtilis</i> 168 | 141 |
| 4.10.6.3 | Mutagenese der putativen DNA-Bindestelle von Reg11 in Promotor P _{11.1} | 142 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 4.10.6.4 | Suche nach weiteren regulierten Promotoren | 145 |
| 4.10.7 | Übersicht über Promotoren und Transkripte des TCS11-Clusters | 146 |
| 4.10.8 | Effekte von Deletionen einzelner Gene und Bereiche des TCS11-Clusters | 148 |
| 4.10.8.1 | Herstellung der Deletionsmutanten | 148 |
| 4.10.8.2 | Charakterisierung der Deletionsmutanten des TCS11-Clusters | 153 |
| 4.10.8.2.1 | Wachstumsverhalten und Zellmorphologie | 153 |
| 4.10.8.2.2 | Induzierte Autolyse | 158 |
| 4.10.8.2.3 | Aktivitäten der Promotoren P _{11.1} und P _{11.2} | 161 |
| 4.10.8.2.4 | Quantifizierung des Transkriptes des 11-2-Operons in R6Δ <i>msp11_3</i> , R6Δ <i>inter</i> und R6Δ <i>rupA</i> | 166 |
| 4.10.9 | Globale Transkriptomanalyse von R6Δ <i>msp11_3</i> und R6Δ <i>smp11A</i> | 167 |
| 4.10.9.1 | Vergleich der Veränderungen der Transkriptome von R6Δ <i>msp11_3</i> und R6Δ <i>smp11A</i> | 168 |
| 4.10.9.2 | Vergleich der Veränderungen der Transkriptome von R6Δ <i>msp11_3</i> , R6Δ <i>smp11A</i> und R6Δ <i>cpoA</i> | 172 |
| 4.10.10 | Überexpression des TCS11-Clusters in R6 | 175 |
| 4.10.10.1 | Ersetzen von Promotor P _{11.1} in R6 und R6Δ <i>kin11reg11</i> durch die modifizierten Promotoren P _{vegW} und P _{vegM} aus <i>B. subtilis</i> | 176 |
| 4.10.10.2 | Wachstum von R6P _{vegW} , R6P _{vegM} , R6Δ <i>kin11reg11</i> P _{vegW} und R6Δ <i>kin11reg11</i> P _{vegM} | 177 |
| 4.10.10.3 | MHK für Piperacillin von R6P _{vegW} , R6P _{vegM} , R6Δ <i>kin11reg11</i> P _{vegW} und R6Δ <i>kin11reg11</i> P _{vegM} | 178 |
| 4.10.10.4 | Aktivitäten der Promotoren P _{11.1} und P _{11.2} in R6P _{vegW} , R6P _{vegM} , R6Δ <i>kin11reg11</i> P _{vegW} und R6Δ <i>kin11reg11</i> P _{vegM} | 179 |
| 4.11 | Effekte des TCS11-Clusters auf das <i>lic1</i>-Operon | 181 |
| 4.11.1 | Aktivität des Promotors P _{1spr1149} in P406 und P406Δ <i>kin11reg11</i> | 181 |
| 4.11.2 | Einfluß von Deletionen einzelner Gene und Regionen im TCS11-Cluster auf die Aktivität von P _{1spr1149} | 183 |
| 4.11.3 | Einfluß der Überexpression des TCS11-Clusters auf P _{1spr1149} | 187 |
| 5. | Diskussion | 189 |
| 5.1 | Die Glykosyltransferase CpoA | 189 |
| 5.1.1 | Beitrag zur Piperacillin-Resistenz | 189 |
| 5.1.2 | Die physiologische Funktion von CpoA | 191 |
| 5.2 | Die Beteiligung des TCS11-Clusters an der Piperacillin-Resistenz | 198 |
| 5.3 | Molekulargenetische Charakterisierung des TCS11-Clusters | 201 |
| 5.3.1 | Die Regulation des TCS11-Clusters | 201 |
| 5.3.2 | Die Funktion der 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche der mRNA des 11-2-Operons | 215 |
| 5.3.3 | Der Response-Regulator Reg11 besitzt in unphosphoryliertem Zustand ebenfalls einen regulatorischen Effekt | 218 |
| 5.4 | Hinweise zur physiologischen Funktion des TCS11-Clusters | 219 |
| 5.5 | Ausblick | 222 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 6. | Literaturverzeichnis | 224 |
| 7. | Anhang | 240 |
| 7.1 | Das Transkriptom von Mutante P106 bei einer Zelldichte von N=40 | 240 |
| 7.2 | Das Transkriptom von Mutante P206 bei einer Zelldichte von N=40 | 242 |
| 7.3 | Das Transkriptom von Mutante P306 bei einer Zelldichte von N=40 | 245 |
| 7.4 | Das Transkriptom von Mutante P206 bei einer Zelldichte von N=40 | 248 |
| 7.5 | Das Transkriptom von Mutante P206 bei einer Zelldichte von N=40 | 251 |
| 7.6 | Das Transkriptom von R6Δ<i>cpoA</i> bei einer Zelldichte von N=40 | 255 |
| 7.7 | Sequenz des Bereichs upstream des TCS11-Clusters in P406 und P506 | 258 |
| 7.8 | Das Transkriptom von P406Δ<i>kin11reg11</i> bei einer Zelldichte von N=40 | 259 |
| 7.9 | DNA-Sequenz der Promotor-Bereiche des TCS11-Clusters | 263 |
| 7.10 | DNA-Sequenz der Promotor-tragenden DNA-Fragmente P_{11.1}, P_{11.2} und P_{11.3} | 264 |
| 7.11 | Das Transkriptom von R6Δ<i>smp11A</i> bei einer Zelldichte von N=40 | 265 |
| 7.12 | Das Transkriptom von R6Δ<i>smp11_3</i> bei einer Zelldichte von N=40 | 267 |

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasste sich mit der Analyse genetischer Veränderungen in der Familie P006 von Piperacillin-resistenten Mutanten von *S. pneumoniae* R6. Jede der fünf Mutanten P106 bis P506 dieser Familie wurde aus dem jeweiligen Parentalstamm auf ansteigender Konzentration des lytischen β -Lactams Piperacillin isoliert und zeichnete sich durch eine jeweils höhere minimale Hemmkonzentration (MHK) für Piperacillin aus (Laible et al., 1987). In Mutante P106 konnte mit CpoA bereits eine Resistenzdeterminante für Piperacillin identifiziert werden, welche nicht zu den klassischen Targets der β -Lactamantibiotika, den Penicillin-Bindeproteinen (Pbp), zählt (Grebe et al., 1997). Die Mutanten P206 und P306 zeigten aufgrund von Mutationen in Pbp2b und Pbp2x eine höhere Resistenz gegen Piperacillin (Hakenbeck et al., 1994; Grebe & Hakenbeck, 1996).

In dieser Arbeit standen die Identifizierung und Charakterisierung der bisher unbekanntenen Resistenzdeterminante für Piperacillin in Mutante P406 und die Charakterisierung der bisher nur unzulänglich untersuchten Nicht-Pbp-Resistenzdeterminante CpoA in Mutante P106 im Mittelpunkt der Analysen.

Im Fall der bereits identifizierten Resistenzdeterminante in Mutante P106 handelt es sich um das für eine Glykosyltransferase kodierende Gen *cpoA*. Die Herstellung einer *cpoA*-Deletionsmutante, sowie deren Charakterisierung, sollte zur Aufklärung des zugrundeliegenden Resistenzmechanismus in P106 und der Funktion von CpoA beitragen.

Durch die Herstellung der *cpoA*-Deletionsmutante und die Bestimmung der MHK für Piperacillin konnte gezeigt werden, daß ein Ausfall der durch CpoA katalysierten Reaktion einen Anstieg der MHK für Piperacillin in *S. pneumoniae* R6 bewirkt. Die eingehende phänotypische Charakterisierung zeigte, daß die *cpoA*-Deletionsmutante zudem eine reduzierte genetische Kompetenz, eine reduzierte Säuretoleranz, einen höheren Bedarf an zweiwertigen Mg-Ionen, eine längere Generationszeit und eine verlangsamte Autolyse im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 besitzt. Diese Beobachtungen, sowie die Ergebnisse einer Microarray-basierten, globalen Transkriptomanalyse lassen es unter Berücksichtigung der biochemischen Charakterisierung von CpoA (Edman et al., 2003) als wahrscheinlich erscheinen, daß CpoA an der Synthese von α -Galactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin, einem der Hauptglycolipide der Cytoplasmamembran von *S. pneumoniae* beteiligt ist. Die Deletion von *cpoA* könnte demzufolge auch einen Effekt auf die Menge der Lipoteichonsäuren in der Zellwand von *S. pneumoniae* besitzen, da der Precursor von α -Galactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin, das α -Monoglucosyl-Diacylglycerin vermutlich den Lipidanker der Lipoteichonsäuren darstellt. Basierend auf dieser Annahme konnte ein Modell zur Funktion von CpoA erstellt werden, welches eine Erklärung des Resistenzmechanismus für Piperacillin in Mutante P106, bzw. in der *cpoA*-Deletionsmutante ermöglichen würde.

In Mutante P406 konnten weitere Veränderungen der Pbps bereits ausgeschlossen werden (Hakenbeck et al., 1994; Grebe & Hakenbeck, 1996).

Durch eine Microarray-basierte, globale Transkriptomanalyse aller fünf Mutanten der Familie P006 konnten Gene identifiziert werden, deren Transkripte im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 nur in P406 signifikant veränderte Mengen aufwiesen:

Unter diesen Genen befanden sich sechs Gene, welche aufgrund ihrer geclusterten Anordnung im Genom von *S. pneumoniae* als putative funktionelle Einheit (TCS11-Cluster) angesehen wurden. Diese Gene zeigten eine bis zu 22-fach erhöhte Transkriptmenge in Mutante P406. Zudem konnten nur in Mutante P406 von Genen des an der Teichonsäurebiosynthese beteiligten *licI*-Operons eine bis zu 7,9-fach höhere Transkriptmenge beobachtet werden.

Keines der Genprodukte des TCS11-Clusters wurde bisher charakterisiert. Aufgrund von Blast- und Domänen-Analysen konnten den Genprodukten putative Funktionen zugeschrieben werden. Die Gene *smp11A* und *smp11B* kodieren für zwei putative Membranproteine von 63 und 64 Aminosäuren. Die Gene *nbp11* und *msp11* kodieren für die ATPase- und die Permease-Komponente eines putativen ABC-Transporters. *kin11* und *reg11* kodieren für die Histidin-Kinase und den Response-Regulator des bisher uncharakterisierten Zweikomponentensystems 11 (TCS11) in *S. pneumoniae*. Die Gene sind in der Reihenfolge *smp11A*, *smp11B*, *nbp11*, *msp11*, *kin11* und *reg11* auf dem Minus-Strang im Genom von *S. pneumoniae* lokalisiert.

Die Deletion der Gene *kin11* und *reg11* des TCS11 in P406 führte zum Abfall der MHK für Piperacillin auf die MHK des Parentalstamms P306. Somit konnte die Beteiligung des TCS11 in *S. pneumoniae* an einem unbekanntem Resistenzmechanismus gegen Piperacillin nachgewiesen werden. Die Deletion von *nbp11* in P406 führte ebenfalls zum Abfall der MHK für Piperacillin, womit einerseits auch für Nbp11 eine Beteiligung an dem unbekanntem Resistenzmechanismus gegen Piperacillin gezeigt werden konnte und andererseits eine transkriptionelle Regulation der Gene *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11* durch das TCS11 vermutet werden konnte.

Durch eine konstitutive, gemeinsame Überexpression der Gene *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11* in *S. pneumoniae* R6 wurde gezeigt, daß die Überexpression dieser Gene hinreichend für eine Erhöhung der Resistenz gegen Piperacillin ist.

Durch 5'-RACE-Analysen konnten die beiden Transkriptionsstartpunkte P_{11.1} und P_{11.2} im Bereich des TCS11-Clusters kartiert werden. P_{11.1} befindet sich 20bp upstream von *smp11A* und P_{11.2} befindet sich 441bp upstream von *kin11* innerhalb von *msp11*. Eine Northern-Analyse und die Durchführung von PCR auf cDNA zeigte, daß die Gene des TCS11-Clusters in zwei überlappenden Transkriptionseinheiten transkribiert werden. Die Gene *kin11* und *reg11* sind zusammen mit einer downstream von *reg11* liegenden Kopie des repetitiven Elements *rupA* im 11-2-Operon organisiert und werden ausgehend von Promotor P_{11.2} inklusive des ungewöhnlich langen Leaders von 441bp transkribiert. *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11* sind im 11-1-Operon organisiert und werden ausgehend von Promotor P_{11.1} transkribiert. Die Zugehörigkeit von *kin11* und *reg11* zum 11-1-Operon konnte hingegen bei den verwendeten Wachstumsbedingungen nicht gezeigt werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, daß phosphoryliertes Reg11 (Reg11-P) an die Promotor-Region von P_{11.1} bindet (Marciszewski, Diplomarbeit 2007).

Die Bestimmung der Aktivität von P_{11.1} in *S. pneumoniae* R6, sowie in *kin11*-, *reg11*- und *kin11reg11*-Deletionsmutanten zeigte, daß P_{11.1} einer direkten, positiven Regulation durch das TCS11 unterliegt.

Durch Sequenzvergleiche der Promotor-Region von P_{11.1} mit den DNA-Regionen putativer Promotoren von zum TCS11-Cluster ähnlich organisierten Clustern homologer Proteine in Genomen anderer Gram-positiver Bakterien konnten drei hoch konservierte Sequenzabschnitte identifiziert werden, von welchen gezeigt werden konnte, daß sie für die Bindung von Reg11-P in *S. pneumoniae* essentiell sind. Vermutlich stellt die Konsensus-Sequenz ATGACA(2)TGTCAT(8-9)GTGACA die DNA-Bindestelle von Reg11-P dar. Es konnten keine weiteren, zu 100 % konservierten Sequenzen dieser Art im Genom von *S. pneumoniae* gefunden werden. In EMSA-Assays mit weniger konservierten Sequenzen dieser Art konnte keine Bindung von Reg11-P beobachtet werden. Somit handelt es sich bei der

Bindestelle an P_{11.1} vermutlich um die einzige Bindestelle von Reg11-P im Genom von *S. pneumoniae*.

Von P_{11.2} konnte durch die Bestimmung der Promotor-Aktivität in Deletionsmutanten einzelner Gene des TCS11-Clusters gezeigt werden, daß auch dieser Promotor einer Regulation unterliegt, welche jedoch nicht durch die Bindung von Reg11-P, oder von unphosphoryliertem Reg11 vermittelt wird. Die Aktivität von P_{11.2} ist hierbei jedoch einerseits Abhängig von der Anwesenheit von Kin11 und andererseits entweder von der Funktion der Membranproteine Smp11A und Smp11B, oder von der durch Nbp11/Msp11 transportierten unbekannt Substanz.

Die Bestimmung der Promotor-Aktivität von P_{11.2} in Deletionsmutanten einzelner Gene des TCS11-Clusters und die unterschiedlichen phänotypischen Effekte einer *kin11*-, *reg11*- und einer *kin11reg11*-Deletionsmutante zeigten, daß unphosphoryliertes Reg11 ebenfalls in der Lage sein muß, die Transkription von noch unbekannt Zielgenen durch Bindung an eine weitere, unbekannt DNA-Bindestelle zu regulieren.

Sowohl durch die Deletion eines Großteils des 441nt langen Leaders des Transkripts des 11-2-Operons, als auch durch die Deletion zweier verschiedener Abschnitte des 3'-untranslatierten Bereichs dieses Transkripts konnte gezeigt werden, daß der 5'- und der 3'-untranslatierte Bereich an noch unbekannt regulatorischen Mechanismen beteiligt sind.

Die Deletion einzelner Gene des TCS11-Clusters, sowie die gemeinsame Überexpression von Smp11A, Smp11B, Nbp11 und Msp11 bewirkten die gleichen phänotypischen Effekte wie die charakterisierte *cpoA*-Deletionsmutante. So konnte in Wachstumsexperimenten der gleiche Einfluß auf die Generationszeit, die maximale Zelldichte und die Autolyse, wie in der *cpoA*-Deletionsmutante, gezeigt werden. Die Microarray-basierte Transkriptomanalyse zweier Deletionsmutanten von Genen des TCS11-Clusters zeigte zudem, daß sich infolge dieser Deletionen größtenteils die Transkriptmengen solcher Gene ändern, welche auch auf eine Deletion von *cpoA* reagieren. Hierzu zählen neben zahlreichen Genen für Proteine unbekannter Funktion die Gene des Kompetenzregulons, des *blp*-Clusters, sowie des Cholinbindepoteins PcpA und der Subtilisin-artigen Proteinase PrtA. Die in Mutante P406 beobachteten höheren Transkriptmengen von an der Teichonsäurebiosynthese beteiligten Genen des *lic1*-Operons konnten durch die Deletion von *kin11reg11* revidiert werden. Die konstitutive gemeinsame Überexpression von Smp11A, Smp11B, Nbp11 und Msp11, sowie die Bestimmung der Aktivität des Promotors P_{1_{spr1149}} des *lic1*-Operons zeigte, daß die Transkription der Gene des *lic1*-Operons indirekt von der Menge an Smp11A, Smp11B, Nbp11 und Msp11 abhängt.

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß das TCS11-Cluster und die Glykosyltransferase CpoA an den gleichen, oder zumindest an sich beeinflussenden, Membran-assoziierten Vorgängen beteiligt sind. Folglich konnte durch die molekulargenetische Charakterisierung des in ähnlicher genetischer Organisation in Gram-positiven Bakterien weit verbreiteten TCS11-Clusters erstmals ein Hinweis auf die putative physiologische Funktion des TCS11-Clusters in *S. pneumoniae* erhalten werden.

Abkürzungen

| | | | |
|------------------------|--|-------------------------|--|
| A, C, G, T | Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin | Lys | Lysin |
| AATGal | 2-Acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-Galactosyl-Rest | M | Molarität |
| Ala | Alanin | Met | Methionin |
| <i>A. laidlawii</i> | <i>Acholeplasma laidlawii</i> | Mg | Magnesium |
| Amp | Ampicillin | MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| APS | Ammoniumpersulfat | MOPS | 3-Morpholino-1-propan-sulfonsäure |
| AS, aa | Aminosäure | mRNA | messenger-RNA |
| Asn | Asparagin | MurNAc | N-Acetylmuraminsäure |
| Asp | Aspartat | N | Normalität |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat | NaAc | Natriumacetat |
| <i>B. anthracis</i> | <i>Bacillus anthracis</i> | Nr. | Nummer |
| <i>B. subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | nt | Nukleotid |
| bp | Basenpaar | O. D. | Optische Dichte |
| BGU | β -Galactosidase-Units | ONPG | <i>o</i> -Nitrophenol- β -D-Galactopyranosid |
| cDNA | complementary DNA | ONP | <i>o</i> -Nitrophenol |
| <i>C. glutamicum</i> | <i>Corynebacterium glutamicum</i> | <i>orf</i> | offenes Leseraster |
| CSP | Competence Stimulating Peptide | PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Cy3 | Cyanin-3 | Pbp | Penicillin-Bindeprotein |
| Cy5 | Cyanin-5 | PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| Δ | Deletion | Phe | Phenylalanin |
| DAG | Diacylglycerin | Pos. | Position |
| ddNTP | Didesoxynukleosid-triphosphat | Pro | Prolin |
| DEPC | Diethylen-Pyrocabonate | RBS | Ribosomenbindestelle |
| dest. | destilliert | RNA | Ribonukleinsäure |
| <i>D. geothermalis</i> | <i>Deinococcus geothermalis</i> | rpm | Umdrehungen/Minute |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure dNTP | RT | Raumtemperatur |
| | Desoxynukleosidtriphosphat | SDS | Natriumdodecylsulfat |
| ds | doppelsträngig | Ser | Serin |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetra-essigsäure | <i>S. saprophyticus</i> | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> |
| EGTA | Ethylenglykol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat | <i>S. agalactiae</i> | <i>Streptococcus agalactiae</i> |
| ERG | Eppendorf Reaktionsgefäß | <i>S. gordonii</i> | <i>Streptococcus gordonii</i> |
| Ery | Erythromicin | <i>S. mutans</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| EtBr | Ethidiumbromid | <i>S. pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| EtOH | Ethanol | <i>S. sanguinis</i> | <i>Streptococcus sanguinis</i> |
| Gal | Galactose, Galactosyl | <i>S. suis</i> | <i>Streptococcus suis</i> |
| GalGlcDAG | Galactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin | Str | Streptomycin |
| Glc | Glucose, Glucosyl | <i>S. thermophilus</i> | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| GlcDAG | Monoglucosyl-Diacylglycerin | <i>S. coelicolor</i> | <i>Streptomyces coelicolor</i> |
| GlcGlcDAG | Diglucosyl-Diacylglycerin | ssDNA | einzelsträngige DNA |
| GlcNAc | N-Acetylglucosamin | TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin |
| Glu | Glutamat | Tet | Tetracyclin |
| Gln | Glutamin | Thr | Threonin |
| His | Histidin | Tris | Trihydroxymethyl-aminoethan |
| IPTG | Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid | tRNA | transfer-RNA |
| Ile | Isoleucin | Tyr | Tyrosin |
| Kan | Kanamycin | U | Units |
| kb | Kilobasenpaar | ÜK | Übernachtkultur |
| <i>Lb. plantarum</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> | Val | Valin |
| Leu | Leucin | Vol. | Volumen |
| LKZ | Lebendkeimzahl | v/v | Volumenprozent |
| | | w/v | Gewichtsprozent |

1. Einleitung

Diese Arbeit befasst sich mit der Identifizierung und Charakterisierung von bislang unbekanntem Mechanismen in *Streptococcus pneumoniae*, welche zu einer erhöhten Resistenz gegen das zur Gruppe der β -Lactam-Antibiotika zählende Piperacillin führen. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden bereits einige alternative Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen β -Lactame in *S. pneumoniae* beschrieben, welche unabhängig von der am häufigsten beobachteten Resistenzentstehung durch die Veränderung der Targets der β -Lactame zu sein scheinen. In keinem Fall konnte jedoch der entsprechende Mechanismus abschließend aufgeklärt werden. Allen Mechanismen gemein ist hierbei der Bezug zur Synthese oder Instandhaltung von Komponenten der Zellhülle. Da bei der Fragestellung zur vorliegenden Arbeit die Möglichkeit bestand, daß es sich bei den zu identifizierenden Mechanismen ebenfalls um solche handelt, welche in irgendeiner Form am Aufbau oder der Instandhaltung der Zellhülle beteiligt sind und diese mit den bereits beschriebenen in Zusammenhang stehen, werden im Folgenden auch die bereits bekannten Determinanten in ihrem physiologischen Zusammenhang vorgestellt (1.3 bis 1.5).

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Morphologie und systematische Einteilung

Streptococcus pneumoniae ist ein Gram-positives Milchsäurebakterium der Gattung *Streptococcus* in der Familie der *Streptococcaceae* innerhalb der Ordnung der *Lactobacilliales*. Eine weitere Einteilung innerhalb der Gattung *Streptococcus* weist *S. pneumoniae* der Untergruppe A der *Streptococcus oralis*-Gruppe in der Gruppe der oralen Streptococci zu (Hardie & Whaley, 1992 und Referenzen). Der Name *Streptococcus* setzt sich aus dem griechischen streptus (gewunden), coccus (Korn) und pneumon (Lunge) zusammen. *S. pneumoniae* besitzt einen niedrigen GC-Gehalt von 39 % und zählt somit zum Clostridien-Zweig der Gram-positiven Bakterien, welcher vom Zweig der Actinomyceten mit hohem GC-Gehalt unterschieden wird (Schleifer & Ludwig, 1995). Die Zellen besitzen eine oval-kokkoide Form mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,25 μm und liegen paarweise oder in kurzen Ketten vor. Aufgrund der geringen Größe wurde *S. pneumoniae* ursprünglich auch als *Micrococcus pneumoniae* (Klein, 1984) und aufgrund der meist paarweisen Assoziation der Zellen als *Diplococcus pneumoniae* (Fränkel, 1886a und 1886b; Weichselbaum, 1886) bezeichnet. Einzelne Kolonien von *S. pneumoniae* besitzen auf Festmedium einen Durchmesser von ca. 1 mm und zeigen aufgrund ihrer hydratisierten Polysaccharid-Kapsel eine mucoide, glatte Oberfläche (S- (smooth) Phänotyp). Unbekapselte Derivate werden hingegen als R- (rough) Phänotyp bezeichnet. Nach längerer Inkubation auf Festmedium zeigt sich im Zentrum der Kolonien eine Vertiefung, welche durch eine Autolyse der Zellen in der stationären Wachstumsphase hervorgerufen wird. Verantwortlich hierfür ist in erster Linie das im Genom von *Streptococcus pneumoniae* kodierte Autolysin LytA, eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase (1.5; Tomasz & Westphal, 1971; Höltje & Tomasz, 1975; Garcia et al., 1986).

Allen Streptococci fehlt die zur Reduktion von H_2O_2 benötigte Katalase, sowie Teile der Atmungskette. Sie sind jedoch in der Lage, in Anwesenheit von Sauerstoff zu wachsen, weswegen sie auch als aerotolerante Anaerobier bezeichnet werden. Sie besitzen folglich einen fermentativen Stoffwechsel. *S. pneumoniae* betreibt eine homofermentative Milchsäuregärung, wobei Lactat als Hauptprodukt entsteht.

Die Anforderungen an die Nährstoffe im Kulturmedium sind sehr komplex. Neben einer C-Quelle benötigen Streptococci verschiedene Vitamine, Purine, Pyrimidine, Aminosäuren und Peptide.

S. pneumoniae wird hauptsächlich durch zwei physiologische Merkmale von anderen Streptococci unterschieden: Einerseits durch die Lyse der Zellen in Gegenwart von Gallensalzen (Neufeld et al., 1928) oder anderen Detergenzien wie z.B. Triton-X-100 und andererseits durch die Sensitivität gegenüber Optochin (Bowers & Jeffries, 1955). Die Lyse in Gegenwart von Gallensalzen oder Detergenzien beruht hierbei auf der Induktion der durch LytA-vermittelten Autolyse (1.5). Die Sensitivität gegenüber Optochin beruht auf einer spezifischen Interaktion mit der F₀-ATPase.

Ein weiteres, jedoch weniger spezifisches Unterscheidungsmerkmal zu anderen Streptococci ist die Art der Hämolyse auf Blutagarplatten (Brown, 1919). *S. pneumoniae* betreibt in Anwesenheit von Sauerstoff eine α -Hämolyse, welche sich als grünliche Zone um die Kolonien zeigt. Die Erythrozyten bleiben hierbei jedoch intakt. Es kommt lediglich zu einer durch H₂O₂ verursachten Umwandlung von Hämoglobin zu Methämoglobin oder zu Biliverdin-ähnlichen Verbindungen. Andere Streptococci besitzen die Fähigkeit einer echten Hämolyse, welche als β -Hämolyse bezeichnet wird und anhand von gelben Lysehöfen um die Kolonien auf Blutagarplatten erkennbar ist. Streptococci, welche keine Hämolyse zeigen, werden als γ -hämolytisch bezeichnet. Unter anaeroben Bedingungen hingegen kann *S. pneumoniae* mit Hilfe des sauerstoffempfindlichen Hämolysins ebenfalls eine β -Hämolyse betreiben (Clark, 1986).

Neben den beschriebenen Unterscheidungsmerkmalen stellt die Einteilung von *Streptococcus pneumoniae* in verschiedene Serotypen, den sogenannten Lancefield-Gruppen, eine wichtige Art der immunologischen Klassifizierung dar (Lancefield, 1933). Die Einteilung erfolgt hierbei nach der Zusammensetzung der maßgeblich zur Pathogenität beitragenden Kapselpolysaccharide.

Geschichtliches

S. pneumoniae wurde erstmals 1881 vom amerikanischen Militärarzt George Miller Sternberg, bzw. von Louis Pasteur fast zeitgleich unter der Bezeichnung *Streptococcus (Micrococcus, Diplococcus) lanceolatus (pneumoniae)* beschrieben (Pasteur et al., 1881; Sternberg 1882). 1886 konnten Fränkel und Weichselbaum zeigen, daß dieses Bakterium in den meisten untersuchten Fällen die Ursache für eine Pneumonie darstellte (Fränkel, 1886a und b; Weichselbaum 1886). In den folgenden Jahren wurde *S. pneumoniae* als Ursache einer Vielzahl von Erkrankungen identifiziert. Hierzu gehören die bereits erwähnte Pneumonie, Mittelohr-, Nasennebenhöhlen-, sowie eine Form der Hirnhautentzündung. Die zahlreichen Untersuchungen zur Natur von *S. pneumoniae* in Zusammenhang mit den durch *S. pneumoniae* hervorgerufenen Krankheitsbildern führten letztendlich dazu, daß Griffith (1928) die Transformierbarkeit von Bakterien anhand der natürlich auftretenden Kompetenz von *S. pneumoniae* (1.5) nachweisen konnte und daß Avery et al. (1944) die DNA als Träger der genetischen Information identifizieren konnten. Durch Zugabe von aus dem bekapselten, pathogenen Stamm D39 (S-Phänotyp) gewonnener chromosomaler DNA zu einem unbekapselten, apathogenen D39-Derivat (R36A, R- (rough) Phänotyp) konnten Avery et al. wiederum bekapselte, pathogene Mutanten des S-Phänotyps erzeugen. Aus dem von Avery et al. (1944) verwendeten, Polysaccharidkapsel-freien und apathogenen Stamm *S. pneumoniae* R36A wurde der ebenfalls Kapsel-freie Stamm R6 aufgrund seiner hohen Transformierbarkeit isoliert (Hotchkiss, 1951; Ottolenghi & Hotchkiss, 1961). Seither wird der apathogene Stamm R6 weltweit standardmäßig als Laborstamm zu wissenschaftlichen Untersuchungen eingesetzt. Im Jahre 2001 wurde die Genomsequenz von Stamm R6 von Hoskins et al. veröffentlicht. 2007 erfolgte die Veröffentlichung der Genomsequenz des von Avery verwendeten bekapselten Stammes D39 (Lanie et al., 2007).

Pathogenität

Schon kurz nach der Geburt kommt ein Großteil der Bevölkerung durch die Besiedlung der Schleimhäute von Hals, Nasen und Rachen mit *S. pneumoniae* in Berührung. Die Besiedlung dieser Bereiche bleibt für 20 % bis 40 % der Betroffenen jedoch ohne weitere Folgen (Gosink & Tuomanen, 2000). Infektionen werden überwiegend durch diese bereits vorhandene Population ausgelöst, wobei vorangehende Infektionen durch andere Erreger, sowie Grunderkrankungen des Herz-Kreislaufsystems und der Lungen eine Pneumokokken-Infektion begünstigen. Zur Pathogenität von *S. pneumoniae* trägt vor allem die Polysaccharidkapsel bei, welche die Phagozytose der Bakterien durch Makrophagen erschwert (Muscher et al., 2000). Unbekapselte Stämme von *S. pneumoniae* zeigen mindestens eine um den Faktor 10^5 erniedrigte Virulenz (Avery & Dubos, 1931; Watson & Musher, 1990). Weitere Faktoren, welche zur Virulenz beitragen, sind die Cholinbindeproteine (1.4) CbpA (Oberflächenadhäsion) und PspA (Inhibitor des Komplementsystems), die Neuraminidasen NanA und NanB, das β -Hämolyysin Pneumolysin Ply, die IgA1-Protease Iga, sowie die Hyaluronidase HysA (Mitchell et al., 1997).

β -Lactam-Suszeptibilität

Aufgrund der Zusammensetzung der Zellwand besitzt *S. pneumoniae* als Gram-positives Bakterium eine natürliche hohe Suszeptibilität gegen β -Lactam-Antibiotika. Die Zellwand besteht zu etwa gleichen Teilen aus Peptidoglycan (Murein) und Teichonsäuren (Mosser & Tomasz, 1970). Die Struktur und Funktion von Teichonsäuren werden in Abschnitt 1.4 beschrieben. Das Murein besteht aus alternierend β -1,4-glykosidisch verbundenen N-Acetylglucosamin- (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure-Einheiten (MurNAc), wobei die einzelnen Peptidoglycan-Stränge über eine kovalent an den Lactyl-Gruppen der MurNAc-Einheiten gebundene Peptidbrücke, welche aus ursprünglich zwei Pentapeptid-Ketten (L-Ala, D-Glu; L-Lys, D-Ala, D-Ala) entsteht, miteinander quervernetzt sind (Vollmer, 2007 und Referenzen). Die Transglycosylierung von GlcNAc und MurNAc und die Quervernetzung werden durch mehrere sogenannte Penicillin-Bindeproteine (Pbps) katalysiert. *S. pneumoniae* besitzt sechs dieser Pbps (Pbps 1a, 1b, 2a, 2b, 2x und 3) welche an verschiedenen Orten der Zellwand und zu verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums und der Zellteilung aktiv sind (Vollmer, 2007 und Referenzen).

β -Lactame inhibieren als Strukturanaloga zum natürlichen Substrat der Pbps (dem D-Ala-D-Ala-Rest der Pentapeptid-Ketten) die bei der Quervernetzung ablaufende Transpeptidase-Reaktion (Strominger et al., 1967). Hierbei kommt es zur Ausbildung eines Penicilloyl-Enzym-Komplexes, was zur Inaktivierung des Pbp-Enzyms führt (Franklin & Snow, 1989; Ghuysen 1991). Die Inhibition der Quervernetzung führt letztendlich über einen noch nicht verstandenen Mechanismus, an welchem auch eine unkontrollierte Freisetzung oder Aktivierung des Murein-abbauenden Autolysins LytA beteiligt ist (1.4; 1.5; Tomasz et al., 1970; Moreillon et al., 1990), zum Zelltod.

Der erste Vertreter der β -Lactame, das Penicillin wurde 1928 von Fleming entdeckt (Fleming, 1929). 1938 wurden erste klinische Studien zur Wirkung des Penicillins von Florey und Chain durchgeführt (Florey & Chain, 1938), die breite Anwendung als Antibiotikum erfolgte jedoch erst im Zuge des Zweiten Weltkrieges. Die ersten Penicillin-resistenten Laborstämme von *S. pneumoniae* wurden 1965 in Boston isoliert (Kislak et al., 1965). Die ersten resistenten Isolate aus Patienten wurden in den 1970er Jahren unter anderem in Australien und Neu-Guinea isoliert (Klugman, 1990) und verbreiteten sich weltweit. Die Ursache der Resistenz gegen Penicillin lag in Mutationen der Targets des Antibiotikums, den Pbps, begründet (1.2).

1.2 Determinanten der β -Lactamresistenz in *Streptococcus pneumoniae*

Penicillin-Bindeproteine (Pbps)

Von dem Gram-positiven *S. pneumoniae* wurde bis heute kein Fall veröffentlicht, in dem eine wie vor allem in Vertretern der Gram-negativen Humanpathogenen bekannte β -Lactamase zur Resistenz gegen β -Lactame führt. Aufgrund des Aufbaus der Zellhülle existiert auch keine Permeabilitätsbarriere in Form einer Äußeren Membran. Resistente klinische Isolate von *S. pneumoniae* zeichnen sich durch Veränderungen der Targets der β -Lactame, den Pbps aus (Denapaité et al., 2007 und Referenzen). Solche veränderten Pbps besitzen eine geringe Affinität zum entsprechenden β -Lactam und bedingen hierdurch die Resistenz.

Allele niederaffiner Pbp2x und Pbp2b konnten als Resistenzdeterminanten vieler β -Lactame beschrieben werden (Grebe & Hakenbeck, 1996). Ebenso konnten niederaffine Varianten von Pbp1a, -1b und -2a teils in klinischen Isolaten und teils durch Transformation isoliert bzw. hergestellt werden (Denapaité et al., 2007 und Referenzen). Hierbei zeichnen sich die Pbps klinischer Isolate meist durch eine Mosaikstruktur des veränderten *pbp*-Gens aus. Der durch Transfer und Rekombination veränderte Bereich im Gen (Mosaikblock) unterscheidet sich in bis zu 20 % im Vergleich zum Wildtyp-Allel. In künstlich hergestellten, spontan-resistenten Mutanten hingegen entsteht eine β -Lactam-Resistenz durch die Selektion von Punktmutationen, welche ebenfalls zu niedrigaffinen Varianten der Pbps führen (Denapaité et al., 2007 und Referenzen; 1.6).

Defekte der Autolyse

Tomasz et al. (1970) zeigten, daß *S. pneumoniae*-Zellen mit einem Defekt in der für die Autolyse verantwortlichen Amidase LytA (1.4; 1.5) und bei Hemmung der Amidase-Aktivität, unter Einwirkung von Penicillin zwar das Wachstum einstellen, jedoch nicht lysieren. Dies stellte einen von Pbps unabhängigen und als Toleranz bezeichneten Mechanismus gegen dieses β -Lactam dar. Moreillon et al. (1990) beobachteten, daß von solchen *lytA*⁻-Zellen nach entsprechender Inkubationsdauer mit Penicillin tatsächlich nur 10 mal mehr Zellen überleben als vom Wildtyp (*lytA*⁺). Die Anzahl der lebensfähigen Zellen nimmt also wie beim Wildtyp unter Piperacillin-Zugabe ab, wobei die Absterberate jedoch verlangsamt ist. Zudem zeigten sie, daß an dem durch Penicillin verursachten Zelltod noch ein weiterer, von Pbps unabhängiger Mechanismus beteiligt sein muß, welchen sie als Cid-Phänotyp bezeichneten. Stämme mit dieser unbekanntem Mutation zeigten sowohl in einem *lytA*⁻- als auch in einem *lytA*⁺-Hintergrund eine um den Faktor 1000 erhöhte Lebendkeimzahl unter Penicillin-Einwirkung im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. Die genetische Ursache dieses Phänotyps ist jedoch bis heute ungeklärt. Jedoch scheinen Faktoren, welche die Aktivität der für die Autolyse verantwortliche Amidase LytA beeinflussen, an solchen Resistenz- bzw. Toleranzmechanismen beteiligt zu sein. Solche Faktoren können Cholinmangelbedingungen, Cholinüberschuß oder ein zu hoher Anteil von mit Phosphorylcholin substituierten Lipoteichonsäuren in der Zellwand darstellen (Höltje & Tomasz, 1975; Briese & Hakenbeck, 1983; Briese & Hakenbeck, 1985; Giudicelli & Tomasz, 1984; 1.4).

Die Glycosyltransferase CpoA

In zwei isolierten Piperacillin-resistenten Labormutanten von *S. pneumoniae* konnten verschiedene Mutationen in oder vor dem für eine Glycosyltransferase kodierenden Gen *cpoA* identifiziert werden, welche zur Resistenzerhöhung gegen Piperacillin führten (Grebe et al., 1997; 1.6). Die Resistenzerhöhung wurde begleitet von einer Abnahme der natürlichen genetischen Kompetenz (1.5) und der Abnahme der Menge des Penicillin-Bindeproteins Pbp1a (oder PonA), was auch in der Namensgebung von CpoA zum Ausdruck kam (regulator

of competence and PonA). CpoA wurde biochemisch als α -Galactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin-Synthase (EC2.4.1.208) charakterisiert, welche in der Lage ist, einen Galactosylrest von UDP-Galactose auf Monoglucosyldiacylglycerin (GlcDAG) zu transferieren (Berg et al., 2001; Edman et al., 2003). GlcDAG und Galactosyl-Glucosyldiacylglycerin (GalGlcDAG) sind die beiden Hauptglycolipide der Zellmembran in *S. pneumoniae* (Kaufman et al., 1965; Brundish et al., 1965). GlcDAG stellt nach dem bisher gültigen Modell zur Struktur von Lipoteichonsäuren zudem die monoglycosylierte Form des Lipidankers von Lipoteichonsäuren in *S. pneumoniae* dar und GalGlcDAG könnte ein weiteres Zwischenprodukt bei der Synthese des aus Glucosyl-AATGal-Glucosyldiacylglycerin bestehenden Lipidanker von Lipoteichonsäuren darstellen (AATGal=2-Acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-Galactosyl-Rest; 1.4, Abbildung 1.2 und 1.4). CpoA ist somit vermutlich an der Synthese des Lipidankers der Lipoteichonsäuren beteiligt. Eventuell führen die beschriebenen Mutationen in *cpoA* zu einer Störung der Synthese und somit zu veränderten Lipoteichonsäuren. Dies könnte auf einen zur erhöhten Resistenz führenden Mechanismus, ähnlich der bei dem Phänomen der β -Lactam-Toleranz beobachteten Defekt der Autolyse (siehe unten), hinweisen.

Das Zweikomponentensystem CiaRH

In *S. pneumoniae* konnte mit dem signaltransduzierenden Zweikomponentensystem (1.3) CiaRH erstmals eine Resistenzdeterminante identifiziert werden, welche nicht durch eine Veränderung eines Pbps zu einer höheren Resistenz gegen das β -Lactam Cefotaxim führt (Guenzi et al., 1994). Das CiaRH-System scheint unter Bedingungen des Zellwandstress notwendig zu sein. Die beschriebenen Mutationen im *ciaH*-Gen (Zähler et al., 2002) führten zu einer Aktivierung des Zweikomponentensystems und dadurch zu einer erhöhten Resistenz gegen das β -Lactam Cefotaxim, zur reduzierten genetischen Kompetenz, sowie zu einer Lyse-Resistenz unter verschiedenen Bedingungen (Mascher et al., 2006a), welche im Wildtyp zur Induktion der Autolyse führen (1.5). Dahingegen führt eine Deletion des *ciaR*-Gens zu einer erhöhten Lyseempfindlichkeit und zu einer hohen Sensitivität gegen Inhibitoren der Zellwandbiosynthese. CiaH-Mutationen konnten jedoch bisher in keinem klinischen Isolat identifiziert werden. Zudem sind *ciaRH*-Mutanten im Maus-Modell zur Pathogenität attenuiert, was in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte (Throup et al., 2000; Paterson et al., 2006). Welche Funktionen der durch das CiaRH-System regulierten Gene (Sebert et al., 2002; Mascher et al., 2003; Dagkessamanskaia et al., 2004) letztendlich für die Resistenzerhöhung verantwortlich sind, wurde bisher nicht geklärt.

Interessanterweise reguliert das CiaRH-System die Transkription verschiedener, an der Synthese von Teichonsäuren, welche neben dem Peptidoglycan den zweiten Hauptbestandteil der Zellwand darstellen, beteiligten Gene (*licI*-Operon, Halfmann et al., 2007b; 1.4) und besitzt den bereits genannten Effekt auf die Autolyse. Zur Autolyse selbst werden wiederum strukturell intakte Teichonsäuren benötigt (1.4; 1.5). Zudem spielt die Autolyse eine Rolle bei dem Phänomen der β -Lactam-Toleranz (siehe unter: Defekte der Autolyse).

1.3 Signaltransduzierende Zweikomponentensysteme

Zweikomponentensysteme (two component system, TCS) wie das bei der Resistenz gegen Cefotaxim beteiligte CiaRH System aus *S. pneumoniae* (1.2) verleihen Zellen eine Möglichkeit, auf spezielle, sich ändernde Umweltbedingungen zu reagieren und die notwendigen Anpassungen vorzunehmen. TC-Systeme konnten bisher sowohl in Prokaryonten, als auch in niederen Eukaryonten wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben werden. Von einer Vielzahl von zellulären Prozessen sind bis heute Beispiele bekannt, in denen Zweikomponentensysteme eine regulatorische Funktion wahrnehmen.

Hierbei werden solch unterschiedliche Funktionen wie Detoxifikation, Osmoregulation, Aufnahme und Verwertung verschiedener Substanzen, Photosynthese, Sporulation, Chemotaxis, Bildung von antimikrobiell wirksamen Substanzen, Virulenzgene und auch genetische Kompetenz reguliert (Grebe & Stock, 1999; Mascher et al. 2006c und Referenzen). Die Anpassung der Zelle infolge sich verändernder Umweltbedingungen erfolgt meist durch eine transkriptionelle Regulation der durch das TCS beeinflussten Gene.

Da TC-Systeme in Prokaryonten weit verbreitet sind und bisher nicht in Menschen gefunden wurden, sind sie als potentielle Targets neuer antibakterieller Substanzen von Interesse. Insbesondere die Identifizierung von TC-Systemen, welche an der Regulation von Resistenz- bzw. Detoxifizierungsmechanismen beteiligt sind (1.2), lassen TC-Systeme als potentielle Targets attraktiv erscheinen (Bernard et al., 2007; Boyle-Vavra et al., 2006; Novak et al., 1999; Guenzi et al., 1994). In *S. pneumoniae* wurden 13 Zweikomponentensysteme identifiziert (Lange et al., 1999; Throup et al., 2000).

Allgemeiner Aufbau und Funktion

TC-Systeme bestehen im Allgemeinen aus einer den Stimulus perzipierenden Histidin-Kinase (HK) und aus einem zugehörigen, die entsprechende Antwort vermittelnden Response-Regulator (RR). Je nach Art des durch die HK perzipierten Stimulus, liegen hier verschiedene Formen von HKs vor (Abbildung 1.1; Mascher et al., 2006c). Die größte Gruppe der bisher bekannten HKs bildet die Gruppe der extrazellulär- bzw. periplasmatisch perzipierenden HKs (grün in Abbildung 1.1). Die HKs sind hierbei in der Cytoplasmamembran lokalisiert und der von den HKs perzipierte Stimulus fällt im extracytoplasmatischen Raum bzw. im Periplasma an. Eine weitere Gruppe von HKs bilden die cytosolischen HKs, welche nicht Membran-assoziiert vorliegen und ihren Stimulus im Cytoplasma perzipieren (blau in Abbildung 1.1). Die dritte Gruppe von HKs stellen die intramembran-perzipierenden HKs dar (orange in Abbildung 1.1). Innerhalb der Gram-positiven Bakterien zählen die meisten bekannten HKs zu dieser Gruppe. Auch sie liegen, wie die extrazellulär-perzipierenden HKs, membranassoziiert vor, wobei der perzipierte Stimulus jedoch entweder direkt innerhalb der Cytoplasmamembran oder mit der Membran assoziiert aufkommt.

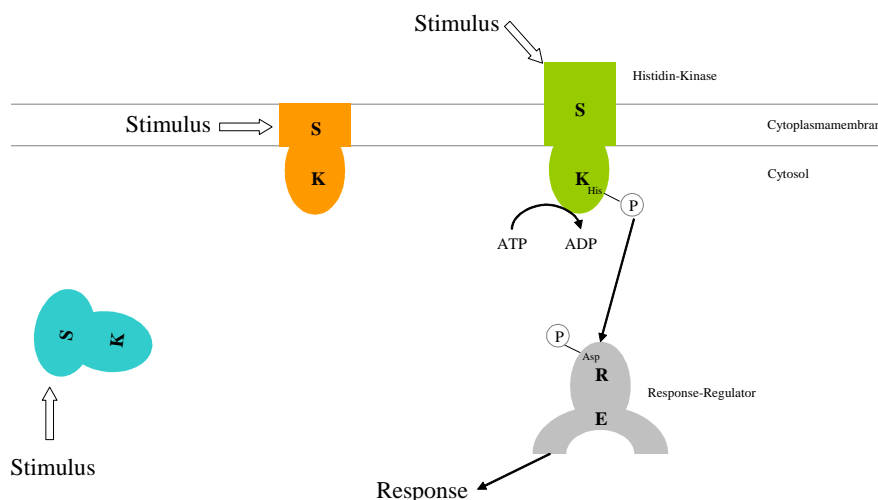


Abbildung 1.1: Genereller Aufbau und Funktion eines Zweikomponentensystems. Dargestellt wurden drei verschiedene Arten von Histidin-Kinasen (HK; blau, orange, grün), sowie der Response-Regulator (RR; grau). Histidin-Kinasen: Cytosolische HK (blau), intramembran-perzipierende HK (orange), extrazellulär perzipierende HK (grün). Die Funktion eines Zweikomponentensystems wurde anhand einer HK/RR-Kombination dargestellt. S: Sensor-domäne; K: Kinase-domäne; R: Receiver-domäne; E: Effektor-domäne. P: Phosphatrest. His: Konservierter Histidin-Rest. Asp: Konservierter Aspartat-Rest. In Anwesenheit des Stimulus findet eine Autophosphorylierung des Histidins in der Kinase-domäne der HK statt. ATP dient hierbei als P-Donor. Das P wird danach an ein Aspartat der Receiver-domäne des RR übertragen und führt so zur Auslösung der Antwort (Response, meist in Form einer Regulation der Transkription von Genen).

Response-Regulatoren sind dagegen immer im Cytosol lokalisiert und leiten das durch die zugehörige HK ausgelöste Signal entweder durch eine spezifische enzymatische Aktivität, durch Protein-Protein-Interaktionen oder durch die Aktivierung oder Repression der Transkription von Genen weiter. Die Weiterleitung des durch die Stimulus-Perzeption der HK ausgelösten Signals und dessen Abschaltung erfolgt im einfachsten Fall durch drei Phosphotransferreaktionen:

- Autophosphorylierung der HK an einem konservierten Histidin unter ATP-Hydrolyse
- Phosphotransfer von der HK auf ein konserviertes Aspartat des RR
- Dephosphorylierung des RR

Die Autophosphorylierung der HK erfordert hierbei eine Dimerisierung zweier HK-Proteine (Homodimer), wobei ein Monomer die Phosphorylierung des anderen Monomers in einer *trans*-Reaktion katalysiert.

Von dem dargestellten Zweikomponenten-Schema existieren jedoch auch verschiedene Variationen (Laub & Goulian, 2007 und Referenzen). So kann eine HK mehrere verschiedene RRs phosphorylieren oder auch mehrere HKs denselben RR phosphorylieren. Noch erheblich komplexere Varianten dieser Schemata beinhalten mehrere Phosphatübertragungen und werden als Phosphorelay-Systeme bezeichnet.

Histidin-Kinasen

Zur Zeit sind mehr als 4500 Sequenzen von Histidin-Kinasen bekannt (www.smart.embl-heidelberg.de). Eine HK lässt sich vereinfacht bestehend aus einer meist N-terminalen Sensordomäne (S) und einer meist C-terminalen Kinasedomäne (K) darstellen (Abbildung 1.1). Die Sensordomäne ist für die Signal-Perzeption und die Kinasedomäne für die Übertragung des Stimulus in Form einer Phosphorylierung des RR verantwortlich. In der Kinasedomäne befindet sich auch der bei der Autophosphorylierung benötigte konservierte Histidin-Rest. Diese Beschreibung spiegelt jedoch keinesfalls die strukturelle Vielfalt der Kinasedomäne der HKs wieder. Grebe und Stock (1999) erstellten eine detaillierte Einteilung der bis zu dieser Zeit bekannten HKs. HKs beinhalten in ihrer Kinasedomäne sechs konservierte Regionen, welche als H-, X-, N-, D-, F- und G-Boxen bezeichnet werden und zur gängigen Klassifizierung in 11 Unterfamilien (HPK₁ bis HPK₁₁) herangezogen werden. Die H-Box enthält hierbei den konservierten Histidin-Rest und ist Teil der Dimerisierungsdomäne. X-, N-, D-, F- und G-Boxen sind Bestandteil der ATP-Bindedomäne.

Eine Einteilung der HKs anhand der Struktur des N-terminalen Sensordomäne und der zellulären Lokalisation der HKs wurde von Mascher et al. (2006c) vorgestellt und entspricht der in Abbildung 1.1 dargestellten Dreiteilung in cytosolische-, intramembran-perzipierende- und extrazellulär-perzipierende HKs. Die Abgrenzung der extrazellulär- und der intramembran-perzipierenden HKs erfolgt hierbei anhand der Anzahl von Transmembrandomänen der N-terminalen Sensordomäne und der Länge, sowie der Aminosäurezusammensetzung der Linkerregionen zwischen den Transmembrandomänen. Extrazellulär-perzipierende HKs besitzen meist nur zwei, durch einen mehr oder weniger langen extrazellulären Loop verbundene Transmembrandomänen, wohingegen intramembran-perzipierende HKs meist mehr als zwei Transmembrandomänen mit kurzen Linkerregionen aufweisen.

Response-Regulatoren

RRs stellen den finalen Effektor des Signaltransduktionsweges dar, welche die Antwort auf den durch die HK perzipierten Stimulus hervorrufen. Meist bestehen RRs aus einer N-terminalen Receiverdomäne (R) und einer C-terminalen Effektordomäne (E, vgl. Abbildung

1.1). Die konservierte Receiverdomäne (Stock et al., 1989; Volz & Matsumura, 1991) beherbergt den durch die HK phosphorylierten Aspartat-Rest. Durch die Effektor-domäne wird die entsprechende Antwort (Response) auf den Stimulus der HK ausgeführt. Meist besteht die Effektor-domäne aus einer DNA-Bindedomäne, wodurch der Regulator als Transkriptionsfaktor die Transkription von Genen reguliert. In *S. pneumoniae* zeigen die 14 identifizierten Response-Regulatoren Homologie zu verschiedenen Gruppen von Transkriptionsfaktoren (OmpR/PhoB-, AraC/XylS-, LuxR/FixJ- und ComE/AgrA-Gruppe; Lange et al., 1999).

Die Phosphorylierung durch die zugehörige HK führt meist zur Aktivierung, d.h. zur Dimerisierung oder Oligomerisierung des RR und zur Bindung an eine entsprechende DNA-Bindestelle wie im Fall von OmpR (Aiba et al., 1989). Eine Phosphorylierung kann jedoch auch eine Inaktivierung und damit die Dissoziation des Di- bzw. Oligomers bedeuten (Parkinson, 1993; Stock et al., 1995).

Regulation

Der Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivität von HK und RR können durch mehrere Mechanismen reguliert werden:

Der bedeutendste Mechanismus stellt hierbei die bereits erwähnte Perzeption des Stimulus durch die HK dar. Infolge dieses Stimulus kommt es zur Autophosphorylierung und Übertragung des Phosphat-Restes auf den RR. Jedoch kann durch den Stimulus auch eine Phosphatase-Aktivität der HK aktiviert werden, worauf es zur Dephosphorylierung des RR kommt (Atkinson et al., 1994; Perego & Hoch, 1996). Zudem kann die Phosphataseaktivität der HK durch akzessorische Proteine beeinflusst werden (Kamberov et al., 1994).

Die Abschaltung der Kinase- bzw. Phosphataseaktivität der HK erfolgt entweder durch ein Umschalten der HK von Kinase- auf Phosphataseaktivität (bzw. von Phosphatase- auf Kinase-Aktivität) oder durch eine intrinsische Autophosphataseaktivität des RR (Parkinson, 1993; Stock et al., 1995). Zudem kann ein RR auch durch weitere Phosphatasen dephosphoryliert werden (Jung & Altendorf, 1998; Perego, 1998; Perego et al., 1994).

Ein rückläufiger Transfer des Phosphat-Restes, katalysiert vom RR auf die HK wurde ebenfalls beschrieben (Dutta & Inouye, 1996).

1.4 Struktur und Funktion von Teichonsäuren

Das als Resistenzdeterminante für Cefotaxim beschriebene Zweikomponentensystem CiaRH reguliert unter anderen die Transkription einiger an der Teichonsäurebiosynthese beteiligter Gene. Teichonsäuren (TA) sind in der Zellwand Gram-positiver Bakterien weit verbreitet (Fischer, 1994). In *S. pneumoniae* besteht die Zellwand zu gleichen Teilen aus Peptidoglycan und Teichonsäuren (Mosser & Tomasz, 1970). Häufig bestehen TA aus Polyglycerinphosphat- oder Polyribitolphosphatketten unterschiedlicher Länge, welche mit D-Alanin- und/oder verschiedenen Glycosylresten substituiert sind (Neuhaus & Baddiley, 2003). TA spielen bei einer Vielzahl von mit der Zellwand assoziierten Prozessen eine wichtige Rolle:

- Bindung von Kationen und Oberflächenproteinen (Hughes et al., 1973; Lambert et al., 1975; Briese & Hakenbeck, 1985)
- Autolyse (Wecke et al., 1997)
- Säuretoleranz (Boyd et al., 2000; Neuhaus & Baddiley, 2003)
- Virulenz (Abachin et al., 2002; Collins et al., 2002)
- Adhäsion (Weidenmaier et al., 2004)
- Biofilmformation (Gross et al., 2001)

- Stimulation der Immunantwort (Morath et al., 2001)
- Resistenz gegen antimikrobielle Peptide (Kovács et al., 2006)
- Proteinsekretion (Nouaille et al., 2004)

TA können kovalent gebunden an das Peptidoglycan vorkommen (Wandteichonsäuren, WTA) oder aber sie sind über einen Lipidanker in der Cytoplasmamembran verankert (Lipoteichonsäuren, LTA). WTA und LTA können sich zudem in ihrem Aufbau unterscheiden. So besitzt beispielsweise *Staphylococcus aureus* WTA, bestehend aus Polyribitolphosphatketten und LTA, bestehend aus Polyglycerinphosphatketten.

Die TA-Fraktion der Zellwand von *S. pneumoniae* besteht zu 90 % aus WTA und zu 10 % aus LTA (Vollmer et al., 2007; Mosser & Tomasz, 1970) und werden auch als C-Polysaccharid (Tillet et al., 1930) und F-Antigen (Forssmann-Antigen; Goebel and Adams, 1943) bezeichnet. TA von *S. pneumoniae* unterscheiden sich jedoch in mehreren Punkten von den TA anderer Gram-positiver Bakterien.

Wandteichonsäuren (WTA) und Lipoteichonsäuren (LTA)

WTA und LTA von *S. pneumoniae* besitzen im Gegensatz zu anderen Gram-positiven Bakterien eine identische Zusammensetzung und sind mit dem Aminoalkohol Cholin über Phosphodiesterbrücken substituiert (Fischer et al., 1993; Klein et al., 1994). Die chemische Struktur der sich wiederholenden Einheiten der TA ist zudem erheblich komplexer als im Fall des Polyglycerinphosphats oder des Polyribitolphosphats in anderen Gram-positiven Bakterien (Abbildung 1.2).

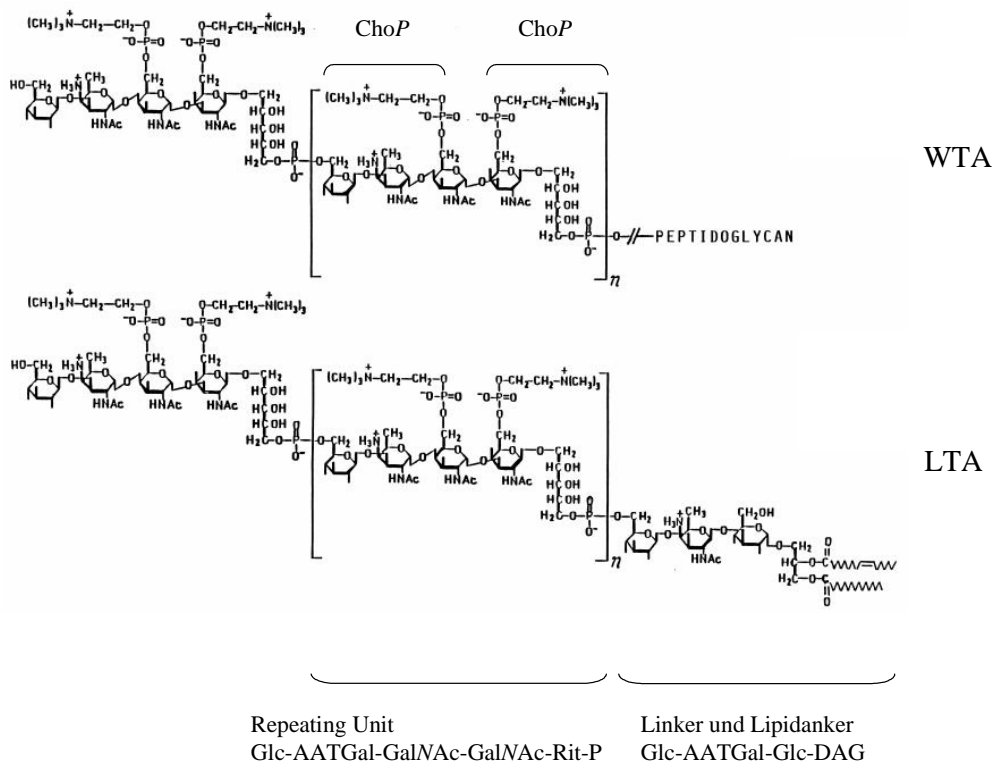


Abbildung 1.2: Struktur der Repeating Units von WTA und LTA, sowie der Linkerregion und des Lipidankers von LTA aus *S. pneumoniae*. Dargestellt wurden die Struktur von je zwei aufeinander folgenden Repeating Units von WTA und LTA. Eine Repeating Unit wurde zur Veranschaulichung in eckigen Klammern dargestellt. Jede Repeating Unit kann mit bis zu zwei ChoP verknüpft sein. WTA sind kovalent an das Peptidoglycan gebunden. LTA sind über einen Linker (Trisaccharid Glc-AATGal-Glc) mit dem Lipidanker verbunden. Glc: Glucosyl-Rest; AATGal: 2-Acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-Galactosyl-Rest; GalNAc: N-Acetylgalactosaminyl-Rest; Rit-P: Ribitolphosphat; DAG: Diacylglycerin (Lipidanker); ChoP: Cholinphosphat-Rest. Aus: Yother et al., 1998, modifiziert.

WTA und LTA in *S. pneumoniae* bestehen aus sich wiederholenden Tetrasaccharid-Ribitolphosphat-Einheiten, bestehend aus Glc-AATGal-GalNAc-GalNAc-RitP. Diese Repeating Units können mit bis zu zwei Phosphocholin-Resten (ChoP) an den beiden GalNAc-Resten substituiert sein, welche für die nicht-kovalente Bindung der Cholinbindende Proteine an TA benötigt werden. Die Anzahl der Repeating Units variiert zwischen 2 und 8 (Fischer, 1997). Zudem wurden Substitutionen am Ribitol-Rest mit D-Alanin und GalNAc beschrieben (Draing et al., 2006; nicht gezeigt in Abbildung 1.2). LTA sind nach diesem allgemein akzeptierten Modell über einen Glucosyl-AATGalactosyl-Glucosyl-Linker mit einem Lipidanker verbunden.

Teichonsäurebiosynthese

Die für die an der Biosynthese von TA beteiligten Proteine kodierenden Gene im Genom von *S. pneumoniae* wurden bisher nur teilweise identifiziert. Gene, welche für die Biosynthese des Lipidankers und des Linkers von LTA, die Verknüpfung von WTA an das Peptidoglycan und die Synthese des Tetrasaccharid-Ribitolphosphat-Restes der Repeating Units benötigt werden, sind bislang nicht identifiziert. Einen Hinweis auf ein eventuell an der Biosynthese des Lipidankers von LTA beteiligtes Gencluster lieferte jedoch die biochemische Charakterisierung der an der Resistenzhöhung von *S. pneumoniae* gegen Piperacillin beteiligten α -Galactosyl-Monoglucosyl-Diacylglycerin-Synthase CpoA (EC2.4.1.208; Edman et al., 2003; 1.2; 1.6). Schon Grebe et al. (1997) vermuteten eine Beteiligung dieses Enzyms an der Biosynthese der TA. Das einzige weitere charakterisierte Enzym dieser Klasse von Enzymen mit vergleichbarer enzymatischer Funktion, YpfP aus *S. aureus*, ist für die Synthese des Linkers des Lipidankers von LTA in *S. aureus* verantwortlich (Kiriukhin et al., 2001). Zhang et al. (1999) konnten die für die Aufnahme von Cholin, sowie dessen Aktivierung als CDP-Cholin verantwortlichen Gene *licA*, *licB* und *licC* im *lic*-Gen-Cluster im Genom von *S. pneumoniae* aufgrund der Homologie seiner kodierten Proteine zu den in *Haemophilus influenzae* am Einbau von Phosphocholin in das Lipopolysaccharid verantwortlichen Proteine identifizieren (Abbildung 1.3). Ein schematischer Überblick über die bisher bekannten Zusammenhänge und Reaktionen der TA-Biosynthese in *S. pneumoniae* wurde in Abbildung 1.4 dargestellt.

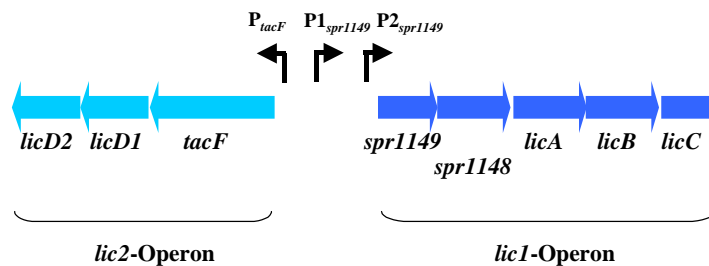


Abbildung 1.3: Genetische Organisation des *lic*-Clusters in *Streptococcus pneumoniae* R6. Das aus zwei Transkriptionseinheiten (*lic1*-Operon, Gene symbolisiert durch dunkelblaue Pfeile; *lic2*-Operon, Gene symbolisiert durch hellblaue Pfeile) bestehende *lic*-Cluster wurde inklusive seiner identifizierten Promotoren (schwarze Pfeile) dargestellt. Das *lic1*-Operon wird von zwei Transkriptionsstartpunkten aus transkribiert ($P1_{spr1149}$ und $P2_{spr1149}$). Das *lic2*-Operon besitzt einen Transkriptionsstartpunkt (P_{tacF}).

Wie aus Abbildung 1.3 zu ersehen, sind die Gene des *lic*-Clusters in zwei divergent orientierten Operons (*lic1*- und *lic2*-Operon) im Genom von *S. pneumoniae* organisiert. Die Gene *licA*, *licB* und *licC* kodieren für eine putativen Cholin-Importer (LicB), eine putative Cholin-Kinase (LicA) und eine CDP:phosphorylcholin-cytidylyltransferase (LicC; Campbell & Kent, 2001). LicABC importieren und aktivieren Cholin als CDP-Cholin. Von den beiden

weiteren Genen des *lic1*-Operons, *spr1149* und *spr1148* wird aufgrund der Homologie zu entsprechenden, bekannten Funktionen auf Proteinebene vermutet, daß sie für die Umwandlung und Aktivierung von Ribulose-5-Phosphat zu CDP-Ribitol, einem für die Synthese der Repeating Unit der TA benötigten Precursor benötigt werden (Abbildung 1.4). Diese fünf Gene des *lic1*-Operons stehen unter der transkriptionellen Kontrolle zweier Promotoren ($P1_{spr1149}$ und $P2_{spr1149}$), von welchen $P1_{spr1149}$ positiv durch das Zweikomponentensystem CiaRH (1.2) reguliert wird (Halfmann et al., 2007b).

Die Gene *licD1* und *licD2* des *lic2*-Operons scheinen für den Einbau von Phosphocholin in die Repeating Unit der TA verantwortlich zu sein (Zhang et al., 1999; Abbildung 1.4). Der durch *tacF* kodierte Polysaccharid-Transmembran-Transporter (Flippase) scheint für den Export von mit Cholinphosphat-Resten substituierten und an Bactoprenol gebundenen Repeating Units verantwortlich zu sein (Damjanovic et al., 2007). Alle drei Gene werden ausgehend von Promotor $P1_{tacF}$ transkribiert.

CpoA könnte an der Synthese des Linkers des Lipidankers von LTA (vgl. Abbildung 1.2) beteiligt sein. Die Polymerisierung der Repeating Units, Verknüpfung mit Peptidoglycan oder mit dem LTA-Lipidanker erfolgt vermutlich durch unbekannte extrazelluläre Funktionen.

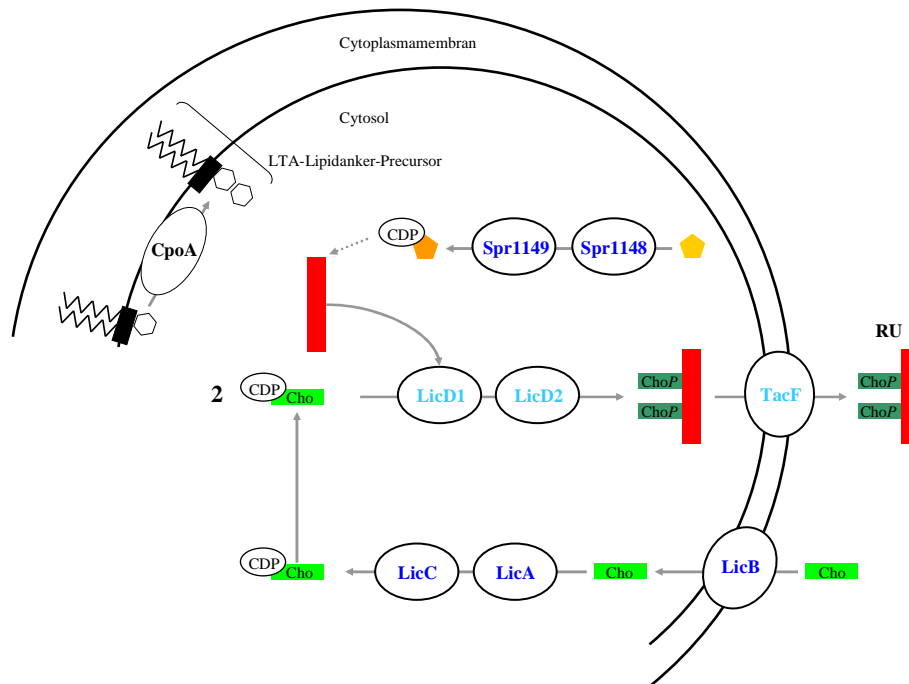


Abbildung 1.4: Beteiligung der Genprodukte des *lic*-Clusters und putative Funktion von *CpoA* bei der Synthese von Teichonsäuren in *Streptococcus pneumoniae* R6. Dargestellt wurden bekannte- und putative Reaktionen der Proteine des *lic*-Clusters und von *CpoA* bei der TA-Biosynthese. Erläuterungen im Text. Blau: Genprodukte des *lic1*-Operons; hellblau: Genprodukte des *lic2*-Operons; Cho: Cholin; ChoP: Phosphocholin-Rest; CDP: Cytidindiphosphat-Rest; rot: Tetrasaccharid-Ribitolphosphat-Precursor; gelb: Ribulose-5-Phosphat; orange: Ribitol-5-phosphat-Rest; RU: Repeating Unit; LTA: Lipoteichonsäure; LTA-Lipidanker-Precursor: Monoglucosyl-Diacylglycerin und Galactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin.

Cholinbindeproteine

Eine der wesentlichen Funktionen der TA in *S. pneumoniae* ist das nicht-kovalente Attachment der bisher 13 bis 16 aus verschiedenen Stämmen von *S. pneumoniae* bekannten Cholinbindeproteine. Diese Familie von Oberflächenproteinen interagieren über einen C-terminalen, Prolin-reichen, repetitiven Bereich mit den Phosphorylcholin-Resten (ChoP) der TA (Yother & White, 1994; Garcia et al., 1998). Unter den Cholinbindeproteinen in *S.*

pneumoniae befindet sich die, in die von Tomasz et al. (1970) beschriebene Penicillin-Toleranz verwickelte (1.2) und hauptsächlich für die Autolyse verantwortliche, N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase LytA (1.1; 1.5). Zudem zählt hierzu das Cholinbindeprotein CbpD, für welches eine Beteiligung an einer speziellen Lyseform, der sogenannten Kompetenz-induzierten Allolyse (Guiral et al., 2005; Kausmally et al., 2005; 1.5) gezeigt werden konnte. Einer Reihe von Cholinbindeproteinen konnte jedoch noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden (Gosink et al., 2000; Hammerschmidt, 2007). Hierunter befindet sich auch PcpA, welchem eine Rolle bei Protein-Protein- bzw. Protein-Lipid-Interaktion zugeordnet wird (Sanchez-Beato et al., 1998).

1.5 Autolyse, Kompetenz und Allolyse in *Streptococcus pneumoniae*

Tomasz et al. (1970) zeigten, daß die Zahl lebensfähiger Zellen von lysedefizienten (*lytA*⁻) Mutanten erheblich langsamer abnimmt. Dieses Phänomen wurde als Toleranz bezeichnet (1.2). Die durch eine Mutation im *ciaH*-Gen des CiaRH-Systems vermittelte Resistenz gegen Cefotaxim wird ebenfalls von einer verminderten Autolyse-Fähigkeit begleitet (1.2; Mascher et al., 2006a). Das für die Autolyse verantwortliche Cholinbindeprotein LytA ist in die Lyse der Zellen in der stationären Wachstumsphase (Tomasz & Westphal, 1971) und zugleich in den Mechanismus der natürlichen genetischen Kompetenz zur Aufnahme von exogener DNA in *S. pneumoniae* involviert (Steinmoen et al., 2003 und Referenzen). Die Cefotaxim-resistente *ciaH*-Mutante und die Piperacillin-resistenten *cpoA*-Mutanten (1.2; Grebe et al., 1997) zeigen wiederum eine verminderte genetische Kompetenz. Beide Phänomene, Autolyse und genetische Kompetenz, sind aufgrund der beteiligten Cholinbindeproteine auch abhängig von intakten und im notwendigen Verhältnis vorliegenden WTA und LTA in der Zellwand (1.4). Im Folgenden werden die Zusammenhänge der Autolyse und der natürlichen genetischen Kompetenz zusammengefasst.

Autolyse

LytA ist eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase, welche die Peptidbrücken zwischen den einzelnen Peptidoglycansträngen (1.1) durch Trennung der kovalenten Bindung zwischen den Lactyl-Gruppen von MurNAc und L-Alanin entfernt und so die Lyse der Zellen einleitet. Von LytA wird aufgrund des Fehlens einer N-terminalen Signalsequenz eine cytosolische Lokalisation vermutet, womit jedoch bis heute unklar ist, wie LytA sein extracytosolisches Substrat erreicht. Hingegen sind Substratspezifität, Struktur und Aktivierungsmechanismus sehr gut beschrieben (Vollmer, 2007 und Referenzen):

LytA erreicht die Zellwand in einer inaktiven Form (E-Form), welche durch Dimerisierung von LytA und die Bindung an zwei ChoP-Reste der WTA in die enzymatisch aktive C-Form übergeht. Diese Aktivierung durch die Bindung an mit ChoP substituierte WTA (normalerweise 90 % Anteil an den TA; 1.4) kann durch die Zugabe eines Überschusses an Cholin oder von mit ChoP substituierten LTA (normalerweise 10 % Anteil an den TA; 1.4) gehemmt werden.

Natürliche genetische Kompetenz und Allolyse

LytA ist im Rahmen der bei dem Phänomen der natürlichen genetischen Kompetenz ablaufenden Prozesse in *S. pneumoniae* an einer speziellen Form der Lyse beteiligt. Diese Allolyse führt zur Lyse einer Fraktion von nicht-kompetenten Zellen der gleichen Kultur (Guiral et al., 2005). Diese, durch die Allolyse hervorgerufene Eigenschaft, wurde als „pneumococcal fratricide“ („Brudermord“; Håvarstein et al., 2006) bezeichnet. An diesem Mechanismus sind noch zwei weitere Cholinbindeproteine beteiligt (CbpD und LytC). CbpD wird ebenfalls eine Amidase-Aktivität zugeschrieben (Kausmally et al., 2005). Das Lysozym

LytC ist ebenfalls an der Lyse von *S. pneumoniae* beteiligt (Lopez & Garcia, 2004 und Referenzen). In Abbildung 1.5 sind die bei der Entwicklung der genetischen Kompetenz und der damit verbundenen Allolyse in *S. pneumoniae* beteiligten Mechanismen dargestellt.

Die Entwicklung der natürlichen genetischen Kompetenz zur Aufnahme von exogener DNA, welche in *S. pneumoniae* in der frühen exponentiellen Wachstumsphase bei einem Teil der Zellen einer wachsenden Kultur auftritt, wird durch drei Komponenten reguliert (Claverys & Håvarstein, 2002; Claverys et al., 2006):

Einerseits wird ein als X-State bezeichneter Mechanismus, welcher zur Ausbildung der genetischen Kompetenz führt, durch das *comC*-Genprodukt CSP (Competence Stimulating Peptide) reguliert. Dessen extrazelluläre Konzentration wird, nach Prozessierung und Export durch den durch *comAB* kodierten Transporter, in einem Quorum-Sensing-Mechanismus in Abhängigkeit der Zelldichte von dem Zweikomponentensystem ComDE perzipiert. Nach Erreichen einer Schwellenkonzentration von CSP wird der Response-Regulator ComE durch die Histidin-Kinase ComD phosphoryliert und die Transkription von sogenannten frühen Kompetenzgenen durch Bindung des nunmehr phosphotylierten ComE an die ComE-Bindestelle im Promotor-Bereich dieser Gene induziert. Unter diesen frühen Kompetenzgenen befinden sich die Gene *comAB*, *comCDE*, *comX*, *comW* und *comM* (Abbildung 1.5). Das *comX*-Gen kodiert für den alternativen Sigmafaktor ComX, welcher durch das *comW*-Genprodukt stabilisiert wird. Die Stabilisierung von ComX durch ComW stellt den zweiten regulativen Mechanismus des X-States dar.

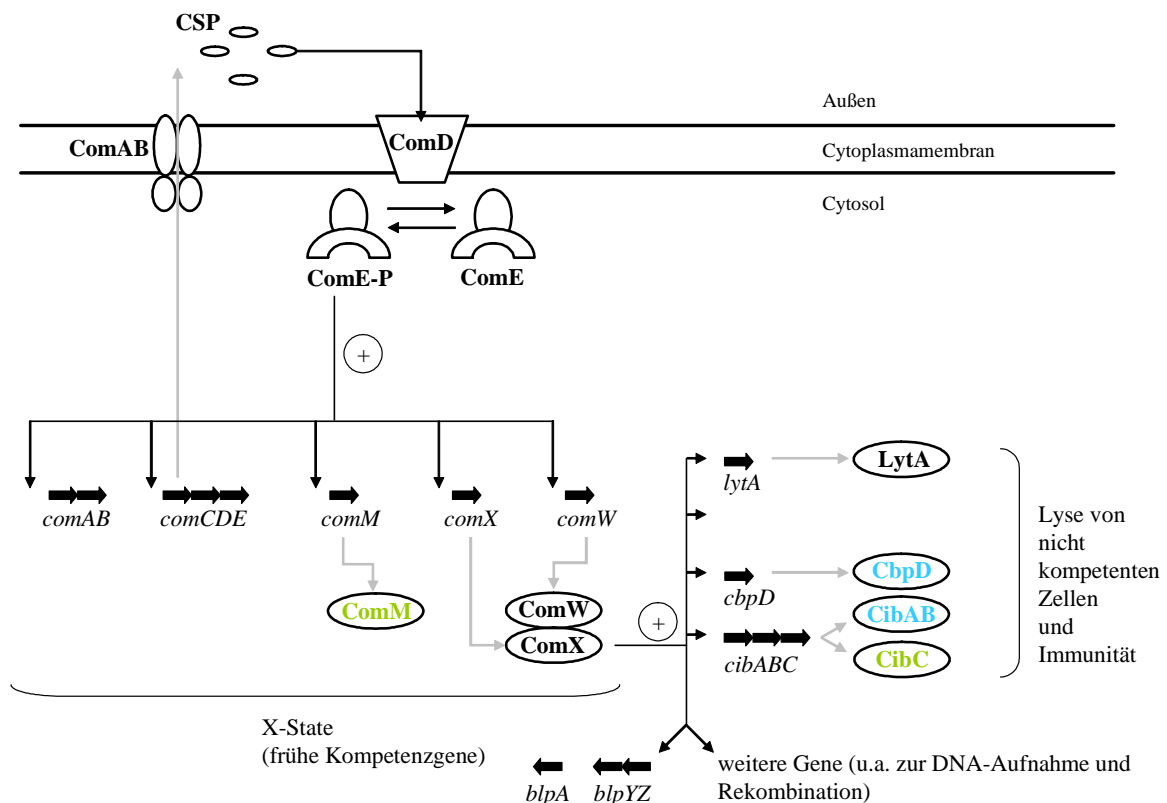


Abbildung 1.5: Regulation der Entwicklung der genetischen Kompetenz und der Allolyse in *S. pneumoniae*. Nähere Erläuterungen im Text. CSP: Competence Stimulating Peptide, prozessierte Form des *comC*-Genprodukts; ComAB: ABC-Exporter; ComD: Histidin-Kinase; ComE: Response-Regulator; ComM: Immunitätsprotein; ComW: ComX-stabilisierender Faktor; ComX: Alternativer Sigma-Faktor; CibAB: Zweikomponenten-Bacteriocin; CibC: Immunitätsprotein; CbpD: Cholinbindeprotein (Amidase); LytA: Cholinbindeprotein (Amidase); *blpAYZ*: Gene des *blp*-Genclusters.

Nach der Stabilisierung des Sigmafaktors ComX durch ComW kommt es zur Bindung von ComX an eine als Cin-Box bezeichnete ComX-Bindestelle im Promotor-Bereich bestimmter Gene und somit zur Induktion der durch ComX-regulierten, späten Kompetenzgene. Zu diesen Genen werden 105 bis 124 Gene aus *S. pneumoniae* gezählt (Dagkessamanskaia et al., 2004; Peterson et al., 2004). Hierzu zählen alle Gene, welche zur Aufnahme, der Prozessierung und Rekombination exogener DNA benötigt werden, sowie eine ganze Reihe bislang uncharakterisierter Gene. Zudem werden drei Gene eines Genclusters (*blp*-Cluster) induziert, deren Produkte für die Bildung, den Export eines Bacteriocins und die Immunität dagegen benötigt werden (deSaizieu et al., 2002). Fünf der von ComX regulierten späten Gene (*lytA*, *cbpD*, *cibABC*), das Lysozym LytC und das durch ein frühes Kompetenzgen kodierte ComM, sind verantwortlich für die als Allolyse bezeichnete, kompetenzabhängige Lyse von nicht-kompetenten Zellen der gleichen Kultur (Abbildung 1.5). Weshalb nur eine Fraktion von Zellen der gleichen Kultur die Kompetenz entwickeln, bedarf jedoch noch genauerer Untersuchungen. Die Ursache hierfür wird in dem von Chai et al. (2008) beschriebenen Phänomen der Bistabilität einer Bakterienkultur vermutet.

Durch die ComX-induzierte Expression von CibAB (Zweikomponenten-Bacteriocin) und dem Cholinbindeprotein CbpD (1.4), kommt es nach deren Freisetzung ins Medium zur Induktion der LytA-vermittelten Autolyse (unter der Beteiligung von LytC) von nicht-kompetenten Zellen. CibAB und CbpD werden auch als Allolyse-Trigger-Faktoren bezeichnet (blau in Abbildung 1.5). Kompetente Zellen werden durch das Immunitätsprotein ComM vor der Amidase-Aktivität von CbpD und durch das Immunitätsprotein CibC vor der bakteriolytischen Aktivität von CibAB geschützt (beide grün in Abbildung 1.5). Die Autolyse der nicht-kompetenten Zellen führt zur Freisetzung von chromosomaler DNA, welche durch die kompetenten Zellen aufgenommen werden kann.

1.6 Piperacillin-resistente Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*

Die Entwicklung von Penicillin-Resistenzen aufgrund von Veränderungen des Targets von Penicillin in *S. pneumoniae* (Pbps; 1.2) stellt einen in mehreren Schritten ablaufenden Prozess dar, in welchem sich Mutationen in den Pbps anhäufen (Laible & Hakenbeck, 1987; Grebe et al., 1997). Um die genetische Basis dieser Resistenzentwicklung Schritt für Schritt zu untersuchen und zu verstehen, isolierten Laible & Hakenbeck (1987) mehrere unabhängige Familien von Piperacillin-resistenten oder Cefotaxim-resistenten Mutanten aus *Streptococcus pneumoniae* R6, welche je aus bis zu sechs Mutanten mit schrittweise höherer Resistenz bestehen. Bei der Charakterisierung der Mutanten fanden sich mehrere Mutanten aus verschiedenen Familien, welche keine Mutationen in den Pbps aufwiesen, jedoch eine höhere Resistenz gegen das zur Selektion eingesetzte β -Lactam besaßen als ihr Parentalstamm. In einer Mutante der auf Cefotaxim isolierten Mutantenfamilien wurde so das Zweikomponentensystem CiaRH als erste nicht-Pbp-Resistenzdeterminante identifiziert (1.2; Guenzi et al., 1994).

Eine der Piperacillin-resistenten Mutanten-Familien bestand aus fünf Mutanten und wurde mit P006 bezeichnet (Abbildung 1.6).

Jede der in Abbildung 1.6 dargestellten 5 Mutanten P106 bis P506 wurde aus dem jeweiligen Parentalstamm isoliert (Pfeile) und zeichnete sich durch eine entsprechend höhere minimale Hemmkonzentration für Piperacillin (MHK) aus. Alle Piperacillin-resistenten Mutanten zeichneten sich zudem durch eine im Vergleich zu Stamm R6 reduzierte natürliche genetische Kompetenz und durch eine verringerte Menge des Pbp1a aus.

| Stamm | Mutationen | MHK [$\mu\text{g/ml}$] Piperacillin (Grebe et al., 1997) |
|-------|--|--|
| R6 | - | 0,016 |
| P106 | <i>cpoA</i> | 0,02-0,05 |
| P206 | <i>cpoA</i> , <i>pbp2b</i> | 0,05 |
| P306 | <i>cpoA</i> , <i>pbp2b</i> , <i>pbp2x</i> | 0,05-0,10 |
| P406 | <i>cpoA</i> , <i>pbp2b</i> , <i>pbp2x</i> , ? | 0,10-0,15 |
| P506 | <i>cpoA</i> , <i>pbp2b</i> , <i>pbp2x</i> , ?, ? | 0,20 |

Abbildung 1.6: Identifizierte Mutationen und MHK für Piperacillin der Mutanten in Familie P006. Erläuterungen im Text. Identifizierte Mutationen in Genen wurden in der Selektionsstufe, in welcher sie erstmalig auftreten, grün dargestellt. Nicht identifizierte Resistenzdeterminanten wurden durch ein Fragezeichen symbolisiert (?). *cpoA*: Gen einer Glykosyltransferase; *pbp2b* und *pbp2x*: Gene für die Penicillin-Bindeproteine 2b und 2x; ?: In dieser Mutante (Selektionsstufe) erstmals auftretende, aber unidentifizierte Mutation.

In Mutante P206 konnte eine Mutation in *pbp2b* und in Mutante P306 konnte eine Mutation in *pbp2x* identifiziert werden, welche beide zur höheren Piperacillin-Resistenz des jeweiligen Stamms führten (Hakenbeck et al., 1994; Grebe & Hakenbeck, 1996).

In der Mutante P106 hingegen, konnte keine Veränderung in den für die Penicillin-Bindeproteine kodierenden Genen gefunden werden. Grebe et al. (1997) konnte die erhöhte Piperacillin-Resistenz von P106 auf eine Deletion eines Adenosin-Restes im Bereich des *cpoA*-Gens zurückführen, was die Identifizierung von CpoA als neue Resistenzdeterminante für Piperacillin bedeutete (1.2). Die Deletion eines Adenosin-Restes im Bereich des vermuteten 5'-Endes des *cpoA*-Transkriptes (Abbildung 1.7) führte im Wildtyp-Stamm R6 zu dem Resistenzphänotyp von Mutante P106.

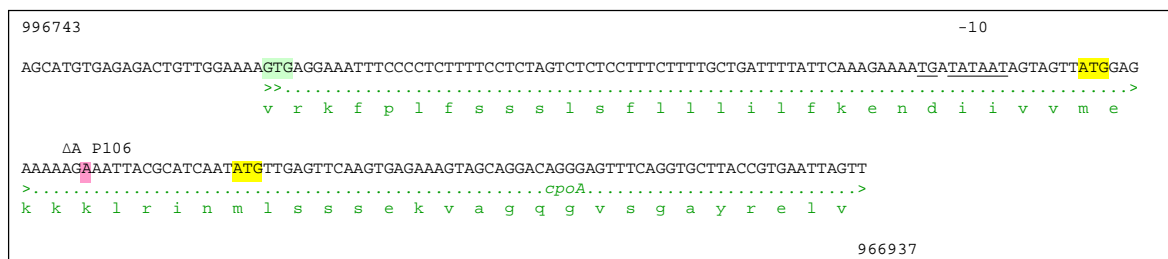


Abbildung 1.7: Bereich des vermuteten 5'-Endes des *cpoA*-Transkriptes in *S. pneumoniae* R6. Gezeigt ist die DNA-Sequenz von Position 996743 bis 966937 im Genom von *S. pneumoniae* R6 (NC_003098). Unterstrichene Nukleotide stellen eine mögliche erweiterte -10-Region von *cpoA* dar. Gelb hinterlegt wurden mögliche alternative Startkodons. Grün hinterlegt wurde das im Genom von Stamm R6 annotierte Startkodon. Rosa hinterlegt wurde die in Mutante P106 zur erhöhten Piperacillin-Resistenz führende Deletion eines Adenosin-Restes (Grebe et al., 1997). Die aa-Sequenz von CpoA wurde grün in Ein-Buchstaben-Kode gezeigt.

Da der Transkriptionsstartpunkt von *cpoA* nicht bekannt war und der Translationsstart von *cpoA* aufgrund von mehreren möglichen Startkodons ohne erkennbare Ribosomen-Bindestelle

nicht ohne weiteres identifiziert werden kann (Abbildung 1.7), konnte von Grebe et al. (1997) keine konkrete Aussage über die Folgen der Deletion des Adenosin-Restes und damit zur Art der Verwicklung von CpoA in die beobachtete Resistenz gegen Piperacillin in P106 getroffen werden. Von Grebe et al. (1997) konnte mit polyklonalen Anti-CpoA-Antikörpern kein CpoA in Mutante P106 detektiert werden. Jedoch war es hingegen nicht möglich, das *cpoA*-Gen zu inaktivieren.

Die Mutanten der höchsten Selektionsstufen P406 und P506 besitzen alle Mutationen des Parentalstamms P306 (*cpoA*, *pbp2b*, *pbp2x*) und beherbergen keine weiteren Mutationen in den Genen der Penicillin-Bindeproteine. In keiner der beiden Mutanten konnte bei den bisher unternommenen Versuchen die zur höheren Resistenz gegen Piperacillin führende Veränderung identifiziert und charakterisiert werden.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Identifizierung und die Charakterisierung bisher unbekannter oder unzulänglich charakterisierter Nicht-Pbp-Determinanten für die Resistenz gegen Piperacillin stellte das Hauptziel dieser Arbeit dar. Hierbei sollten zunächst globale Transkriptomanalysen der fünf Mutanten aus Familie P006 die Basis zur Auffindung und Charakterisierung der unbekannt Resistenzdeterminanten in den Mutanten P406 und P506 liefern. Von besonderem Interesse waren hierbei solche Gene, welche im Parentalstamm von P406 keine veränderten Transkriptmengen aufweisen, in P406 oder P506 jedoch signifikant veränderte Transkriptmengen zeigen. Von auf diese Art identifizierten Genen sollte durch die Konstruktion entsprechender Deletionsmutanten eine Beteiligung an der Piperacillin-Resistenz überprüft werden.

Im Falle einer erfolgreichen Identifizierung einer unbekannt Resistenzdeterminante in P406 oder P506 war es ein weiteres Anliegen dieser Arbeit, diese Determinante molekulargenetisch, sowie in ihren physiologischen Zusammenhängen zu charakterisieren.

In dieser Arbeit sollte zudem der erneute Versuch der Herstellung einer *cpoA*-Deletionsmutante, sowie deren Charakterisierung dazu beitragen, den Mechanismus der durch CpoA vermittelten Piperacillin-Resistenz in Mutante P106 (1.6) aufzuklären und so auch Hinweise zur physiologischen Funktion von CpoA zu erlangen.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

In den Tabellen 2.1-2.3 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Verwendete Stämme von *Streptococcus pneumoniae*

| Ausgangsstamm | Merkmale | Referenz | |
|---|--|------------------------------------|---|
| R6 | R36A-Derivat, kapselfrei | Ottolenghi & Hotchkiss, 1962 | |
| R6-Derivate | Genotyp | Beschreibung | Referenz |
| AmiA9 | <i>rpsL</i> | RpsL K56T | Sicard, 1964; Salles, 1992 |
| P106 | <i>cpoA</i> | | Laible et al., 1987 ; Grebe et al., 1997 |
| P206 | <i>cpoA, pbp2b</i> | Pbp2b G617A | Laible et al., 1987 ; Hakenbeck & Grebe, 1996 |
| P306 | <i>cpoA, pbp2b, pbp2x</i> | Pbp2b G617A, Pbp2x G597D | Laible et al., 1987 ; Hakenbeck & Grebe, 1996 |
| P406 | <i>cpoA, pbp2b, pbp2x</i> | Pbp2b G617A, Pbp2x G597D | Laible et al., 1987 |
| P506 | <i>cpoA, pbp2b, pbp2x</i> | Pbp2b G617A, Pbp2x G597D | Laible et al., 1987 |
| R6Δ <i>spr0282</i> | <i>spr0282::kan-rpsL⁺, rpsL</i> | kan ^R str ^S | McKessar et al., 2007 |
| R6 <i>rpsL</i> | <i>rpsL</i> | RpsL K56T | diese Arbeit |
| P406 <i>rpsL</i> | <i>rpsL</i> | RpsL K56T | diese Arbeit |
| P406Δ <i>kin11reg11</i> | <i>kin11reg11::ermAM</i> | ery ^R | diese Arbeit |
| P406Δ <i>nbp11::janus</i> | <i>nbp11::kan-rpsL⁺, rpsL</i> | kan ^R str ^S | diese Arbeit |
| R6Δ <i>cpoA</i> | Δ <i>cpoA, rpsL</i> | str ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>kin11reg11</i> | <i>kin11reg11::ermAM</i> | ery ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>smp11A</i> | Δ <i>smp11A, rpsL</i> | str ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>smp11B</i> | Δ <i>smp11B, rpsL</i> | str ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>smp11AB</i> | Δ <i>smp11A, Δsmp11B, rpsL</i> | str ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>nbp11</i> | Δ <i>nbp11, rpsL</i> | str ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11</i> | Δ <i>msp11, rpsL</i> | str ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>kin11</i> | Δ <i>kin11, rpsL</i> | str ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>reg11</i> | <i>reg11::ermAM</i> | ery ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11_3</i> | Δ <i>msp11, rpsL</i> | Msp11Δaa148-aa229 str ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11_5</i> | Δ <i>msp11, rpsL</i> | Msp11Δaa6-aa69 str ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11_3Δkin11reg11</i> | Δ <i>msp11, Δkin11reg11, rpsL</i> | str ^R ery ^R | diese Arbeit |
| R6P _{vegM} | P _{vegM} <i>smp11A, rpsL,</i> | str ^R | diese Arbeit |
| R6P _{vegW} | P _{vegW} <i>smp11A, rpsL,</i> | str ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>kin11reg11</i> P _{vegM} | Δ <i>kin11reg11, rpsL,</i> P _{vegM} <i>smp11A</i> | str ^R ery ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>kin11reg11</i> P _{vegW} | Δ <i>kin11reg11, rpsL,</i> P _{vegW} <i>smp11A</i> | str ^R ery ^R | diese Arbeit |
| R6Δinter | ΔPos.1784723-1784761 ¹⁾ , <i>rpsL</i> | str ^R | diese Arbeit |
| R6ΔrupA | ΔPos.1784784-1784883 ¹⁾ , <i>rpsL</i> | str ^R | diese Arbeit |
| R6 P _{11.1} | <i>bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>smp11A</i> P _{11.1} | Δ <i>smp11A, rpsL,</i> <i>bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |

2.Material

| | | | |
|---|---|---|--------------|
| R6Δ <i>smp11B</i> P _{11.1} | <i>Δsmp11B, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>smp11AB</i> P _{11.1} | <i>Δsmp11A, Δsmp11B, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>nbp11</i> P _{11.1} | <i>Δnbp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11</i> P _{11.1} | <i>Δmsp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>kin11</i> P _{11.1} | <i>Δkin11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>reg11</i> P _{11.1} | <i>kin11reg11::ermAM, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | ery ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>kin11reg11</i> P _{11.1} | <i>reg11::ermAM, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | ery ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11_3</i> P _{11.1} | <i>Δmsp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | Msp11Δaa148-aa229 str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11_5</i> P _{11.1} | <i>Δmsp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | Msp11Δaa6-aa69 str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11_3Δkin11reg11</i> P _{11.1} | <i>Δmsp11, Δkin11reg11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | Msp11Δaa148-aa229 str ^R ery ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6P _{vegM} P _{11.1} | <i>P_{vegM}smp11A, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6P _{vegW} P _{11.1} | <i>P_{vegW}smp11A, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6ΔrupA P _{11.1} | <i>Δ1784784-1784883¹⁾, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δinter P _{11.1} | <i>Δ1784723-1784761¹⁾, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.1}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 P _{11.2} | <i>bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>smp11A</i> P _{11.2} | <i>Δsmp11A, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>smp11B</i> P _{11.2} | <i>Δsmp11B, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>smp11AB</i> P _{11.2} | <i>Δsmp11A, Δsmp11B, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>nbp11</i> P _{11.2} | <i>Δnbp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11</i> P _{11.2} | <i>Δmsp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>kin11</i> P _{11.2} | <i>Δkin11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>reg11</i> P _{11.2} | <i>reg11::ermAM, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | ery ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>kin11reg11</i> P _{11.2} | <i>kin11reg11::ermAM, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | ery ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11_3</i> P _{11.2} | <i>Δmsp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | Msp11Δaa148-aa229 str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11_5</i> P _{11.2} | <i>Δmsp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | Msp11Δaa6-aa69 str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>msp11_3Δkin11reg11</i> P _{11.2} | <i>Δmsp11, Δkin11reg11, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | Msp11Δaa148-aa229 str ^R ery ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6P _{vegM} P _{11.2} | <i>P_{vegM}smp11A, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6P _{vegW} P _{11.2} | <i>P_{vegW}smp11A, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |

2.Material

| | | | |
|--|--|--|--------------|
| R6 Δ kin11reg11P _{vegM} P _{11.2} | <i>Δkin11reg11, rpsL, P_{vegM}smp11A, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R ery ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ kin11reg11P _{vegW} P _{11.2} | <i>Δkin11reg11, rpsL, P_{vegW}smp11A, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R ery ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ rupA P _{11.2} | <i>ΔPos.1784784-1784883¹⁾, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ inter P _{11.2} | <i>ΔPos.1784723-1784761¹⁾, rpsL, bgaA::tetM- P_{11.2}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 P _{1_spr1149} | <i>bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ smp11A P _{1_spr1149} | <i>Δsmp11A, rpsL, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ smp11B P _{1_spr1149} | <i>Δsmp11B, rpsL, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ smp11AB P _{1_spr1149} | <i>Δsmp11A, Δsmp11B, rpsL, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ nbp11 P _{1_spr1149} | <i>Δnbp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ msp11 P _{1_spr1149} | <i>Δmsp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ kin11 P _{1_spr1149} | <i>Δkin11, rpsL, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ reg11 P _{1_spr1149} | <i>reg11::ermAM, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | ery ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ kin11reg11 P _{1_spr1149} | <i>kin11reg11::ermAM, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | ery ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ msp11_3 P _{1_spr1149} | <i>Δmsp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | Msp11 Δ aa148-aa229 str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ msp11_5 P _{1_spr1149} | <i>Δmsp11, rpsL, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | Msp11 Δ aa6-aa69 str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ msp11_3 Δ kin11reg11 P _{1_spr1149} | <i>Δmsp11, Δkin11reg11, rpsL, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | Msp11 Δ aa148-aa229 str ^R ery ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6P _{vegM} P _{1_spr1149} | <i>P_{vegM}smp11A, rpsL, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6P _{vegW} P _{1_spr1149} | <i>P_{vegW}smp11A, rpsL, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ kin11reg11P _{vegM} P _{1_spr1149} | <i>Δkin11reg11, rpsL, P_{vegM}smp11A, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | str ^R tet ^R ery ^R | diese Arbeit |
| R6 Δ kin11reg11 P _{vegW} smp11A P _{1_spr1149} | <i>Δkin11reg11, rpsL, P_{vegW}smp11A, bgaA::tetM- P_{1_spr1149}-lacZ</i> | str ^R tet ^R ery ^R | diese Arbeit |

2.Material

| | | | |
|---|---|--|---------------------|
| R6ΔrupA P1 _{spr1149} | Δ Pos.1784784-1784883 ¹⁾ , <i>rpsL</i> , <i>bgaA::tetM</i> - P1 _{spr1149} - <i>lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δinter P1 _{spr1149} | Δ Pos.1784723-1784761 ¹⁾ , <i>rpsL</i> , <i>bgaA::tetM</i> - P1 _{spr1149} - <i>lacZ</i> | str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δmsp11_3 P _{htrA} | Δ <i>msp11</i> , <i>rpsL</i> , <i>bgaA::tetM</i> - P _{htrA} - <i>lacZ</i> | Msp11Δaa148-aa229 str ^R tet ^R | diese Arbeit |
| R6 P _{htrA} | <i>bgaA::tetM</i> - P _{htrA} - <i>lacZ</i> | tet ^R | diese Arbeit |
| P406Δ <i>kin11reg11</i> P _{11.1} | <i>kin11reg11::ermAM</i> , <i>bgaA::tetM</i> - P _{11.1} - <i>lacZ</i> | ery ^R tet ^R | Marciszewski, 2007 |
| P406Δ <i>kin11reg11</i> P _{11.2} | <i>kin11reg11::ermAM</i> , <i>bgaA::tetM</i> - P _{11.2} - <i>lacZ</i> | ery ^R tet ^R | Marciszewski, 2007 |
| P406Δ <i>kin11reg11</i> P2 _{spr1149} | <i>kin11reg11::ermAM</i> , <i>bgaA::tetM</i> - P2 _{spr1149} - <i>lacZ</i> | ery ^R tet ^R | Marciszewski, 2007 |
| P406Δ <i>kin11reg11</i> P1 _{spr1149} | <i>kin11reg11::ermAM</i> , <i>bgaA::tetM</i> - P1 _{spr1149} - <i>lacZ</i> | ery ^R tet ^R | Marciszewski, 2007 |
| P406 P _{11.1} | <i>bgaA::tetM</i> - P _{11.1} - <i>lacZ</i> | tet ^R | Marciszewski, 2007 |
| P406 P _{11.2} | <i>bgaA::tetM</i> - P _{11.2} - <i>lacZ</i> | tet ^R | Marciszewski, 2007 |
| P406 P1 _{spr1149} | <i>bgaA::tetM</i> - P1 _{spr1149} - <i>lacZ</i> | tet ^R | Marciszewski, 2007 |
| P406 P2 _{spr1149} | <i>bgaA::tetM</i> - P2 _{spr1149} - <i>lacZ</i> | tet ^R | Marciszewski, 2007 |
| R6Δ <i>kin11reg11</i> P2 _{spr1149} | <i>kin11reg11::ermAM</i> , <i>bgaA::tetM</i> - P2 _{spr1149} - <i>lacZ</i> | ery ^R tet ^R | Marciszewski, 2007 |
| R6 P _{11.3} | <i>bgaA::tetM</i> - P _{11.3} - <i>lacZ</i> | tet ^R | diese Arbeit |
| R6Δ <i>kin11reg11</i> P _{11.3} | <i>kin11reg11::ermAM</i> , <i>bgaA::tetM</i> - P _{11.3} - <i>lacZ</i> | ery ^R tet ^R | diese Arbeit |
| P406Δ <i>cyl</i> | <i>spr1764-spr1774::aad9</i> | spc ^R | diese Arbeit |
| P406Δ <i>plcR</i> | <i>spr1763::aad9</i> | spc ^R | diese Arbeit |
| P406Δ <i>ytrA</i> | <i>spr1758-spr1760::tetM</i> | tet ^R | diese Arbeit |
| P506Δ <i>cyl</i> | <i>spr1764-spr1774::aad9</i> | spc ^R | diese Arbeit |
| P506Δ <i>plcR</i> | <i>spr1763::aad9</i> | spc ^R | diese Arbeit |
| P506Δ <i>ytrA</i> | <i>spr1758-spr1760::tetM</i> | tet ^R | diese Arbeit |
| R6-479rr | <i>spr1814::ermAM</i> | ery ^R | Throup et al., 2000 |
| R6 P _{rupA} | <i>bgaA::tetM</i> - P _{rupA} - <i>lacZ</i> | tet ^R | diese Arbeit |

¹⁾ Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).

Tabelle 2.2: Verwendete Stämme von *E. coli*

| Stamm | Merkmale | Referenz |
|---------|---|---------------------------|
| DH5α | Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 D(<i>lacZYA-argF</i>) <i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 phoA relA1</i> | Sambrook et al., 1989 |
| XL1blue | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q</i> , <i>lacZ</i> ΔM15 Tn10(Tetr)] | Qiagen, The Expressionist |

Tabelle 2.3: Verwendeter Stamm von *Bacillus subtilis*

| Stamm | Merkmal | Referenz |
|-------|------------------|----------------|
| 168 | Trp ⁻ | Spizizen, 1958 |

2.2 Plasmide

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zusammengestellt.

Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Replikon | Marker | Referenz |
|-------------------------------|----------|--|---|
| pQE30 | ColE1 | <i>bla</i> , P _{T5} , RBSII, MCS/6xHis-tag | Stüber et al., 1990; Qiagen The Expressionist |
| pQE30 His ₆ -Reg11 | ColE1 | <i>reg11</i> | Marciszewski, 2007 |
| pCR2.1-spec | ColE1 | <i>bla</i> , <i>kan</i> , <i>aad9</i> | Zähler, 1999 |
| pUC19 | ColE1 | <i>bla</i> | Yanisch-Perron et al., 1985 |
| pPP2vegW | ColE1 | pPP2::P _{vegW} ; <i>bla</i> , <i>tetM</i> | Halfmann, Dissertation 2008 |
| pPP2vegM | ColE1 | pPP2::P _{vegM} ; <i>bla</i> , <i>tetM</i> | Halfmann et al., 2007a |
| pPP2htrA | ColE1 | pPP2::P _{htrA} ; <i>bla</i> , <i>tetM</i> | Halfmann et al., 2007b |
| pPP2 | ColE1 | <i>bla</i> , <i>tetM</i> | Halfmann et al., 2007a |
| pdel17 | ColE1 | pUC19-Derivat zur Deletion von <i>spr1764-spr1774</i> ; <i>bla</i> , <i>aad9</i> | diese Arbeit |
| pPP2 P _{11.1} | ColE1 | P _{11.1} :: <i>lacZ</i> , (P _{11.1} =Pos.1788593-1788467 in R6 ¹⁾) | diese Arbeit |
| pPP2 P _{11.2} | ColE1 | P _{11.2} :: <i>lacZ</i> , (P _{11.2} =Pos.1787012-1786896 in R6 ¹⁾) | diese Arbeit |
| pPP2 P1 _{spr1149} | ColE1 | P1 _{spr1149} :: <i>lacZ</i> , (P1 _{spr1149} =Pos.1151319-1151223 in R6 ¹⁾) | Halfmann et al., 2007b |
| pPP2 P2 _{spr1149} | ColE1 | P2 _{spr1149} :: <i>lacZ</i> , (P2 _{spr1149} =Pos.1151193-1151057 in R6 ¹⁾) | Marciszewski, 2007 |
| pPP2 P _{11.3} | ColE1 | P _{11.3} :: <i>lacZ</i> , (P _{11.3} =Pos.1789003-1789164 in R6 ¹⁾) | diese Arbeit |
| pPP2 P _{rupA} | ColE1 | P _{rupA} :: <i>lacZ</i> , (P _{rupA} =Pos.1784834-1784682 in R6 ¹⁾) | diese Arbeit |

¹⁾ Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098).

2.3 Oligonukleotide

Tabelle 2.5 zeigt die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Oligonukleotide. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech AG, Ebersberg und Operon Biotechnologies, Köln hergestellt. Die Stammlösungen hatten eine Konzentration von 100pmol, gelöst in 1xTE-Puffer. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Gebrauchslösungen wurden als 1:10-Verdünnungen in H₂O angesetzt.

Tabelle 2.5: Verwendete Oligonukleotide

| Primer | Position im Genom von R6 ¹⁾ | Sequenz ²⁾ |
|--------|--|------------------------------------|
| 301 | 1784857-1784881 | CGCGGATCCTTCGGTTTGAGAGGTAAAGCTGATC |
| 302 | 1784701-1784722 | taGGGCCCGGTAGTGAATGGAACAATACC |

2.Material

| | | |
|---------------|-----------------|---|
| 303 | 1784758-1784785 | CGCGGATCCTCATAACCAACCAGATTCTTTTGC |
| 304 | 1784701-1784722 | CGCGGATCCCGGTAGTGAATGGAACAATACC |
| 305 | 1787183-1787210 | CGCGGATCCATCCATCGTTTCATCTTAGTTATCTCC |
| 306 | 1786966-1786990 | taGGGCCCTCATTCCCAGTTGTTTTACATACCG |
| 307 | 1786966-1786990 | CGCGGATCCATTCACCAGTTGTTTTACATACCG |
| 308 | 1788241-1788267 | CGCGGATCCGAAATAGATGATCCCTCTTTCATTCC |
| 309 | 1788084-1788108 | taGGGCCCATGGAGTGGTTGAAAGGAGAGTCTC |
| 310 | 1788084-1788108 | CGCGGATCCATGGAGTGGTTGAAAGGAGAGTCTC |
| 311 | 1786486-1786510 | GTTTTGTTGGTTTGACCATTTACC |
| 312 | 1786384-1786404 | ACAGTTAGGATGGGGAAAACC |
| 313 | 1784869-1784890 | GAAATCGCAGATCAGCTTTACC |
| 314 | 1784762-1784785 | TCATAACCAACCAGATTCTTTTGC |
| 315 | 1786481-1786510 | gcgGGATCCTTGAAGGTAATGGTCAAACCAAACAAAAC |
| 319 | 1689711-1689732 | TCTGGCGTGTCTTCTTCGAAAC |
| 320 | 1689902-1689930 | TACTTCCAACCTATTGAGAGAAAATTTCCGCC |
| 322 | 1151214-1151235 | gcgGCATGCGCGAAATTTAGAGTCCCTCAG |
| 324 | 1151325-1151350 | cgcGGATCCGTTTTTCATTATATCATAAAGTTAGC |
| 0472f | 476001-476021 | gcgGCATGCTCTGATATTTATAGAGGGTAC |
| 0472r | 476152-476173 | cgcGGATCCCTCTGTATTTACGCCTATATTC |
| 1_for | 1786009-1786028 | TTTGCTTGGTTCCGATTTCG |
| 1_rev | 1784705-1784724 | TTGTTCCATTCACTACCGTC |
| 1007f | 989301-989320 | gcgGCATGCTGCATTGCCATTACCTATCC |
| 1007r | 989425-989450 | cgcGGATCCCTAAGATAATAATTACTCTGAGAC |
| 1147f | 1149451-1149470 | gcgGCATGCTTCTGGTGCATTGATTTTG |
| 1147r | 1149291-1149311 | cgcGGATCCACTTATACTTCCCACTTAAAC |
| 11o | 1786229-1786248 | gcGGATCCGAATACTGCCTTTGTGGCTG |
| 1383_f2 | 1367521-1367541 | gcgGCATGCTCTTCTGTACTTTTCCGGCTG |
| 1383_r2 | 1367355-1367381 | cgcGGATCCCTTGTACTTGTAAATTTACGACTTTC |
| 15_for2 | 1538180-1538199 | GTAGCACTGTACCAGAGATG |
| 15_rev | 1541430-1541447 | TCAGGGAAAGCCTTGTCG |
| 15xxtetM_for | - | AAGATGTCCTGGACATTTGAGCTAGCCAAGTAATCGTGAATGTCC |
| 15xxtetM_rev | - | GTCTCTTTTGTCTATGAGTGTCTAGCTTACAGACAAAGAATATCC |
| 1762f | 1730441-1730460 | gcgGCATGCGCTACCTAGTTTGATCTTTG |
| 1762r | 1730327-1730345 | cgcGGATCCCTCTCCCTTCCCTACCAATC |
| 17xxspec_for | - | GTTACATTTGCATTGCTAGGATCGATTTTCGTTTCGTGAATAC |
| 17xxspec_rev | - | GAGCCTTCAACACAGATTACCATATGCAAGGGTTTATTG |
| 1814nF | 1785370-1785390 | gcgGCATGCTCGACTACCTTATAAGGAGAG |
| 1814nR | 1785261-1785279 | cgcGGATCCCTTCTTGGCTTGAAGGACAG |
| 1817_rev | 1788021-1788041 | GTCCGCAAAATTTCCCTTGTCT |
| 1817_rev2 | 1788055-1788081 | CTCAATTTTTCAACTTTAACCACAGTC |
| 1818_rev | 1788407-1788426 | CTCCTGCTACTACTAAACTC |
| 18182_f | 1789145-1789164 | gcgGCATGCGTTCGACTCCTCTAGGGTGC |
| 18182_r | 1789003-1789032 | cgcGGATCCCTGTATATAATATCTAGTTTTTAAAAATACAC |
| 1818nF | 1788462-1788481 | gcgGCATGCAATTGTAGTATGAAATGGGG |
| 1818nR | 1788345-1788362 | cgcGGATCCGACCTTCCAAGGAAAATG |
| 18506_for | 1788448-1788467 | ATGGGGGAAGAAGAGATGAG |
| 18506_for2 | - | CAAGAGGCTGAAGAGGACAG |
| 18506_for3 | 1788336-1788355 | CTTGAAGGTCTTTGCTGGC |
| 18506_rev | 1788074-1788093 | CCACAGTCATGAGACTCTCC |
| 18ermAM_rev2 | - | CCATTCCTACTACCGTCAATTTCTTTAGTAACGTGTAACCTTCC |
| 18ermAMforneu | - | GGAGTTATGACCTATCTCATAGCAAAGAATGGCGGAAACG |
| 18up_rev | 1788598-1788617 | AAATCTAAGGCAACTTCCTC |
| 18xxermAM_for | - | GACAGAAGCTTCTGCCTCCTAGCAAAGAATGGCGGAAACG |
| 18xxermAM_rev | - | CGTGTGAGCTACGTTCTGTCTTTAGTAACGTGTAACCTTCC |
| 1914_rev | 1893953-1893972 | ATGGTTACCAATATAGAGGC |

2.Material

| | | |
|------------|-----------------|---|
| 1914_rev2 | 1893992-1894011 | AATCCAAAATAAATCCGTCC |
| 1914bs_f | 1894383-1894401 | gcgGCATGCTAAATGGAGAATATGTAGG |
| 1914bs_r | 1894241-1894261 | cgcGGATCCGGAACCTCAACCTGTCACTTC |
| 1936f | 1919071-1919091 | TAATATCTGAACCCTTGACCC |
| 1936r | 1919185-1919210 | ATCCAACCTAATTGTATTTGTTGATG |
| 2_for | 1785570-1785589 | TCATCAAACATGCCAAAGCG |
| 2_rev | 1784968-1784987 | CCATTTCCATCAATTCAGGC |
| 2005f | 1998881-1998900 | AGTTTAACACTTCCTCTCAG |
| 2005r | 1998988-1999010 | AAATTGGAGTAGGAGAAATTTCC |
| 263f | 265591-265613 | AAGCAGATTCCAAACAAAAAATG |
| 263r | 265707-265729 | TAATTTGTCCATCATCAATCTCC |
| 274_lacZ | - | GGAAGGGCGATCGGTGCGGG |
| 3_for | 1784784-1784803 | ACAGAGGCAGCTAATATCGC |
| 343f | 347491-347510 | gcgGCATGCTGTGGAAGTCAGTCTCAGCG |
| 343r | 347641-347662 | cgcGGATCCAACCACCTCCACATCACCAATC |
| 382F | 380901-380921 | gcgGCATGCGAGTCAATGTGATTGCTCCAG |
| 382R | 381011-381030 | cgcGGATCCAAATCTGCAACCTGCTCTGC |
| 3RACE | 1786876-1786901 | ATCAAAGATAACAAGTATGCTGGTTG |
| 545f | 547351-547371 | TGCAAGCTCTTCAAATTATG |
| 545r | 547462-547480 | TGGGATCAACAGGCTTATC |
| 584f | 599941-599965 | CGTATGTATAGACAATTAACCTCTG |
| 584r | 600049-600070 | TTTGCGTAAGTGAATTATAAGG |
| 64f | 70381-70398 | gcgGCATGCCCTCAAAGCAGTGCTTTG |
| 64r | 70512-70538 | cgcGGATCCTTTTTCTATTAAATATAGGAATGGGAG |
| 666F | 669437-669456 | gcgGCATGCATCTCAAGTGGCGAATTAGC |
| 666R | 669543-669563 | cgcGGATCCCGGTTGAACGCTAACCGAAAC |
| 681bs_f | 686436-686455 | gcgGCATGCTTATTTCCGGTGAATAGCTG |
| 681bs_r | 686294-686313 | cgcGGATCCTAGTATTACGGATAGCATC |
| 729bs_f | 728051-728069 | gcgGCATGCTCCTGAAATGGTAGGTGAG |
| 729bs_r | 728193-728212 | cgcGGATCCTGCTCAGGTGTCCCATCTTC |
| 81f | 87591-87619 | gcgGCATGCATCACTGGGCTAATAGAGATAAAATAAAC |
| 81r | 87725-87750 | cgcGGATCCTAACGATTACATTATTAGTATACTCC |
| amiA9fwd1 | 245010-245040 | GGCTCTAGGTCTTCAAAGATATCGACTTTGG |
| amiA9rev1 | 249962-249993 | AAACAGTGTGATTTCTTGACGGCTGTTAGCG |
| aroCF | 1230602-1230620 | gcgGCATGCGGCTGTTGCCATGGGAATG |
| aroCR | 1230451-1230470 | cgcGGATCCTCTTGTGATGAGTAAGAGCC |
| cce_r | 1784291-1784315 | CGTTTCCGCCATTCTTTGCTGCTTCACGAGCGACATCATAAATGG |
| ccpA_kon_r | 1782551-1782571 | AACGATGAAATCCACGCTGCC |
| cpoA_for | 965707-965727 | gcgAAGCTTGTTGTTCCATTGCCAAACCGC |
| cpoA_rev | 968965-968985 | cgcGGATCCAATTTCTCTGATAAGGTATGC |
| cpoAseq1 | 966258-966277 | GCGCACACTTGAAGATGTGG |
| cpoAseq2 | 966743-966762 | AGCATGTGAGAGACTGTTGG |
| cpoAseq3 | 967405-967424 | CTTTATCCGTCCTGGCTGAGG |
| cpoAseq4 | 968041-968060 | CAATCGCTACGAAGATTGGC |
| cpoAseq5 | 968462-968481 | TCCTGCTTGATTTCCGGACG |
| cpoAseq6 | 967871-967890 | TACTTTCTCCCTAAAGCGGC |
| cpoAseq7 | 967068-967088 | GCACATAGCCAATCTTTCTCC |
| cpoALr | 967292-967312 | gcGGATCCTCTTCTTGTTGTTAGAGGATG |
| cpoARACE1 | 966888-966907 | CTGTCTGCTACTTTCTCAC |
| cpoARACE2 | 966918-966937 | AACTAATTCACGGTAAGCAC |
| cpoARf | 967669-967691 | taGGGCCC GCGTGATTTAGATCTCTATAAGG |
| cpoARf3 | 967637-967656 | gcGGATCCGAAGCTGCGAGTTGTGAGGC |
| ctrl15_for | 1537951-1537976 | AGTCTTGACTAGATAGAGGAGCATGG |
| ctrl15_rev | 1541525-1541550 | AGATGCTATCTCACTGAATACCTTGC |
| ctrl17_for | 1730811-1730832 | GTTCCTGTCTAGAAATTTGGC |

2. Material

| | | |
|---------------|-----------------|---|
| ctrl17_rev | 1744080-1744100 | AATTGGAGTTTCGTTACAGG |
| d18172Rfor | 1787284-1787303 | cgcGGATCCTGGGAACTATTAGCCCAAGC |
| d1817Lrev | 1788021-1788041 | cgcGGATCCGTTCCGCAAAAATTTCTTGTC |
| d1817Rfor | 1787438-1787459 | taGGGCCCGATACGACGCCTCTAGCTATGC |
| d18182Lrev | 1788408-1788431 | cgcGGATCCTCCTGCTACTACTAAACTCATTGC |
| d18182Rfor | 1788282-1788305 | cgcGGATCCGGTTTAAAATTAGTCAGAGATGTG |
| d1818Lrev | 1788405-1788426 | cgcGGATCCAACCTCCTGCTACTACTAAACTC |
| d1818Rfor | 1788338-1788357 | taGGGCCCTCCTTGGAAGTCTTTGCTG |
| d1818Rrev | 1787271-1787291 | CATCCTACATCCTGCTTGGGC |
| des_for | - | GCGGCATGCTTTTAGCGCAATCGGCTATG |
| des_rev | - | CGCGGATCCAGTAAGTATCCTCTCATTGTGTG |
| dHK2Rfor | 1785392-1785413 | cgcGGATCCAAACATCCAACGGAAAGTGAAG |
| dHKLrev | 1786383-1786404 | cgcGGATCCTACAGTTAGGATGGGGAAAACC |
| dHKRfor | 1785462-1785482 | taGGGCCCGGAGATGAGCTCCATACAGTC |
| dL18406f | 1789420-1789438 | gcGGATCCGCGTGTTC AAGTCATGTAG |
| dL18x_for | 1789043-1789062 | gcGGATCCCTTCCCGATT CATTACAGAG |
| dL18x_rev | 1788394-1788413 | cGAATTCAGATAGGTCATAACTCCTGC |
| dLR2F | 1788515-1788559 | TTTGAACAGAATTTTTACTGTTTTGTGCATATTTTCTAGTGACAG |
| dLR2R | 1788518-1788556 | TCACTAGAAAATATGACAAAACAGTGAAAAATTCTGTTC |
| dMRfor | 1788505-1788553 | CAGAATTTTTATGACATTTTAAACGATTTTCTAGTGACAGAAGCTTCTGC |
| dMRrev | 1788513-1788561 | TTCTGTCACTAGAAAATCGTTAAAATGTCATAAAAATTCTGTTCAAAAC |
| dR18_for | 1784710-1784728 | gcCTCGAGAATTGACGGTAGTGAATGG |
| dR18_rev | 1783691-1783710 | gcGGATCCTCACTATAAGTGATTCCTGC <u>TTATAGTCTTTTAAAATCAGAGGAGGCAGATAGAAAATATGACAAATGTCATAAAA</u> ATTC |
| dRR | 1788522-1788551 | gcGGATCCCAAGTAGTCACTCGAGAAGC |
| dTC11_for | 1787314-1787333 | cGAATTCACACCCAAATACGCCACTAC |
| dTC11_rev | 1786315-1786334 | gcCTCGAGCTATTCGAAACTATGTCACC |
| dTCneu | 1784837-1784856 | GATATCTGGCACTGTCTATCACAGG |
| EII_fwd_Kontr | 570733-570758 | GGTCAATCGAGAATATCGTCAACTG |
| erm_kon_f | - | CTTGGTGAATTAAGTGACACG |
| erm_kon_r | - | cGAATTCAGCAAAGAATGGCGGAAACG |
| erm18_f | - | gcCTCGAGCTTTAGTAACGTGTAACCTTCC |
| erm18_r | - | gcgGCATGCTCGATGCTTATCTCAAGTGG |
| ftsEbs_f | 669428-669447 | cgcGGATCCGAAGTCTCCTACGATGTAAGC |
| ftsEbs_r | 669573-669592 | gcgGCATGCGTCAATTAACAGAAAGTTAATCTTTTGG |
| FtsZF | 1488184-1488210 | cgcGGATCCTTCTGGAGCAGGAGCTGG |
| FtsZR | 1488062-1488079 | gcgGCATGCTAATTTCCCATCTTGGTGTG |
| gap_f | 1009695-1009716 | cgcGGATCCGTTTCGTATTTTTTCTATAATTATTATTATTTATAGC |
| gap_r | 1009845-1009881 | gcgGCATGCATGATATCAATCTCTTTCGC |
| hk03F | 347361-347380 | cgcGGATCCTCAAATCCCATAGAGACAG |
| hk03R | 347515-347534 | AGGTATTGTTCCATTCACTACCG |
| HK11_A_for | 1784700-1784722 | CTAAGATGAAACGATGGATAGC |
| HK11_B_rev | 1787181-1787202 | AAAACCATAAAAATTAACCTGATCC |
| hk11_rev | 1786399-1786423 | gcgGCATGCTCATTTAAAATTA AAAAGAG |
| hsdRbs_f | 792329-792348 | cgcGGATCCTAACTCGATCAACAAACATC |
| hsdRbs_r | 792463-792482 | CCTATTCCAGAGGAAATGGATCGGATCCG |
| janus_f | - | GGGCCCTTTCTTATGCTTTTGGACG |
| janus_r | - | GTAGTGAATGGAACAATACCTACTATAACTTTAGGAGGGC |
| K2down_f | 1784581-1784600 | GCCCTCCTAAAGTTATAGTAGGTATTGTTCCATTCACTAC |
| K2up_r | 1784701-1784720 | gcgAAGCTTTAGCACTGTACCAGAGATGAGG |
| L15klon_for | 1538181-1538202 | gcataatCATATGTTGGTCTCCTTTCTTTACCC |
| L15klon_rev | 1538849-1538869 | gccCTGCAGTTGGTCTCCTTTCTTTACCC |
| L15klon_rev2 | 1538849-1538869 | TGACCGATAATCGGGAGGTAGCACTGTACC |
| L15xx_for | 1538163-1538192 | TCCAGCATTTCTACAAGAATAAGTAGAGG |
| L17xx_for | 1730833-1730862 | |

2.Material

| | | |
|-------------------|-----------------|--|
| L17xx_rev | 1731789-1731808 | <u>ATTCACGAACGAAAATCGATCCTAGCAATGCAAATGTAAC</u> |
| L18_forneu | 1788983-1789007 | ATACATTAAGAGGGAATCAGTTTGG |
| L18_revneu | | <u>CGTTTCCGCCATTCTTTGCTATGAGATAGGTCATAACTCCTGC</u> |
| L18xx_for | 1789365-1789394 | AGTGCGAACGTAGTTCAGTGGTAGAACACC |
| L18xx_rev | 1788500-1788521 | <u>CGTTTCCGCCATTCTTTGCTAGGAGGCAGAAGCTTCTGTAC</u> |
| LcpoA_R | 966892-966911 | cGAATTCCTCCCTGTCCTGCTACTTTC |
| LP1rev | 1788545-1788565 | cgcGGATCCAAAATTCTGTTCAAAACAAGC |
| Lp2for | 1729500-1729519 | AAGGTCGTTTTACCTGCACC |
| Lpfor | 1729129-1729148 | TAATTCAGCTGCATCTTTGG |
| LplcR_for | 1732223-1732252 | CCCAAACAATCATTATTGTAGCTAACTAGC |
| lrrjan | 1785359-1785386 | gcGGATCCCATCTTAGTTTCTCTCCTTATAAGGTAG |
| LTC11_for | 1787275-1787294 | TTAGCCCAAGCAGGATGTAG |
| LTC11_rev | 1786373-1786392 | <u>CGTTTCCGCCATTCTTTGCTACCCAGTCACTACAGTTAGG</u> |
| ma1 | 1784701-1784722 | cgcGGATCCGGTATTGTTCCATTCACTACCG |
| ma2 | 1784577-1784600 | taGGGCCCTACTATAACTTTAGGAGGGCTTAG |
| ma3 | 1784577-1784600 | cgcGGATCCTACTATAACTTTAGGAGGGCTTAG |
| mcs_fwd_Kontr | - | GCGACATTCACGATTACTTGG |
| No_f | 1786810-1786829 | AAGAGGTGTGGACATGTCTC |
| No_r | 1786690-1786709 | GAAGATTGCCACGACAGAC |
| norupa | 1784702-1784724 | GTATTGTTCCATTCACTACCGTC |
| norupa2 | 1784715-1784733 | CACTACCGTCAATTTTAGC |
| on_rev | 1784762-1784786 | tatctaCAGCTGTCATAACCAACCAGATTCTTTTGGC |
| onver3f | 1785003-1785025 | <u>ATAAGGAGAGAACTAAGATGACCTTGACACCGTCCCGAAGG</u> |
| onver3r | 1785359-1785382 | <u>TCGAGGACGGTGTGCAAGGTCATCTTAGTTTCTCTCCTTATAAG</u> |
| onver4f | 1784963-1784983 | <u>CTTATAAGGAGAGAACTAAGATGGAATTGATGGAAATGGTGATG</u> |
| onver4r | 1785359-1785382 | <u>ATCACCATTTCCATCAATTCATCTTAGTTTCTCTCCTTATAAG</u> |
| P1S | 1788426-1788472 | DIG(AminoC6)CATTGCAATAATCATTTTATTTCTCATCTCTTTCCCCCATTTTCAT |
| P2S | 1786855-1786901 | DIG(AminoC6)CCAAGATTGAAACCAATAATCAACCAGCATACTTGTTATCTTTGAT |
| pbp1af | 334877-334899 | CTATCCGAGAGTAAACTAGTTGC |
| pbp1ar | 334751-334773 | TCGATAGAAACGATTGCCTTAAC |
| pbp2bF | 1496482-1496500 | gcgGCATGCTGATAGTTGCGATATCTGG |
| pbp2bR | 1496366-1496388 | cgcGGATCCACAGAGATGCGTTTTTATTTATC |
| plcrBam | 1731537-1731558 | gcGGATCCTCAATCTGAATTTCTCTGCGAG |
| plcrxho | 1730843-1730862 | ggCTCGAGCCTCTACTTATTCTTGTAGG |
| Plic-1_f-SphI | 1151299-1151319 | gcgGCATGCGAGAAATGAAGGGCAGTAAGTC |
| Plic-1_r-Bam | 1151223-1151245 | gcgGGATCCTAGAGTCCTTCAGAATAATATAC |
| Plic-2_f-Sph | 1151164-1151193 | gcgGCATGCTACAGAATTCCTAGTCATTACTAGAAATGG |
| Plic-2_r-Bam | 1151057-1151088 | cgcGGATCCCTTATCTCTCTATTATACCACAATCTAGTCC |
| prr11 | 1786009-1786028 | gcGGATCCTTTGGCTTGGTTCGGATTCCG |
| Ptes11-1_f-Sph | 1788564-1788593 | gcgGCATGCGATTGTGTTTTATTGTATAGTGTATCTTGC |
| Ptes11-1_r-Bam | 1788467-1788502 | cgcGGATCCTTTCACTACTACAATTATAGTCTTTTAAATCAGAGG |
| Ptes11-2_f-up-Sph | 1786983-1787012 | gcgGCATGCGATGATGTCAACAGCTATCTTCTCATTCCC |
| Ptes11-2_f-up-Bam | 1786896-1786927 | cgcGGATCCTTTGATAGATAATATTCTACCATATTTACAGG |
| R15klon_for | 1540750-1540771 | gcCTCGAGCATAGAACAAAAGAGACCAGGC |
| R15klon_rev | 1541458-1541479 | ttGGATCCTCCTAGGATCTATGGTTTCTCG |
| R15xx_rev | 1541450-1541479 | TCCTAGGATCTATGGTTTCTCGTCCCTGAGG |
| R17xx_for | 1743277-1743296 | <u>ACAATAAACCCCTTGCATATGGTAATCTGTGTTGAAGGCTC</u> |
| R17xx_rev | 1744047-1744076 | CAGAAGAGTTGATTGACCAGCACTATCAGG |
| R18_rev2 | 1783574-1783593 | ACTCCTGCTGCCAACTCATC |
| R18_rev3 | 1783724-1783743 | TCCTTGTAGCCAACTAAACG |
| R18xx_rev | 1782592-1782621 | TACGACTAATGTCAGCACCTTCCAGACTCC |
| RACE_PCR_5' | - | GATATGCGCGAATTCCTG |
| radAf | 25685-25707 | AAATGAGAAAGATTGATTTTTGGC |
| radAr | 25800-25820 | CAACGTCCAGATATTTAGGG |

2.Material

| | | |
|----------------|-----------------|---|
| RepoA_F | 967597-967616 | gc CTCGAG GTTGCCTAGTTACAATGAGC |
| RNA1 | 1786757-1786781 | cgc GGATCC GAAGGCAATACTTCTACTATCAGC |
| RNA2 | 1786483-1786510 | ta GGGCCC GTTTTGTTGGTTTGACCATTTACCTTC |
| RNA3 | 1786483-1786510 | cgc GGATCC GTTTTGTTGGTTTGACCATTTACCTTC |
| RP1for | 1788431-1788457 | ta GGGCCC AAGAGATGAGAAATAAAATGATTATTG |
| RP1for2 | 1788430-1788457 | gc CTCGAGAGGAGG AAGAGATGAGAAATAAAATGATTATTGC |
| Rp2rev | 1732781-1732805 | GAATATAGTCTTATCTGTTCCCTCGG |
| RplcR_rev | 1730043-1730069 | GTTATCTGACAAAACAAGAACAGCTCC |
| Rprev | 1733112-1733131 | ATTTGTACCGTTGCTGCTCC |
| rr_f | 1786464-1786483 | gc GGATCC CAAGGTCATAAGGAGAATGC |
| rr_r | 1784117-1784136 | gc GGATCC ATATTTGGAATCACGACACC |
| rr11_rev | 1785307-1785326 | ATTGACACATGGCATCTCGC |
| rr11_rev2 | 1785336-1785355 | TGATCTTCTGCGACTAATAC |
| rrkom | 1785337-1785361 | gc GGATCC TAAGTAGTTAAGGAGGCAAA TATGAAAGTATTAGTCGCAGAAGATC |
| rrleft_r | 1785359-1785386 | g CTCGAG CATCTTAGTTTCTCTCCTTATAAGGTAG |
| rroff_f | 1785052-1785076 | <u>CTTATAAGGAGAGAACTAAGATGGGAGTGGATGCTTATGTATTAAGG</u> |
| rroff_r | 1785359-1785382 | <u>CCTTTAATACATAAGCATCCACTCCCATCTTAGTTTCTCTCCTTATAAG</u> |
| rron_f | 1784978-1785001 | <u>TAAGGAGAGAACTAAGATGCGCAAGGAGTATTCGCCTGAATTG</u> |
| rron_r | 1785359-1785382 | <u>TTCAGGCGAATACTCCTTGCGCATCTTAGTTTCTCTCCTTATAAG</u> |
| rronright_f | 1784974-1785001 | a CTCGAG CGCAAGGAGTATTCGCCTGAATTGATGG |
| rrjan | 1784978-1784998 | ta GGGCCC AAGGAGTATTCGCCTGAATTG |
| RT18f | 1788336-1788355 | CTTGGAAGGTCCTTGCTGGC |
| RT18r | 1788214-1788233 | CCATACCAAGAGTGACAGGC |
| RTgyrAf | 1097056-1097077 | TATCACAGCAGTACGTGATGAG |
| RTgyrAr | 1096929-1096950 | GGATAGCGAGCATATTGAAACC |
| RTP2f | 1786756-1786781 | GCTGATAGTAGGAAGTATTGCCTTCG |
| RTP2r | 1786615-1786636 | CTACTACTTGATCCAGTCTGG |
| rup1 | 1784571-1784592 | AGGAAACTAAGCCCTCCTAAAG |
| rup11_f | 1784814-1784834 | gcg GCATGCT ATTCTTTCAAACCTGGATGC |
| rup11_r | 1784682-1784707 | cgc GGATCC CTAGTTTCAATCTACTATAGGTATTG |
| rup2 | 1784615-1784638 | CAGGATAAATCGATCAGGACAGTC |
| rup3 | 1784683-1784711 | TAGTTTCAATCTACTATAGGTATTGTTCC |
| rupb1_1 | 1788817-1788845 | cgc GGATCC TTATACGTTGAACAAAACCTTCTATTGC |
| rupb1_2 | 1788680-1788709 | ta GGGCCC TATGTGTTGTCTGATAAAAATTTCTACTC |
| spBXho | - | gg CTCGAG CATATGCAAGGGTTTATTG |
| spc_for | - | ATCGATTTTCGTTCTGTAATA |
| spc_rev | - | CCAATTAGAATGAATATTTCC |
| spPBam | - | gc GGATCC ATCGATTTTCGTTCTGTAATAC |
| test_for | 1732180-1732200 | CACTAATGCATACTTTCGAGC |
| test_rev | 1730106-1730125 | CTTCACCGACTTCTTACTGG |
| tetMklon_for | - | atgta CATATG CCAAGTAATCGTGAATGTCG |
| tetMklon_for2 | - | gcg CTGCAG GCCAAGTAATCGTGAATGTCG |
| tetMklon_rev | - | cg CTCGAG GCTAGCTTTACAGACAAAGAACTATCC |
| tetM_rev_Kontr | - | TATCTTTCACGGGCATATAACGATGC |
| tRNA | 1790496-1790515 | ATCGCTCAACGGATAAAAAGC |
| trpDF | 1608885-1608903 | gcg GCATGCA ATTTTATCGAGGAGGTTG |
| trpDR | 1608751-1608770 | cgc GGATCC AGAGAAGCAATCTGCGCTTC |
| v2 | 1785025-1785076 | gc GGATCC TAAGTAGTTAAGGAGGCAAA TATGGGAGTGGATGCTTATGTATTAAGG |
| v3 | 1785007-1785025 | gc GGATCC TAAGTAGTTAAGGAGGCAAA TATGACCTTGCACACCGTCTCCTCG |
| v4 | 1784963-1784983 | gc GGATCC TAAGTAGTTAAGGAGGCAAA TATGGAATTGATGGAAATGGTGATG |
| veg5 | - | CGATGCATGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC |
| vegM | - | CGCGGATCCAGTTTGCAAATTATATCATATTAATAAGACGTTGTC |
| vegMr | - | gc CTCGAG AGTTTGCAAATTATATCATATTAATAAGACG |
| vegWf | - | cgc GGATCC TTGGACTCCTGTTGATAGATCCAG |

| | | |
|---------|-----------------|-----------------------------------|
| vegWr | - | gcCTCGAGGATCCAGCTTGCAAATTATATCAAG |
| xfor | 1441751-1441777 | TTTCCTCGATTCTCAGATTATTTTTTC |
| xrev | 1441872-1441890 | GCGACGTTGACGTGGTTTG |
| yvf_for | - | gcgGCATGCATTGGAAGATGCAGGAGGAG |
| yvf_rev | - | cgcGGATCCGAGCACCTCCTGATCGTTTAC |
| z_f | 1787871-1787890 | cgcGGATCCTACCAGTGACGAGTTCTAAG |
| z_r | 1787791-1787813 | taGGGCCCAAGAAAGCAATCAACTCTTTAAC |

¹⁾ Die Positionen beziehen sich auf die Genomsequenz von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ Rote Sequenzen stellen durch die Primer angefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme dar, klein gedruckte Sequenzen dienen der Erhöhung der Effizienz von Restriktionsendonukleasen und unterstrichene Sequenzen stellen Linkersequenzen zur überlappenden PCR dar. Grüne Sequenzen stellen zur Mutagenese veränderte Nukleotide dar.

2.4 Nährmedien

2.4.1 CpH8-Medium (C-Medium) zur Kultur von *Streptococcus pneumoniae*

In allen in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden die verschiedenen Stämme von *Streptococcus pneumoniae* in CpH8-Medium (Lacks & Hotchkiss, 1960) angezogen. Die einzelnen Komponenten dieses Mediums wurden separat hergestellt und erst bei Bedarf zusammenpipettiert. Die Lagerung der Einzelkomponenten erfolgte bei 4°C unter Lichtausschluß. Tabelle 2.6 zeigt die Zusammensetzung des CpH8-Mediums, Tabelle 2.7 die der Einzelkomponenten. Bei Bedarf wurden dem Medium entsprechende Antibiotika und Zusätze zugegeben (2.4.4).

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des CpH8-Mediums

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

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der Einzelkomponenten

| Komponente | Zusatz | Menge |
|------------|---|------------|
| PreC | Na-Acetat, wasserfrei | 1,2 g |
| | Casaminoacids | 5 g |
| | L-Tryptophan | 5 mg |
| | L-Cystein | 50 mg |
| | H ₂ O | ad 1000 ml |
| | pH 7,5 einstellen, autoklavieren | |
| Supplement | 3in1-Salze | 60 ml |
| | Glucose 20 % (w/v) | 120 ml |
| | Saccharose 50 % (w/v) | 6 ml |
| | Adenosin [2 mg/ml] | 120 ml |
| | Uridin [2 mg/ml] | 120 ml |
| | Komponenten einzeln autoklavieren, steril zusammenpipettieren | |
| Adams III | Adams I | 160 ml |
| | Adams II | 40 ml |
| | Asparagin | 2 g |
| | Cholinchlorid | 0,2 g |
| | CaCl ₂ [0,1 M] | 1,6 ml |

| | | |
|--------------------|--|------------|
| | H ₂ O | ad 1000 ml |
| Phosphatpuffer pH8 | Sterilfiltrieren und unter Lichtausschluß lagern | |
| | KH ₂ PO ₄ [1 M] | 53 ml |
| | K ₂ HPO ₄ [1 M] | 947 ml |
| 3in1-Salze | Autoklavieren | |
| | MgCl ₂ x6H ₂ O | 100 g |
| | CaCl ₂ , wasserfrei | 0,5 g |
| | MnSO ₄ x4H ₂ O [0,1 M] | 0,2 ml |
| | H ₂ O | ad 1000 ml |
| Adams I | Autoklavieren | |
| | Biotin | 0,5 g |
| | Nicotinsäure | 150 mg |
| | Pyridoxin-HCl | 175 mg |
| | Ca-Pantothenat | 600 mg |
| | Thiamin-HCl | 160 mg |
| | Riboflavin | 70 mg |
| Adams II | H ₂ O | ad 1000 ml |
| | Sterilfiltrieren und unter Lichtausschluß lagern | |
| | FeSO ₄ x7H ₂ O | 500 mg |
| | CuSO ₄ x5H ₂ O | 500 mg |
| | ZnSO ₄ x7H ₂ O | 500 mg |
| | MnCl ₂ x4H ₂ O | 200 mg |
| | HCl _{konz.} | 10 ml |
| | H ₂ O | ad 1000 ml |
| | Sterilfiltrieren und unter Lichtausschluß lagern | |

2.4.2 D-Blutagar

Als Festmedium zur Kultur von *Streptococcus pneumoniae* wurde D-Blutagar verwendet. Hierzu wurde D-Agar (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.8) autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 48°C mit defibriniertem Schafsblut (Oxoid) zu einer Endkonzentration von 3% (v/v) versetzt. Nach Zugabe eventueller Zusätze (2.4.4) wurde gemischt und in sterile Petrischalen gegossen.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung des D-Blutagars

| Komponente | Menge |
|------------------|------------|
| Glucose | 1 g |
| Bactopepton | 10 g |
| Neopepton | 5 g |
| Hefeextrakt | 1,25 g |
| NaCl | 5 g |
| Tris | 1,25 g |
| Agar | 15 g |
| H ₂ O | ad 1000 ml |

2.4.3 Nährmedium zur Kultur von *E. coli* und *Bacillus subtilis*

Zur Kultur von *E. coli* oder *B. subtilis* wurde Lauria-Bertani- (LB) Medium eingesetzt (Sambrook et al., 1989). Zur Herstellung von LB-Agar wurde das Medium mit 15g/l Agar versetzt. Bei Bedarf wurden entsprechende Antibiotika und sonstige Zusätze zugegeben (2.4.4).

Tabelle 2.9: Zusammensetzung des LB-Mediums

| Komponente | Menge |
|-------------|-------|
| Bactopepton | 10 g |

2. Material

| | |
|------------------|------------|
| NaCl | 5 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| H ₂ O | ad 1000 ml |

2.4.4 Zusätze zu den Nährmedien

Folgende, in Tabelle 2.10 zusammengefasste Zusätze wurden den Fest- und Flüssigmedien bei Bedarf zugegeben. Die Stammlösungen wurden nach ihrer Herstellung sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 2.10: Zusätze zu den Nährmedien

| Antibiotikum/Substanz | Lösungsmittel | Konzentration der Stammlösung | Endkonzentration |
|-----------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Piperacillin | H ₂ O | 10 µg/ml | variabel |
| Tetracyclin | 50 % EtOH | 3 mg/ml | 3 µg/ml |
| Ampicillin | H ₂ O | 20 mg/ml | 200 µg/ml |
| Spectinomycin | H ₂ O | 20 mg/ml | 80 µg/ml |
| Streptomycin | H ₂ O | 20 mg/ml | 200 µg/ml |
| Erythromycin | 90 % EtOH | 1 mg/ml | 2 µg/ml |
| Kanamycin | H ₂ O | 20 mg/ml | 200 µg/ml |
| IPTG | H ₂ O | 500 mM | 1 mM |
| Triton-X-100 | H ₂ O | 10 % (v/v) | variabel |

2.5 Allgemeine Puffer

Tabelle 2.11: Allgemein verwendete Puffer

| Lösung | Komponente | Konzentration |
|----------------------|----------------|---------------|
| 6 x DNA-Probenpuffer | Ficoll 400 | 15 % (w/v) |
| | Bromphenolblau | 0,25 % (w/v) |
| | Xylencyanol | 0,25 % (w/v) |
| 2 x SDS-Probenpuffer | Tris-Cl pH6,8 | 0,09 M |
| | Glycerin | 20 % (v/v) |
| | SDS | 0,02 % (w/v) |
| | Bromphenolblau | 0,02 % (w/v) |
| | Dithiothreitol | 0,1 M |
| 5 x SDS-Probenpuffer | Tris-Cl pH6,8 | 0,225 M |
| | Glycerin | 50 % (v/v) |
| | SDS | 5 % (w/v) |
| | Bromphenolblau | 0,05 % (w/v) |
| | Dithiothreitol | 0,25 M |
| Upper Tris | Tris-HCl pH6,8 | 0,5 M |
| | SDS | 0,4 % (w/v) |
| Lower Tris | Tris-HCl pH8,8 | 1,5 M |
| | SDS | 0,4 % (w/v) |
| Laemmli-Puffer | Tris | 25 mM |
| | Glycin | 200 mM |
| | SDS | 0,1 % (w/v) |
| TEE-Puffer (50 x) | EDTA | 0,1 M |
| | Essigsäure | 1 M |
| | Tris-HCl pH8,2 | 2 M |
| TBE-Puffer (5 x) | EDTA | 10 mM |
| | Borsäure | 445 mM |
| | Tris | 445 mM |
| TE-Puffer | Tris-HCl pH8 | 10 mM |
| | EDTA | 1 mM |
| SSC-Puffer (20 x) | NaCl | 3 M |

2.6 Bezugsquellen

2.6.1 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität p.A. von folgenden Firmen bezogen: Applichem, Darmstadt; Fluka AG, Neu-Ulm; Merck AG, Darmstadt; C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe; Serva GmbH & Co., Heidelberg; Sigma GmbH, Deideshofen.

2.6.2 Enzyme

Die eingesetzten Enzyme und Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen bezogen: Eurogentec, Köln; Roche, Basel; New England Biolabs (NEB), Schwalbach; Invitrogen, Karlsruhe; MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; Stratagene, Heidelberg.

2.7 Computerprogramme und Datenbanken

Computerprogramme

CloneManager 7, Scientific and Educational Software; ClustalX (Thompson et al., 1997); Blast (Altschul et al., 1990); Cap3 Assembler, IFOM; Microsoft Office 2000; ScanArray Express 2.1, PerkinElmer; Origin 5.0, Microcal Software Inc.;

Datenbanken und Server

| | |
|-----------------------------------|--|
| BLAST | www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/ |
| PubMed | www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/ |
| Services in computational biology | www.nbc3.biologie.uni-kl.de/ |
| The StreptoPneumoList Server | www.genolist.pasteur.fr/StreptoPneumoList/index.html |
| Transport Classification Database | www.tcdb.org |
| SMART | www.smart.embl-heidelberg.de |
| TM Predict | www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html |
| TMHMM Server v.2 | www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ |
| ABCdb | www.abcdb-biotoul.fr |
| MultAlin | www.bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/ |

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Dokumentation des Bakterienwachstums

Nephelometrie

Da bei Pneumokokken eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Kettenbildung auftreten kann, wurde die Nephelometrie zur Messung des Wachstums der Photometrie vorgezogen. Das Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* wurde durch Messung des im rechten Winkel zur Lichtquelle ausfallenden Streulichtes einer Flüssigkultur in Reagenzröhrchen aus Glas in einem Nephelometer (Digital Unigalvo DS29, Diffusion Systems Ltd., England) verfolgt. Hierbei wurde das unbewachsene Medium inklusive eventueller Zusätze (2.4.4) als Nullwert und ein Glaseinsatz, welcher einer Zelldichte von Nephelo=103,9 entsprach, als Referenz eingesetzt. Durch eine halblogarithmische Darstellung konnten somit durch das Anlegen einer Regressionsgeraden im linearen Bereich der Wachstumskurve sowohl Wachstumsrate μ , als auch die Generationszeit g berechnet werden. Zum Anlegen der Regressionsgeraden wurde das Computerprogramm Microcal Origin 5.0 verwendet. Die Wachstumsrate μ wurde hierbei berechnet aus

$$\mu = (\ln N_y - \ln N_x) / (t_y - t_x) \quad [\text{min}^{-1}]$$

mit $\ln N_y$: Zelldichte zum Zeitpunkt t_y in Nephelo-Einheiten [N]
 $\ln N_x$: Zelldichte zum Zeitpunkt t_x in Nephelo-Einheiten [N]
 t_y, t_x : Zeitpunkte [min]

und die Generationszeit g aus

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

Messung der optischen Dichte

Das Wachstum von *E. coli* oder *B. subtilis* wurde durch Bestimmung der optischen Dichte der Bakterienkulturen in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Hierbei wurden Küvetten mit einer Weglänge von 1 cm verwendet. Als Referenz dienten die jeweiligen unbewachsenen Medien inklusive Zusätze (2.4.4). Durch eine halblogarithmische Darstellung wurde das Wachstum dokumentiert.

Die Dokumentation der Lyse von *Streptococcus pneumoniae* wurde nicht durch Messung der Zelldichte mittels Nephelometrie, sondern durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm in einem Photometer durchgeführt. In Vorexperimenten hatte sich gezeigt, daß die Dokumentation der Lyse mittels Nephelometrie nur bis zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Lyse sinnvoll war, da es vermutlich aufgrund der Ansammlung von Zellfragmenten zu keinem weiteren Abfall des gemessenen Nephelo-Wertes mehr kam, obwohl die Zellsuspension augenscheinlich weiter aufklarte. Dieser Effekt zeigte sich hingegen nicht im Fall der Messung mittels Photometrie. Da die zu untersuchenden Deletionsmutanten zu keiner Kettenbildung neigten, konnte die Messung in einem Photometer durchgeführt werden.

3.1.2 Anzuchtbedingungen

Zur Erstellung von Wachstumskurven oder zur Transformation von *Streptococcus pneumoniae* wurden als Vorkultur 6 ml frisch hergestelltes CpH8-Medium aus einer Glycerinkultur des entsprechenden Stammes am Abend des Vortages mit einer Impföse angeimpft und in ein mit Eis gefülltes Heizwasserbad gestellt. Das Wasserbad war mit einer Zeitschaltuhr versehen, welche in den frühen Morgenstunden das auf 37°C voreingestellte Wasserbad in Betrieb setzte. Nach dem Erreichen der Log-Phase wurden 10 ml frisches CpH8-Medium mit eventuellen Zusätzen (2.4.4) 1:20 aus der Vorkultur angeimpft. Diese Prozedur sollte sicherstellen, daß in jedem Experiment Zellen eingesetzt wurden, welche sich in einem annähernd vergleichbaren physiologischen Zustand befanden.

3.1.3 Stammkonservierung

Zur Aufbewahrung über längere Zeiträume wurden von den jeweiligen Stämmen Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden in sterile, verschließbare Plastikröhrchen (Cryo-Tubes) 1,2 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur mit einer Zelldichte zwischen $N=60$ bis $N=90$, sowie 0,2 ml steriles Glycerin (96 %) gegeben, vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.4 Mikroskopie

Um eventuelle morphologische Veränderungen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme von *Streptococcus pneumoniae* festzustellen, wurde eine mikroskopische Analyse vorgenommen. Hierzu wurden 10 µl einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur auf ein Objektträger gegeben, mit einem Deckglas überschichtet und zur Minimierung der Flüssigkeit zwischen Objektträger und Deckglas leicht angedrückt. Durch ein 100 x-Objektiv (Plan Apo, Nikon Eclipse E600; 2.4.5), unter Verwendung von Immersionsöl, wurde die Zellmorphologie begutachtet und mit einer Kamera dokumentiert (CCD-1300B, VDS Vosskühler GmbH; 2.4.5).

3.1.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) gibt die niedrigste Konzentration des betreffenden Antibiotikums an, auf welcher das Bakterienwachstum gehemmt wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die MHK-Werte für das β -Lactam Piperacillin, wie im Folgenden beschrieben, bestimmt. Piperacillin wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit einmalig als wässrige Stammlösung mit einer Konzentration von 10µg/ml in ausreichend großer Menge frisch hergestellt und in Aliquots zu 1ml bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der MHK-Werte wurde auf D-Blutagarplatten mit Piperacillin-Konzentrationen von 0 µg/ml bis 0,3 µg/ml in Schritten zu 0,01 µg/ml durchgeführt. Da es sich hierbei um vergleichsweise geringe Konzentrationsunterschiede handelte, wurde zur Minimierung von Fehlern, welche die Ergebnisse beeinflussen auf folgende Vorgehensweise geachtet:

- Zur Herstellung der D-Blutagarplatten wurde eine genügend große Menge D-Flüssigmedium hergestellt und zu je 47,5 ml in 100 ml Schraubdeckel-Glasflaschen (Schott), vermischt mit je 0,5 g Agar, aliquotiert.

- Die so hergestellten Aliquots wurden alle zusammen im gleichen Autoklaven für 20 min autoklaviert und im Anschluß bei 48°C im Heizwasserbad für 20 min temperiert.
- Zu je 47,5 ml geschmolzenem D-Agar wurden 1,5 ml defibriniertes Schafsblut, sowie die entsprechende Menge der Piperacillin-Stammlösung (adjustiert auf 1 ml mit sterilem H₂O) pipettiert, vermischt und luftblasenfrei in sterile Petrischalen (12x12 cm) gegossen.
- Von Außen wurden die so hergestellten D-Blutagarplatten in 4x4 cm große Quadrate unterteilt.
- Die zu testenden Stämme wurden bei 37°C in CpH8-Medium bis zu einer Zelldichte von N=30, was ungefähr $1,5 \cdot 10^8$ cfu/ml entsprach, herangezogen, 1:1000 in 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt und je 30 µl der 1:1000-Verdünnung in die vorgesehenen Quadrate pipettiert. Von jedem Stamm befanden sich somit rein rechnerisch 3000 cfu auf 1 cm².
- Die D-Blutagarplatten wurden für 5 min unter einer Cleanbench (Uniflow UVUB1200, Biohazard; 2.4.5) getrocknet, sodaß keine Kulturflüssigkeit auf der Plattenoberfläche mehr zu erkennen war.
- Die Inkubation erfolgte für die Dauer von 24 h bei 37°C, wobei nach 24 h die MHK-Werte bestimmt wurden und nach weiteren 24 h auf etwaige Abweichungen kontrolliert wurde.

3.1.6 Transformation von *Streptococcus pneumoniae*

Zur Transformation von *Streptococcus pneumoniae* wurde eine, wie in 3.1.2 beschriebene Vorkultur des zu transformierenden Stammes angesetzt. Nach Eintritt dieser Vorkultur in die Log-Phase wurden 10 ml CpH8-Medium, versetzt mit 9 µl/ml 8 % BSA, 1:20 aus der Vorkultur beimpft und das Wachstum gemäß 3.1.1 verfolgt. Bei Erreichen einer Zelldichte von N=20 wurden 280 µl der bewachsenen Kultur in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 20 µl der zu transformierenden DNA versetzt, gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine phänotypische Expression des übertragenen Resistenzmarkers für 2 h bei 37°C. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf D-Blutagarplatten mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C über Nacht. Die Transformationsansätze wurden hierbei jeweils zu je 100 µl bis zu einer Verdünnung von 10^{-3} auf Platten mit Antibiotikum und bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} auf Platten ohne Antibiotikum ausplattiert. Hierdurch konnte die Transformationseffizienz als prozentualer Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl berechnet werden.

Die Transformation von Mutanten, welche eine sehr geringe natürliche Kompetenz aufwiesen, wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt, jedoch wurde dem Transformationsansatz zusätzlich der synthetische Kompetenzfaktor CSP (competence stimulating peptide, Håvarstein et al., 1995) zu einer Endkonzentration von 0,05ng/µl zugegeben.

3.1.7 Kompetenz-Testung von *Streptococcus pneumoniae*

Im Zuge der phänotypischen Charakterisierung von Mutanten und der in dieser Arbeit hergestellten Derivate von *Streptococcus pneumoniae* wurde deren natürliche genetische Kompetenz von der frühen exponentiellen Wachstumsphase bis zum Eintritt in die stationäre Phase analysiert.

Hierzu wurde eine, wie in 3.1.2 beschriebene Vorkultur des zu transformierenden Stammes angesetzt. Nach Eintritt dieser Vorkultur in die Log-Phase wurden 10ml CpH8-Medium, versetzt mit 9 µl/ml 8 % BSA, 1:20 aus der Vorkultur beimpft und das Wachstum gemäß 3.1.1 verfolgt. Ab einer Zelldichte von N=10 wurden entweder bei definierten Zelldichten

oder alle 30min Aliquots von 180 μ l entnommen, mit sterilem Glycerin zu einer Endkonzentration von 10% (v/v) versetzt, gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so erhaltenen Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Alle Aliquots wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, und je 30 μ l in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben, in welchen 270 μ l CpH8-Medium (9 μ l/ml 8 % BSA) und die zur Transformation eingesetzte DNA bereits vorgelegt waren. Die Transformation wurde nun wie in 3.1.6 beschrieben bei 30°C für 30 min durchgeführt und wiederum für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte entsprechend 3.1.6. Nach 24 h wurde die Zahl der Transformanten, sowie die Lebendkeimzahl zu jedem Transformationsansatz bestimmt und der prozentuale Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl als Funktion der Zelldichten, an denen die zur Transformation eingesetzten Aliquots genommen wurden, aufgetragen. Im so erstellten Graph konnte die genetische Kompetenz in Abhängigkeit von der Zelldichte dargestellt werden.

3.1.8 Transformation von *E. coli*

(Sambrook et al., 1989)

Herstellung kompetenter Zellen

Von den zu transformierenden *E. coli*-Stämmen wurden Übernachtskulturen in 5 ml LB-Medium angelegt, welche bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert wurden. Die 5 ml einer bewachsenen Übernachtskultur wurden zu 200 ml frischem, sterilem LB-Medium gegeben (2 L Erlenmeyerkolben mit Schikane) und schüttelnd bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden sogleich für 5min auf Eiswasser gestellt und im Anschluß in sterilen, vorgekühlten JA10-Bechern für 10 min bei 5000 rpm (4400xg) und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 40 ml eiskaltem TFBII-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde danach in sterilen, vorgekühlten JA20-Bechern für 10 min bei 6000 rpm (4300xg) und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4ml eiskaltem TFBII-Puffer resuspendiert und 100 μ l-Aliquots in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so aliquotierten kompetenten *E. coli* wurden bis zur Transformation bei -80°C aufbewahrt.

Transformation durch Hitzeschock

Zur Transformation der kompetenten *E. coli*-Stämme wurde ein Aliquot von 100 μ l auf Eis aufgetaut, 1 bis 10 μ l DNA zugegeben, kurz gemischt und für weitere 20 min auf Eis gehalten. Der Ansatz wurde für 90 s bei 42°C inkubiert und sofort für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml Psi-Broth und Überführen in ein kleines Reagenzglas wurde der Ansatz für 1 h zur phänotypischen Expression bei 37°C schüttelnd inkubiert. 50 μ l des Ansatzes wurden zur Herstellung einer Verdünnungsreihe in 0,9 % NaCl-Lösung (1:100-Schritte) verwendet und je 100 μ l bis zur 10^{-3} -Verdünnung auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Tabelle 3.1: Zur Transformation von *E. coli* eingesetzte Lösungen

| Puffer/Lösung | Komponente | Konzentration |
|---------------|-------------------|---------------|
| Psi-Broth | LB-Medium | |
| | MgSO ₄ | 4 mM |
| | KCl | 10 mM |
| TFBII | RbCl | 100 mM |
| | MnCl ₂ | 50 mM |
| | K-Acetat | 30 mM |
| | CaCl ₂ | 10 mM |
| | Glycerin | 15 % (v/v) |

| | | |
|-------|-----------------------|------------|
| | pH 5,8 mit Essigsäure | |
| | Sterilfiltrieren | |
| TFBII | MOPS | 10 mM |
| | RbCl | 10 mM |
| | CaCl ₂ | 75 mM |
| | Glycerin | 15 % (v/v) |
| | pH 8 mit NaOH | |
| | Autoklavieren | |

3.2 Isolierung und Reinigung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

3.2.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae*

(modifiziert nach Marmur, 1961)

Zur Präparation von chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae* wurden zunächst 10 ml einer bewachsenen Kultur in CpH8-Medium bei einer Zelldichte von N=70-90 in JA20-Becher überführt und für 2 min auf Eis gestellt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm (17600xg) und 4°C für 10 min. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml kalter 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert, in ein 2 ml ERG überführt und erneut bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge und 4°C für 1 min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Bakterienpellet 30 min bei -70°C eingefroren. Das Pellet wurde auf Eis aufgetaut, mit 360 µl 1xTE-Puffer (37°C) resuspendiert und mit 40 µl RNase-Lösung [10 mg/ml] vermischt. Sofort wurden 400 µl 2 % SDS-Lösung (37°C) zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Danach wurde bis zur vollständigen Lyse bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Lyse wurden 200 µl Proteinase K-Lösung [20mg/ml] zugegeben, gemischt und für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine erste Phenolisierung durch Zugabe von 1 ml TE-gesättigtem Phenol und 30 min Inkubation auf einem Rollbrett bei RT. Wässrige- und organische Phase wurden danach durch Zentrifugation bei 14000 rpm und RT für 5 min voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und erneut mit 1 ml TE-gesättigtem Phenol versetzt und wie zuvor auf einem Rollbrett inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (14000 rpm, RT, 5 min) wurde die wässrige Oberphase abgenommen und mit 1 ml Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) für 5 min bei RT auf einem Eppendorf-Schüttler gerüttelt. Durch eine Zentrifugation (14000 rpm, RT, 5 min) wurden beide Phasen wieder voneinander getrennt und die Oberphase mit 1 ml Isopropanol durch Invertieren gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (14000 rpm, RT, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet zweimal mit 400 µl 100 % EtOH gewaschen. Das Pellet wurde für 30 min bei 50°C getrocknet und in 100 µl 1 x TE für 1 h bei 37°C gelöst. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurden im Anschluß auf einem 0,8 % Agarosegel durchgeführt (3.2.8; 3.4). Die so isolierte chromosomale DNA wurde bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 3.2: Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae* eingesetzte Lösungen

| Lösung | Komponente | Konzentration |
|--------------|-------------------------------------|---------------------|
| RNase-Lösung | RNase | 10 mg/ml |
| | NaCl | 0,15 M |
| | Na ₃ -Citrat | 0,015 M |
| | 15 min bei 100°C Bei RT Abkühlen | |
| Proteinase K | Proteinase K (Roth) | 20 mg/ml in Wasser |
| 2 % SDS | SDS | 2 % (w/v) in Wasser |

3.2.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *Bacillus subtilis*

Chromosomale DNA aus *B. subtilis* wurde aus einer 25 ml Übernachtskultur, welche bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde, isoliert. Die Kultur besaß am Morgen eine OD₆₀₀ von 1-2. Die Zellen wurden in einem JA20-Becher für 10 min bei 10000 rpm (12100xg) und RT pelletiert, mit 10 ml Lysepuffer gewaschen und in 4 ml Lysepuffer (inklusive 10 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 ml 20 % Na-Laurylsarcosinat wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei 37°C inkubiert. Phenolisiert wurde durch Zugabe von 4 ml TE-gesättigtem Phenol und Inkubation für 30 min bei RT auf dem Rollbrett. Im Anschluß wurde für 10 min bei 12000 rpm (17600xg) und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in einem neuen sterilen JA20-Becher mit 4 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) für 20 min auf einem Rollbrett bei RT inkubiert. Nach der Pelletierung bei 8000 rpm (7600xg) und RT für 10 min wurde die wässrige Phase mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Na-Acetat (pH5,2) und 2,5 Volumen 100 % EtOH (0°C) vermischt und erneut mit 12000 rpm (17600xg) bei 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 8 ml 70 % Ethanol gewaschen, der Überstand verworfen und bei RT für mindestens 30 min getrocknet. Die DNA wurde in 1 ml 1 x SSC für 24 h bei 4°C gelöst. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurden im Anschluß auf einem 0,8 % Agarosegel durchgeführt (3.2.8; 3.4). Die so isolierte chromosomale DNA wurde bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 3.3: Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *Bacillus subtilis* eingesetzte Lösungen

| Lösung | Komponente | Konzentration |
|-------------------------|---|----------------------|
| Lysepuffer | 0,5 M EDTA pH7,5 | 50 mM |
| 3 M Na-Acetat pH 5,2 | Na-Acetat pH 5,2, eingestellt mit Essigsäure | 3 M |
| 20 % N-Laurylsarcosinat | N-Laurylsarcosinat | 20 % (w/v) in Wasser |

3.2.3 Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli*

(nach Birnboim & Doly, 1979)

E. coli-Stämme, aus denen Plasmide isoliert werden sollten, wurden in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. 1,5 ml der ÜK wurden bei 14000 rpm und RT für 2 min zentrifugiert, das Pellet im Anschluß für mindestens 15 min bei -20°C eingefroren. Zum Pellet wurden 100 µl GTE-Puffer zugegeben, gevortext und für 5 min bei RT gelöst. Die Zellsuspension wurde zur Lyse der Bakterien mit 200 µl Triton-X-100/NaOH vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Zum Lysat wurden 150 µl eiskaltes 3 M Na-Acetat gegeben, gemischt und für 10 min im Eiswasser inkubiert. Im Anschluß wurde der Ansatz für 10 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand danach in ein neues 1,5 ml ERG überführt. Zum Überstand wurden 500 µl Isopropanol gegeben, gemischt und für mindestens 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter 10 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und RT wurde das Pellet in 250 µl 70 % EtOH gewaschen, bei 60°C im Trockenschrank getrocknet und in 30-50 µl 1 x TE-Puffer gelöst. Die so erhaltenen Plasmid-Präparate konnten direkt zur Analyse mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.8; 3.4) eingesetzt werden. Vor der weiteren Verwendung wurden die Plasmid-Präparate jedoch einer Phenolisierung (3.2.5) und einer Ethanolpräzipitation (3.2.6) unterzogen.

Tabelle 3.4: Zur Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* eingesetzte Lösungen

| Lösung | Komponente | Konzentration |
|--------|-------------------------|----------------|
| GTE | Glucose Tri-HCl pH 8 | 50 mM 50 mM |

| | | |
|---------------|------------------------------------|-----------|
| | EDTA | 10 mM |
| NaOH/Triton | NaOH | 0,2 N |
| | Triton-X-100 | 1 % (v/v) |
| 3 M Na-Acetat | Na-Acetat | 3 M |
| | pH 4,8, eingestellt mit Essigsäure | |

3.2.4 Plasmid-Maxi-Präparation aus *E. coli* (Nucleobond AX-Kit, Macherey-Nagel)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in großem Maßstab, wurde der Nucleobond® AX 100-Kit (Macherey-Nagel, Düren) eingesetzt. Hierbei erfolgte die Aufreinigung der nach der Methode von Birnboim & Doly (1979) freigesetzten Plasmid-DNA über eine Anionenaustauscher-Säule auf der Basis von Kieselgel.

Zwei 500ml Erlenmeyer-Kolben wurden mit je 100 ml LB-Medium befüllt, autoklaviert und mit entsprechendem Antibiotikum versetzt. Je 5 ml einer ÜK von *E. coli* wurden zupipettiert und die Kolben bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Isolation und Aufreinigung erfolgte entsprechend vorgegebener Anleitung (Macherey-Nagel). Zur Qualitätskontrolle des isolierten Plasmids und zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Teil für eine Agarosegelelektrophorese (3.2.8; 3.4) eingesetzt.

3.2.5 Phenolisierung von DNA

DNA-Lösungen wurden, wenn notwendig, zur Aufreinigung mittels Phenolisierung mit Millipore-Wasser auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt, mit 1 µl Glykogen und 200 µl TE-gesättigtem Phenol versetzt und 5 min bei RT auf einem Eppendorfschüttler gemischt. Die Ansätze wurden für 5 min bei RT und 14000 rpm zentrifugiert und die Oberphase (wäßrige Phase) in ein neues 1,5 ml ERG überführt. Die wäßrige Phase wurde mit 1 Volumen TE-gesättigtem Phenol versetzt und 5 min bei RT auf dem Eppendorfschüttler gemischt. Anschließend wurde für 5 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert und die Oberphase in ein neues 1,5 ml ERG überführt. Die Oberphase wurde mit 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt und für 5 min bei RT auf dem Eppendorfschüttler gemischt. Abschließend wurde für 5 min wie vorher zentrifugiert. Der Überstand konnte nun zur Ethanolpräzipitation (3.2.6) eingesetzt werden.

3.2.6 Ethanolpräzipitation

Die DNA-Lösungen wurden mit $\frac{1}{9}$ Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,2 gemischt. Hierdurch wurde die zur Präzipitation der DNA erforderliche Salzkonzentration (0,3 M) hergestellt. Zu den Lösungen wurden 2,3 Volumen 100 % EtOH (-20°C) gegeben und gemischt. Die Ansätze wurden nun für mindestens 1 h bei -80°C inkubiert und die DNA somit gefällt. Anschließend wurde für 15 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert, die Überstände verworfen und mit 70 % EtOH versetzt (es wurde nicht gemischt). Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 14000 rpm wurden die Überstände wiederum verworfen und die Pellets für 10 min bei 65°C im Trockenschrank getrocknet. Abschließend wurden die Pellets in 1xTE-Puffer oder Millipore-Wasser gelöst. Die so hergestellten DNA-Lösungen wurden zur Konzentrationsbestimmung (3.2.8) eingesetzt.

3.2.7 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Die PCR-Produkte von analytischen Ansätzen wurden direkt zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen (3.4). Die PCR-Produkte von präparativen PCR-Ansätzen mussten vor der weiteren Verwendung noch aufgereinigt werden, um verbliebene dNTP's, Primer und Salze zu reduzieren. Ein Teil wurde jedoch schon vorher zur Kontrolle auf einem Agarosegel analysiert (3.4). Zur Aufreinigung wurde das JET quick PCR Purification Kit 250 der Firma Genomed verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach vorgegebener Anleitung (Genomed).

3.2.8 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde entweder die Absorption der Lösungen bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einem Photometer gemessen (chromosomale DNA) oder bei einer Agarosegelelektrophorese die Bandenintensität mit den Bandenintensitäten von DNA-Lösungen bekannter Konzentration verglichen (bei Plasmid-DNA und PCR-Produkten).

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies) wurde die Absorption der enthaltenen DNA bei 260 nm, die Konzentration eventuell noch vorhandenen Proteins oder Phenols bei 280 nm bestimmt. Hierzu wurde je 1 μ l der zu untersuchenden DNA-Lösung eingesetzt. Die Absorption wurde aus geeignet verdünnten DNA-Lösungen bestimmt. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist hierbei ein Maß für die Reinheit der DNA-Proben und sollte für DNA zwischen 1,8 - 2,0 liegen (Ausubel et al., 1990). Die Konzentrationsbestimmung basierte auf folgenden Werten:

| | |
|-------|--|
| dsDNA | 1 $OD_{260} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ |
| ssDNA | 1 $OD_{260} = 33 \text{ ng}/\mu\text{l}$ |

Bei der Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegelelektrophorese dienten 3 Lösungen von pBR322 unterschiedlicher Konzentration als Konzentrationsstandard:

| | |
|----|----------------------------|
| 1: | 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ |
| 2: | 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ |
| 3: | 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ |

Von den 3 Standards wurden je 5 μ l auf das Agarosegel aufgetragen und die Intensitäten mit denen der Proben verglichen. Nach der Auftrennung und dem Anfärben mit Ethidiumbromid wurden die Bandenintensitäten der Standards und der Proben im UV-Licht eines Transilluminators verglichen und photodokumentiert (3.4).

3.3 Isolierung und Reinigung von Ribonukleinsäuren (RNA)

Generell wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Handhabung von RNA zusätzliche Maßnahmen, welche die unbeabsichtigte Degradation verhindern sollten durchgeführt. Um die Kontamination durch RNasen zu vermeiden, wurde stets mit Handschuhen gearbeitet. Alle Glaswaren und Gerätschaften, deren Oberflächen mit RNA in Kontakt kommen, wurden entweder mit RNaseZAP (Ambion) oder wenn möglich mit 3 % H_2O_2 zur Inaktivierung der RNasen vorbehandelt. Eingesetzte Puffer und Lösungen wurden entweder mit DEPC-behandeltem Wasser (Ambion) angesetzt und anschließend autoklaviert oder es wurde hierzu doppelt autoklaviertes Millipore-Wasser verwendet, welches zuvor durch Inkubation mit

einem Aliquot bereits isolierter Gesamt-RNA und anschließender Begutachtung der RNA durch eine Agarosegel-Elektrophorese (3.3.3) auf RNase-Aktivität überprüft wurde. Glaspipetten wurden für 12 h bei 200°C gebacken und für automatische Pipetten wurden Spitzen mit Filter (Filtertips, Gbo) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden nach Möglichkeit zügig auf Eis durchgeführt. Die Lagerung isolierter, aufgereinigter RNA erfolgte aliquotiert bei -80°C.

3.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *Streptococcus pneumoniae* (nach Maes & Messens, 1992)

Da die zu isolierende RNA meist in größeren Mengen benötigt wurde, wurde die Präparation von Gesamt-RNA nach der Hot Phenol-Methode durchgeführt. Hierdurch konnten RNA-Mengen von bis zu 500 µg aus 100 ml bewachsener Kultur mit einer Zelldichte von N=40 gewonnen werden.

Zellkultur und Ernte

150 ml CpH8-Medium wurden in 250 ml Schraubdeckelflaschen (Schott) auf 37°C vorgewärmt und 1:40 aus einer Übernachtskultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einem Heizwasserbad. Zur Dokumentation des Wachstums wurden zu Beginn alle 60 min, ab Eintritt in die exponentielle Phase alle 20-30 min 6 ml Kultur entnommen und in Reagenzgläsern in einem Nephelometer die Zelldichte gemessen. Bei Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden 100 ml Kultur in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen geteilt und bei 8000 rpm (8800xg) und 37°C für 2 min pelletiert. Zur Vermeidung von Änderungen in der Genexpression (insbesondere Induktion von Kälteschockgenen) wurde bei 37°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Isolierung der Gesamt-RNA

Die aus 100 ml Kultur gewonnenen, bei -80°C gelagerten Bakterienpellets wurden, ohne diese aufzutauen, in 4 ml NAE-gesättigtem Phenol (60°C) zügig resuspendiert und für 5 min bei 60°C im Heizwasserbad inkubiert. Zur Suspension wurden 4 ml NAES-Puffer (60°C) gegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 5 min bei 60°C, wobei zwischendurch nochmals invertiert wurde. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min auf Eis gestellt und 8 min bei 8000 rpm (8800xg) und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde in ein 15 ml PhaseLockGel-Röhrchen („heavy“, Eppendorf) überführt, mit 4 ml Phenol:Chloroform 6:1 versetzt und für 2 min invertiert. Nach Trennung der beiden Phasen durch eine Zentrifugation (8 min, 8000 rpm, 4°C) wurde die wässrige Phase erneut abgenommen und die zuvor beschriebene Phenolisierung wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde die Oberphase in ein steriles 15 ml Greiner-Röhrchen verbracht, in welchem bereits 4 ml kaltes Isopropanol und 400 µl 3 M Na-Acetat pH 5,1 vorgelegt waren. Durch mehrmaliges Invertieren wurde gemischt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Fällung erfolgte eine Zentrifugation bei 8000 rpm (8800xg) für 40 min und 4°C. Das Pellet wurde mit 4 ml 70 % EtOH gewaschen, in einem Exsikkator für 30 min getrocknet und je nach Verwendung in 200-500 µl DEPC-Wasser gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die so isolierte RNA bei -80°C aufbewahrt.

Tabelle 3.5: Zur Isolierung von Gesamt-RNA eingesetzte Lösungen

| Lösung | Komponente | Konzentration |
|------------|------------------|---------------|
| NAE-Puffer | Na-Acetat pH 5,1 | 50 mM |
| | EDTA | 10 mM |

| | | |
|-----------------------|------------------------------------|------------------|
| NAES-Puffer | NAE-Puffer | |
| | SDS | 1 % (w/v) |
| NAE-Phenol | Aqua-Phenol (Roth) | |
| | NAE-Puffer | 50 ml/500 ml |
| Phenol:Chloroform 6:1 | Aqua-Phenol (Roth) | 5 Volumenanteile |
| | Chloroform (Roth) | 1 Volumenanteil |
| 3 M Na-Acetat | Na-Acetat | 3 M |
| | pH 5,1, eingestellt mit Essigsäure | |

DNaseI-Verdau

Die in der RNA-Lösung vorhandene chromosomale DNA musste durch einen DNaseI-Verdau degradiert werden. Hierzu wurde RNase-freie DNaseI (NEB) verwendet und ein Ansatz wie folgt pipettiert:

440 µl RNA-Lösung
50 µl 10 x DNaseI-Puffer (NEB)
10 µl DNaseI (2 U/µl, NEB)

Die Inkubation wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt.

3.3.2 Aufreinigung von Gesamt-RNA

Aufreinigung durch Kieselgel-Säulen

Die DNaseI-verdaute Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Midi-Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellerprotokolls gereinigt und in einem entsprechenden Volumen DEPC-Wasser (Ambion) eluiert.

Phenolisierung und Ethanolpräzipitation von RNA

Bestand die Notwendigkeit, eine RNA-Lösung erneut zu reinigen, so wurde zunächst eine Phenolisierung durchgeführt. Hierzu wurde das Volumen einer RNA-Lösung zu 300 µl mit DEPC-Wasser (Ambion) eingestellt und mit 300 µl Aqua-Phenol (Roth) versetzt. Im Anschluß wurde 30 s gevortext und für 5 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Oberphase wurde mit 30 µl 3 M Na-Acetat pH 5,1 und 800 µl eiskaltem 100 % EtOH vermischt, 10 min bei -20°C inkubiert und für 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl kaltem 70 % EtOH gewaschen und erneut 5 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde für 10 min bei 50°C getrocknet und in einem entsprechenden Volumen DEPC-Wasser gelöst.

3.3.3 Überprüfung der Qualität von RNA

Um Ergebnisse späterer Analysen nicht zu verfälschen, war es unbedingt notwendig, die isolierte und aufgereinigte RNA auf Rückstände von DNA oder auf Anzeichen einer Degradation zu untersuchen. Hierzu wurden einerseits Kontroll-PCRs zum Ausschluß von DNA und andererseits eine Gel-Analyse in einem 1 % Agarosegel zum Aufdecken eventueller Degradation durchgeführt. Anhand der Schärfe der rRNA-Banden konnte die Gesamt-RNA hierbei auf eine eventuelle Degradation hin überprüft werden.

3.3.4 Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit von RNA

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch anhand von 1 µl RNA-Lösung geeigneter Verdünnung im NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies) bestimmt. Hierbei entsprach 1 OD₂₆₀ = 40 ng/µl einzelsträngiger RNA. Die Reinheit von RNA wurde durch die Verhältnisse der Absorptionen bei 230 (Messung von Verunreinigungen wie z.B. Polysacchariden), 260 und 280nm (Messung von Verunreinigungen durch Proteine und Alkohol) bestimmt. Ein Verhältnis E₂₆₀ / E₂₈₀ von 2 und ein Verhältnis E₂₆₀ / E₂₃₀ von >2 zeigten einen genügend hohen Reinheitsgrad der isolierten RNA an.

3.4 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Elektrophorese von DNA

DNA-Fragmente und Plasmide wurden in Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarose-Konzentration betrug entweder 0,8 %, 1 % oder 1,5 % (je nach Größe der aufzutrennenden DNA, Sambrook et al., 1989). Die Größenbestimmung erfolgte bei linearen DNA-Fragmenten durch einen Vergleich mit geeigneten Molekulargewichtsstandards. Die Wanderungsstrecke ist hierbei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekülgröße. Als Molekulargewichtsstandards dienten eine 1 kb Leiter „ready load“ der Firma Invitrogen, eine 1kb Leiter und eine 100 bp Leiter „gene ruler“ der Firma Fermentas.

Das Agarose-Pulver (SEAKEM LE-Agarose, FMC Bioproducts, Rockland) wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle im Laufpuffer (TEE oder TBE) geschmolzen. Die Elektrophoresekammer wurde an beiden Seiten mit Klebeband abgedichtet. Die im Laufpuffer gelöste Agarose wurde auf ca. 60°C abgekühlt und in die Kammer gegossen. Die Taschen wurden durch das Einsetzen des Plexiglaskammes in die flüssige Agarose gebildet. Nach ca. 20 min war die Agarose erstarrt und die Elektrophoresekammer wurde in die mit Laufpuffer befüllte Elektrophorese-Apparatur gegeben. Vorher wurden noch die Klebebänder und der Kamm entfernt. Das Gel sollte nun ca. 0,5 cm mit Laufpuffer überschichtet sein. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{6}$ Volumen 6 x DNA-Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 8 V/cm. Nach dem Gel-Lauf wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Färbebad (5 µg/ml) für 20-30 min gefärbt. Hierbei interkaliert der Farbstoff zwischen den Basen der DNA. Die Banden der aufgetrennten DNA konnten somit durch UV-Licht mit der Wellenlänge 254 nm auf einem Transilluminator sichtbar gemacht werden. Dokumentiert wurden die Gele mit einer Video Copy Processor Kamera (P68E, Mitsubishi).

Elektrophorese von RNA

Zur Auftrennung von RNA wurde prinzipiell wie bei der Auftrennung von DNA verfahren, jedoch wurden alle mit der RNA direkt oder indirekt in Kontakt kommenden Oberflächen zuvor gründlich gereinigt und mit RNaseZAP (Ambion) behandelt. Als Laufpuffer wurde ein 1 x MOPS-Puffer verwendet. Das Agarosegel wurde mit 1 x MOPS-Puffer hergestellt und zudem mit Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 2 % versetzt, um Sekundärstrukturen von RNA aufzubrechen. Als Ladepuffer wurde ein 2 x RNA-Loading Dye der Firma Fermentas verwendet. Wurde ein Größenstandard benötigt (bei Gelen zur Auftrennung für Northern-Analysen), so kam ein digoxigeninmarkierter Molekulargewichtsmarker zum Einsatz (RNA molecular weight marker I, Roche).

Tabelle 3.6: Zur Elektrophorese von RNA eingesetzter Puffer

| Lösung | Komponente | Konzentration |
|-----------------|------------|---------------|
| 1 x MOPS-Puffer | MOPS | 40 mM |

| | |
|----------------------------|-------|
| Na-Acetat | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |
| pH 7, eingestellt mit NaOH | |

3.5 DNA-Elution aus Agarosegelen

Zur Isolierung einzelner DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden Gele mit größeren, dem aufzutragenden Volumen entsprechenden Geltaschen gegossen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 8 Volt/cm. Die zu isolierende Bande wurde mit einem Skalpell unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und im Anschluß unter Verwendung des PCR clean-up Gel extraction Kits (Macherey-Nagel) aus der Agarose eluiert.

3.6 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

(Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion lassen sich *in vitro* DNA-Fragmente amplifizieren. Hierzu werden neben der ds-Template-DNA zwei Oligonukleotidprimer, welche zum Plusstrang bzw. zum Minusstrang der Template-DNA komplementär sind und die Zielsequenz eingrenzen, benötigt. Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Newton und Graham, 1994) amplifiziert bei der Reaktion die Zielsequenz der Template-DNA. Ein PCR-Lauf besteht im Grunde aus drei Reaktionsschritten:

Denaturierung der Template-DNA: Auftrennung der dsDNA in ssDNA (94-98°C)

Primer-Annealing: Anlagerung der Primer an die denaturierte Template-DNA (Primer-abhängige Temperatur)

Elongation: Verlängerung der Primer zur Synthese der Komplementärstränge (72°C)

Die Einhaltung der bei den einzelnen Reaktionsschritten benötigten Temperaturen wird durch die Durchführung in einem programmierbaren Thermocycler (T1 Thermocycler, Biometra) erreicht.

Primer-Auswahl

Die Auswahl der in dieser Arbeit eingesetzten Primer-Paare erfolgte nach den von Newton und Graham (1994) aufgestellten Richtlinien. Diese betreffen G/C-Gehalt, Länge und Basenverteilung. Die Schmelztemperatur beider Primer sollte hierbei annähernd gleich sein. Die PCR wurde je nach Anforderungen an das PCR-Produkt mit zwei verschiedenen DNA-Polymerasen durchgeführt.

Standardansatz

Handelte es sich um eine analytische PCR, sollten die amplifizierten DNA-Fragmente also nicht zur Klonierung eingesetzt werden und war nur die Größe des amplifizierten DNA-Fragments von Interesse, so waren statistisch auftretende falsch eingebaute Nukleotide nicht von Bedeutung. Daher wurde hierfür ein Standardansatz mit Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Goldstar Red, Eurogentec, Taq Standard) verwendet. Diese Polymerase besitzt keine Korrekturlesefunktion (proof reading, 3'-5'-Exonukleaseaktivität) und die Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden liegt bei ca. 8×10^{-6} . Ansatz und Programm für eine Reaktion wurden wie folgt verwendet:

Tabelle 3.7: Standardansatz für eine PCR mit Taq-Polymerase

| Komponente | Menge | Endkonzentration |
|----------------------------|---------------|------------------|
| dNTP's (10 mM) | 2 µl | 200 µM |
| MgCl ₂ (25 mM) | 16 µl | 4 mM |
| 10 x Puffer | 10 µl | 1 x |
| Forward-Primer (20 pM/µl) | 1 µl | 0,2 pM/µl |
| Reverse-Primer (20 pM/µl) | 1 µl | 0,2 pM/µl |
| Taq-Polymerase (2,5 U/µl) | 0,5 µl | 0,025 U/µl |
| H ₂ O millipore | 66,5 µl | |
| Template-DNA | 1 µl | ~25 ng/100µl |
| Gesamtvolumen | 100 µl | |

Tabelle 3.8: Standardprogramm für eine PCR mit Taq-Polymerase

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [min] |
|----------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 1. Denaturierung | 96 | 4 |
| 2. Denaturierung | 96 | 1 |
| 3. Primer-Annealing | Primer T _m -5°C | 1 |
| 4. Elongation | 72 | 1 / kb PCR-Produkt ¹ |
| 5. finale Elongation | 72 | 4 |

¹) Die Schritte 2-4 wurden 30x wiederholt.

Ansatz mit iProof High-Fidelity DNA Polymerase

Handelte es sich um eine präparative PCR, so war es erforderlich während der Reaktion falsch eingebaute Nukleotide möglichst zu vermeiden. Die amplifizierten DNA-Fragmente sollten schließlich im Anschluß entweder kloniert und zur Expression des kodierten Proteins oder zur Deletion einzelner chromosomaler Gene eingesetzt werden. Es wurde also eine Polymerase benutzt, welche eine Korrekturlesefunktion (proof reading, 3'-5'-Exonukleaseaktivität) besitzt (iProof High-Fidelity DNA Polymerase, Bio-Rad). Mit dieser Polymerase ist laut Herstellerangaben mit einer bis zu 50 mal niedrigeren Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden im Vergleich zur Taq-Polymerase zu rechnen. Mit dieser Polymerase läßt sich also ein möglichst reines PCR-Produkt gewinnen. Zusätzlich lassen sich mit dieser Polymerase sehr lange PCR-Produkte in kürzerer Zeit amplifizieren und sie produziert im Gegensatz zu Taq-Polymerase DNA-Fragmente mit glatten Enden. Ansatz und Programm (50 µl Gesamtansatz) wurden wie folgt verwendet:

Tabelle 3.9: Standardansatz für eine PCR mit iProof-Polymerase

| Komponente | Menge | Endkonzentration |
|----------------------------|--------------|------------------|
| dNTP's (10 mM) | 1 µl | 200 µM |
| 5 x Puffer HF(Bio-Rad) | 10 µl | 1 x |
| Forward-Primer (10 pM/µl) | 2,5 µl | 0,5 pM/µl |
| Reverse-Primer (10 pM/µl) | 2,5 µl | 0,5 pM/µl |
| iProof-Polymerase (2 U/µl) | 0,5 µl | 0,02 U/µl |
| H ₂ O millipore | y µl | |
| Template-DNA | x µl | ~150 ng/100µl |
| Gesamtvolumen | 50 µl | |

Tabelle 3.10: Standardprogramm für einen Ansatz mit iProof-Polymerase

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [s] |
|----------------------|----------------------------|----------------------------------|
| 1. Denaturierung | 98 | 30 |
| 2. Denaturierung | 98 | 10 |
| 3. Primer-Annealing | Primer-T _m +3°C | 20 |
| 4. Elongation | 72 | 30 / kb PCR-Produkt ¹ |
| 5. finale Elongation | 72 | 300 |

¹) Die Schritte 2-4 wurden 30x wiederholt.

Ansatz zur überlappenden PCR

Einige Konstrukte zur Deletion oder zum Austausch von DNA-Regionen in *Streptococcus pneumoniae* wurden in der vorliegenden Arbeit unter Einsatz einer überlappenden PCR hergestellt. In dieser Variation einer herkömmlichen PCR werden zwei oder mehrere zuvor hergestellte PCR-Produkte in einer PCR zusammengefügt. Das Konstrukt zur Inaktivierung eines Gens wurde hier somit nicht durch Restriktion und Ligation der Teilfragmente hergestellt, sondern direkt in einem modifizierten PCR-Programm synthetisiert. Hierzu mußten die Ausgangsfragmente an dem Ende, mit welchem sie an eines der Enden eines weiteren Fragments verknüpft werden sollten, einen ca. 40 bp-langen komplementären Bereich zum Ende des anderen Fragments besitzen und umgekehrt. Dies wurde erreicht, indem die Ausgangsfragmente in einer PCR synthetisiert wurden, wobei die eingesetzten Primer an einem Ende eine ca. 20 bp-lange, zum Ende des anderen Fragments komplementäre Sequenz am entsprechenden Ende des jeweiligen Amplifikats anfügten. Die so hergestellten Fragmente wurden nun zunächst in zwei PCR-Zyklen ohne zusätzliche Primer verknüpft. Hierbei wurde eine Annealing-Temperatur gewählt, welche sich an den Schmelztemperaturen der ca. 40 bp-langen Überlappungen orientierte und eine Elongationszeit, welche der benötigten Zeit zur Synthese des verknüpften, langen Produktes entsprach. Die komplementären Bereiche an den Enden der Fragmente dienten hierbei selbst als Primer. Es handelt sich hierbei im eigentlichen Sinn nicht um eine PCR, da es zu keiner Amplifikation kommt. Es werden lediglich die eingesetzten Fragmente verknüpft und die fehlenden Gegenstränge aufgefüllt. Die beiden Zyklen wurden deshalb auch Auffüllreaktion genannt. Im Anschluß an die Auffüllreaktion wurde die PCR durch Abkühlen auf 10°C für 60 s unterbrochen und ein Primerpaar (nested) zugegeben, welches zur Amplifikation des Großteils des in der Auffüllreaktion hergestellten Volle-Länge-Produktes führt. Diese Vorgehensweise stellte eine effektive, weil zeitsparende Methode zur Inaktivierung von Genen und Clustern dar. Sie konnte jedoch nicht immer angewandt werden, da der Erfolg einer solchen PCR sehr stark von der zu amplifizierenden Sequenz und von auf ihr vorhandenen repetitiven Sequenzen abzuhängen schien. Hierdurch konnte es im ungünstigsten Fall zur Amplifizierung von Nebenprodukten kommen, wobei das gewünschte Hauptprodukt nicht entstand.

PCR-Produkte wurden im Anschluß an eine PCR wie unter 3.2.7 beschrieben aufgereinigt und weiter verwendet.

3.7 Reverse Transkription (RT-PCR)

Durch eine reverse Transkription läßt sich RNA unter Verwendung von spezifischen- oder random-Hexamer-Primern in cDNA (complementary DNA) umschreiben. Diese cDNA kann einerseits schon während ihrer Synthese durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert und in Transkriptomanalysen detektiert und quantifiziert werden (vgl. 3.16), oder andererseits durch nachfolgende PCR-Reaktionen amplifiziert und somit detektiert bzw. quantifiziert oder die 5'-Enden von Transkripten bestimmt werden (vgl. 3.8, 3.12 und 3.15.1).

Die zur RT-PCR eingesetzte RNA wurde wie in den Abschnitten 3.3.1-3.3.4 beschrieben isoliert, aufgereinigt und auf ihre Qualität hin überprüft. Die RT-PCR, durchgeführt nach folgendem Protokoll kam bei der Bestimmung von 5'-Enden vom mRNA (3.12), dem Nachweis von Transkripten in PCRs auf cDNA (3.15.1), sowie der Quantifizierung von Transkripten in einer Real-Time PCR (3.8) zum Einsatz.

Zur reversen Transkription wurde der First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche) eingesetzt. Hierbei kam eine Avian Myeloblastis Virus (AMV) Reverse Transcriptase zum Einsatz. Reaktionsansatz und -Bedingungen gestalteten sich nach Herstellerangaben wie folgt:

Tabelle 3.11: Ansatz für eine RT-Reaktion mit AMV Reverse Transcriptase

| Komponente | Menge | Endkonzentration |
|---|--------------|------------------|
| dNTP's (je 10 mM) | 2 µl | 1 mM |
| 10 x AMV-Puffer (Roche) | 2 µl | 1 x |
| MgCl ₂ (25 mM) | 4 µl | 5 mM |
| Primer (spezifisch oder random-Hexamer) | x µl | |
| RNase-Inhibitor (50 U/µl) | 1 µl | 50 U/µl |
| AMV Reverse Transkriptase | 0,8 µl | >20 U |
| Template-RNA | y µl | variabel |
| DEPC-Wasser (Ambion) | z µl | |
| Gesamtvolumen | 20 µl | |

Zum Aufbrechen möglicher Sekundärstrukturen der RNA wurde die RNA vor Zugabe zum Reaktionsansatz für 15 min bei 65°C inkubiert und sofort für 5 min in Eiswasser gekühlt.

Tabelle 3.12: Programm für eine RT-PCR mit AMV Reverse Transcriptase

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [min] |
|--------------------------|-----------------|------------|
| 1. Primer-Annealing | 25 | 10 |
| 2. reverse Transkription | 42 | 60 |
| 3. AMV-Inaktivierung | 99 | 5 |
| 4. Kühlung | 4 | 2 |

Die so hergestellte cDNA konnte direkt in nachfolgenden Reaktionen weiter verwendet werden.

3.8 Real-Time PCR

Zur Quantifizierung von einzelnen, spezifischen Transkripten wurde anstelle der unter 3.16 beschriebenen mikroarray-basierten Transkriptomanalyse eine Real-Time PCR unter Verwendung eines LightCycler-Thermocyclers (Version 2.0, Roche) durchgeführt. Prinzipiell werden bei einer Real-Time PCR zuerst zwei aus den zu vergleichenden Stämmen stammende Gesamt-RNA-Isolate in einer vorangestellten RT-Reaktion mit Random-Primern in cDNA umgeschrieben (3.7). Hierbei ist es unbedingt notwendig, daß im Vorfeld chromosomale DNA komplett durch einen DNaseI-Verdau degradiert wurde, da noch vorhandene DNA das Ergebnis der späteren Real-Time PCR unbrauchbar machen würde. In der vorliegenden Arbeit wurde dies durch Kontroll-PCRs auf der DNaseI-verdauten RNA, wobei die gleichen Primer wie später zur Real-Time PCR und 32-fach höhere RNA-Mengen eingesetzt wurden gewährleistet. In der eigentlichen Real-Time PCR wird mit genspezifischen Primern die cDNA des zu quantifizierenden Transkripts amplifiziert. Die Menge der amplifizierten DNA wird am Ende von jedem PCR-Zyklus durch Messung der Fluoreszenz des durch Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green mit der dsDNA entstehenden Komplexes bestimmt. Am Ende einer Real-Time PCR wird für das untersuchte Transkript ein C_p-Wert berechnet, welcher als der Wert (oder die Zyklen-Anzahl) definiert ist, bei welchem das Fluoreszenzsignal eine definierte Detektionsgrenze überschreitet. Kleinere C_p-Werte bedeuten höhere Konzentrationen und umgekehrt. Um eventuelle Mengenunterschiede der eingesetzten cDNA auszugleichen, wurden die C_p-Werte der zu vergleichenden Transkripte gegen die C_p-Werte des Gyrase-Gen-Transkripts *gyrA* der zu vergleichenden Stämme unter Verwendung der LightCycler-Software (Version 4.0, Roche) normalisiert. Nach Durchlaufen der eingestellten Zyklenzahl wurde eine Schmelzkurven-Analyse des entstandenen PCR-Produktes durchgeführt, um eine Aussage über die Homogenität des Amplifikates zu treffen und so Verunreinigungen zu detektieren. Jedes der Real-Time Experimente wurde mit je zwei RNA-Isolaten aus getrennt angezogenen Kulturen der zu vergleichenden Stämme

durchgeführt. Der Mittelwert aus beiden Experimenten wurde letztendlich zur Berechnung des C_p -Unterschiedes herangezogen. Der berechnete Unterschied wurde aufgrund der theoretischen Verdopplung der DNA-Menge pro PCR-Zyklus zur Basis von 2 logarithmiert. Der erhaltene Wert entspricht dem Verhältnis der eingesetzten und normalisierten cDNAs und somit dem Verhältnis der Transkriptmengen in den zu vergleichenden Stämmen.

Die Anzucht der zu vergleichenden Stämme, sowie die Isolierung, Aufreinigung und Begutachtung der Gesamt-RNA wurde wie unter 3.3.1-3.3.4 beschrieben durchgeführt, wobei jedoch auf eine Säulenaufreinigung mittels RNeasy Midi-Kits (Qiagen) (3.3.2) verzichtet wurde, da dies zum Verlust von sehr kleinen Transkripten <100bp führen kann. Gegebenenfalls wurde erneut phenolisiert und gefällt (3.3.2), bis eine ausreichende Reinheit erreicht wurde. Danach erfolgte eine Kontroll-PCR als Taq-Standardansatz von 50 μ l (3.6) zum Ausschluß des Vorhandenseins von chromosomaler DNA auf 200 ng der isolierten Gesamt-RNA jedes Stammes mit den Primer-Paaren, welche auch zur späteren Real-Time PCR eingesetzt wurden. Dies entsprach einem 32-fachen Überschuß im Vergleich zur bei der späteren Real-Time PCR eingesetzten cDNA-Menge. 1 μ g der isolierten Gesamt-RNA wurde anschließend wie unter 3.7 beschrieben in einer 20 μ l-RT-Reaktion unter Verwendung von Random-Hexamer-Primern (Roche) in cDNA umgeschrieben. Von den RT-Ansätzen wurden 1:100-Verdünnungen in DEPC-Wasser (Ambion) angefertigt und die Ansätze zur Real-Time PCR in 20 μ l-Glaskapillaren pipettiert. Zum Einsatz kam hierbei ein Puffer, welcher SYBR Green, Ex Taq Hot Start DNA-Polymerase, dNTPs und Puffer-Komponenten enthielt (SYBR Premix Ex Taq, TaKaRa, USA). Zusätzlich wurde noch ein Ansatz ohne Template-cDNA pipettiert um Verunreinigungen in den Komponenten auszuschließen. Folgende Ansätze wurden je 3-fach pipettiert:

Tabelle 3.13: Reaktionsansätze zur Real-Time PCR

| Stamm | Komponente | Menge [μ l] | Endkonzentration |
|--|---------------------------------|------------------|-------------------|
| 1 und 2 (zu testendes Transkript) | SYBR Premix Ex Taq (2 x) | 10 | 1 x |
| | Primer 1 (50 pM/ μ l) | 0,4 | 1 pM/ μ l |
| | Primer 2 (50 pM/ μ l) | 0,4 | 1 pM/ μ l |
| | H ₂ O | 4,2 | |
| | Template (2,5 ng/ μ l) | 5 | 0,125 ng/ μ l |
| 1 und 2 (cDNA-Mengenkontrolle) | SYBR Premix Ex Taq (2x) | 10 | 1 x |
| | Primer RTgyrAf (50 pM/ μ l) | 0,4 | 1 pM/ μ l |
| | Primer RTgyrAr (50 pM/ μ l) | 0,4 | 1 pM/ μ l |
| | H ₂ O | 4,2 | |
| | Template (2,5 ng/ μ l) | 5 | 0,125 ng/ μ l |
| Wasserkontrolle ohne cDNA | SYBR Premix Ex Taq (2 x) | 10 | 1 x |
| | Primer 1 (50 pM/ μ l) | 0,4 | 1 pM/ μ l |
| | Primer 2 (50 pM/ μ l) | 0,4 | 1 pM/ μ l |
| | H ₂ O | 9,2 | |
| Wasserkontrolle ohne cDNA | SYBR Premix Ex Taq (2 x) | 10 | 1 x |
| | Primer gyrA_f (50 pM/ μ l) | 0,4 | 1 pM/ μ l |
| | Primer gyrA_r (50 pM/ μ l) | 0,4 | 1 pM/ μ l |
| | H ₂ O | 9,2 | |

Folgende Einstellungen wurden zur Durchführung der Real-Time PCR vorgenommen:

Tabelle 3.14: Programm zur Real-Time PCR

| Schritt | Temperatur [°C] | Anstieg (T) [°C/s] | Zeit [s] |
|------------------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| 1. Denaturierung | 95 | 20 | 20 |
| 2. Denaturierung | 95 | 20 | 5 |
| 3. Primer-Annealing und Elongation | 60 | 20 | 20 ¹ |
| 4. Schmelzkurve Schritt 1 | 95 | 20 | 0 |
| 5. Schmelzkurve Schritt 2 | 65 | 20 | 15 |

| | | | |
|---------------------------|----|-----|----|
| 6. Schmelzkurve Schritt 3 | 95 | 0,1 | 0 |
| 7. Kühlung | 45 | 20 | 30 |

¹⁾ Die Schritte 2-3 wurden 40x wiederholt.

Nach der Durchführung der Real-Time PCR wurden, insofern alle Kontrollen ein zufriedenstellendes Resultat zeigten, die aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche erhaltenen, gemittelten C_p -Werte und die sich hieraus ergebenden Transkriptverhältnisse mit Hilfe der LightCycler Software 4.0 im „relative quantification“-Modus berechnet.

3.9 Sequenzierung von DNA

Zur Bestimmung der Nukleotid-Sequenz von DNA-Fragmenten wurde ein Cycle-Sequencing-Verfahren mit dem BigDye-Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgt hierbei durch eine enzymatische Sequenzierung nach Sanger, Nicklen und Coulson (1977).

Es handelt sich hierbei um eine modifizierte Polymerase-Reaktion unter zusätzlicher Verwendung von Didesoxynukleotiden (ddNTPs), welche eine weitere Primer-Extension durch die Taq-Polymerase verhindern. Beim Einbau der ddNTPs durch die Polymerase kommt es somit zum Kettenabbruch, da ddNTPs am 3'-Ende eines DNA-Moleküls kein Substrat mehr für die Polymerase darstellen. Die Menge der ddNTPs ist im Verhältnis zu den entsprechenden dNTPs gering gehalten, um einen eher seltenen Einbau in das neue DNA-Molekül zu gewährleisten. Somit wird eine Serie von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten gebildet, welche alle mit dem entsprechenden ddNTP enden. Dieses Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Ketten kann nun mittels einer Elektrophorese aufgetrennt werden. Da die vier im Ansatz enthaltenen ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können die DNA-Fragmente in nur einem Lauf durch einen Argon-Ionen-Laser, welcher die ddNTPs zur Fluoreszenz anregt, detektiert werden.

Sequenzreaktion

Zur Durchführung der Sequenzreaktion wurde folgender Ansatz hergestellt:

Tabelle 3.15: Standardansatz zur Sequenzreaktion

| Komponente | Menge |
|---------------------------------|----------------|
| BigDye Terminator Ready Mix 1.1 | 2 μ l |
| Template-DNA | 10-15 ng/100bp |
| Primer (10 pM) | 1 μ l |
| H ₂ O millipore | ad 10 μ l |

Der Ansatz wurde zur Durchführung der Sequenzreaktion in einem Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

Tabelle 3.16: Programm zur Sequenzreaktion

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [s] |
|-----------------------|-----------------|-------------------|
| 1. Denaturierung | 96 | 300 |
| 2. Denaturierung | 96 | 30 |
| 3. Primer – Annealing | 50 | 10 |
| 4. Elongation | 60 | 240 ¹⁾ |

¹⁾ Die Schritte 2-4 wurden 25x wiederholt.

Proben-Aufreinigung

Vor dem Sequenzlauf mußte der Ansatz aufgereinigt werden. Zu 10 µl Sequenzreaktion wurde Folgendes pipettiert und gemischt:

- 90 µl H₂O millipore
- 10 µl Na-Acetat (3 M, pH 5,2)
- 1 µl Glykogen (35 mg/ml)

Im Anschluß wurden 250 µl Ethanol p.A. zugegeben, gemischt und 10 min bei -80°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 14000 xg für 30 min wurde das Pellet mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 10 min wie zuvor zentrifugiert. Abschließend wurde die Probe im Dunkeln getrocknet und bis zur Sequenz-Detektion bei -20°C aufbewahrt.

Sequenzlauf

Der eigentliche Sequenzlauf wurde mit einem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer von Applied Biosystems im Nano+Biocenter der Universität Kaiserslautern durchgeführt.

Sequenz-Analyse

Die Überprüfung und das Assembly der erhaltenen Sequenzen wurde mit Hilfe folgender Software durchgeführt:

- Blast 2 Sequences: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html
- Cap Sequence Assembler at IFOM: www.ifom-firc/cgi-bin/Assembly/capassemble.pl
- Chromas v1.45

3.10 Sonstige Enzymreaktionen mit DNA**3.10.1 Restriktion**

PCR-Produkte, Plasmide oder chromosomale DNA wurden, wenn notwendig, um für eine Ligation (3.10.4) komplementäre Überhänge zu erhalten mit TypII-Restriktionsendonukleasen verdaut. Die hierbei eingesetzten Enzyme sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.17: Liste eingesetzter Restriktionsendonukleasen

| Enzym / Hersteller | Ursprungsorganismus | Erkennungssequenz 5'→3' ¹⁾ | Überhänge |
|-----------------------------|--|--|-----------|
| <i>Apa</i> I (NEB) | <i>Acetobacter pasteurianus</i> ATCC 9432 | GGG CCC | 3' |
| <i>Bam</i> HI (NEB/Roche) | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Stamm H | G GATCC | 5' |
| <i>Bcl</i> I (NEB) | <i>Bacillus caldolyticus</i> | T GATCA | 5' |
| <i>Eco</i> RI (NEB) | <i>E. coli</i> Stamm RY13 | G AATTC | 5' |
| <i>Hind</i> III (NEB/Roche) | <i>Haemophilus influenzae</i> Stamm R _d | A AGCTT | 5' |
| <i>Nde</i> I (NEB) | <i>Neisseria denitrificans</i> | CA TATG | 5' |
| <i>Nhe</i> I (NEB) | <i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i> | G CTAGC | 5' |
| <i>Sma</i> I (NEB) | <i>Serratia marcescens</i> | CCC GGG | blunt |
| <i>Sph</i> I (NEB) | <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> | GCATG C | 3' |
| <i>Pme</i> I (NEB) | <i>Pseudomonas mendocina</i> | GTTT AAAC | blunt |
| <i>Pst</i> I (NEB/Roche) | <i>Providencia stuartii</i> 164 | CTGCA G | 3' |
| <i>Pvu</i> I (NEB) | <i>Proteus vulgaris</i> | CGAT CG | 3' |
| <i>Xba</i> I (NEB) | <i>Xanthomonas badrii</i> | T CTAGA | 5' |
| <i>Xho</i> I (NEB) | <i>Xanthomonas holcicola</i> | C TCGAG | 5' |

¹⁾ Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme in den Erkennungssequenzen wurden mit | gekennzeichnet.

Um optimale Reaktionsbedingungen sicherzustellen, wurden die von den Herstellern angegebenen Reaktionspuffer und Temperaturen verwendet. Die Menge der notwendigen Enzymeinheiten wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$kb(\lambda) / kb(y) * N(y) / N(\lambda) = U/\mu g \text{ DNA}$$

kb (λ) = DNA des Phagen λ in kb (49 kb)

kb (y) = zu verdauenden DNA in kb

N (λ) = Anzahl der Schnittstellen für das entsprechende Enzym in DNA des Phagen λ

N (y) = Anzahl der Schnittstellen für das entsprechende Enzym in der zu verdauenden DNA

Aufgrund der Enzym-hemmenden Wirkung des Glycerins in den Enzym-Stocklösungen betrug die zugegebene Enzymmenge maximal 10 % des Gesamtvolumen des jeweiligen Ansatzes. Die Inkubationszeit betrug 2 bis 3h und wurde je nach verwendetem Restriktionsenzym bei 25°C oder 37°C im Wasserbad durchgeführt. Nach erfolgtem Verdau wurden präparative Ansätze, welche also weiterverwendet werden sollten, phenolisiert (3.2.5) und einer Ethanol-Präzipitation (3.2.6) unterzogen. Gegebenenfalls wurde zur Kontrolle mit einem Aliquot eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (3.4). Analytische Ansätze wurden ohne weitere Behandlung direkt zur Analyse mittels Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

3.10.2 Dephosphorylierung

Um das Rezirkularisieren von linearisierten Plasmiden bei einer Ligation zu verhindern, wurden diese mit alkalischer Phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase CIP, Roche oder Shrimp Alkaline Phosphatase SAP, USB) dephosphoryliert. Bei dieser Reaktion spaltet die alkalische Phosphatase die Phosphatgruppe am 5'-Terminus der linearen DNA ab. Folge hiervon ist, daß das so entstandene DNA-Molekül für die T4-DNA-Ligase kein Substrat mehr darstellt. Hierzu wurde die linearisierte Plasmid-DNA nach erfolgtem Restriktionsverdau (3.10.1) zuerst phenolisiert (3.2.5) und mit Ethanol präzipitiert (3.2.6). Die so gereinigte Plasmid-DNA wurde zur Phosphatase-Reaktion eingesetzt. Zuerst mußte hierzu die Molarität der vorhandenen DNA bestimmt werden, wobei angenommen wurde, daß 1 μ g eines 1 kb großen DNA-Fragments ca. 1,52 pMol ($9,1 \times 10^{11}$ Moleküle) entsprechen. Der Reaktionsansatz setzte sich bei Verwendung von CIP wie folgt zusammen:

Tabelle 3.18: Dephosphorylierungsansatz mit CIP

| Komponente | 3'-Überhang oder blunt | 5'-Überhang |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| DNA | x μ l | x μ l |
| 10 x Puffer (Roche) | 10 μ l | 10 μ l |
| alkalische Phosphatase | 1 U/2 pM | 1 U/100 pM |
| H ₂ O millipore | ad 100 μ l | ad 100 μ l |
| Inkubationsdauer 1 | 15 min bei 37°C | 30 min bei 37°C |
| | +1 U alkalische Phosphatase | - |
| Inkubationsdauer 2 | 45 min bei 55°C | - |

Wurde SAP verwendet, bestand der Reaktionsansatz aus folgenden Komponenten:

Tabelle 3.19: Dephosphorylierungsansatz mit SAP

| Komponente | 5'-Überhang |
|------------|-------------|
| DNA | x μ l |

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| 10 x SAP Puffer (USB) | 10 µl |
| shrimp alkaline phosphatase | 0,2 U/pM |
| H ₂ O millipore | ad 100 µl |
| Inkubationsdauer | 60 min bei 37°C |

Zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wurde nach der Inkubation $\frac{1}{10}$ Volumen EGTA (200 mM) zugegeben und der Ansatz für weitere 15 min bei 70°C inkubiert. Schließlich wurde der Ansatz zweimal phenolisiert (3.2.5) und einer Ethanolpräzipitation (3.2.6) unterzogen. Nach zweifachem Waschen mit 70 % Ethanol wurde die DNA vollständig getrocknet und in H₂O millipore gelöst.

3.10.3 Phosphorylierung

Bei der Synthese von Oligonukleotiden wie den kommerziell bei MWG oder Operon bestellten Primern fehlt synthesebedingt eine Phosphatgruppe am 5'-Ende. Bei einer Ligation mit dephosphoryliertem Vektor ohne vorherige Restriktion kann es somit nicht zur Bildung einer Phosphodiesterbindung durch die T4-DNA-Ligase kommen. Vor einer Ligation von linearisierten Plasmiden mit PCR-Produkten, welche nur an einem Ende eine Restriktionsschnittstelle besaßen, wurde das PCR-Produkt zunächst phosphoryliert. Hierzu wurde das Enzym Polynukleotid-Kinase (PNK, Roche) verwendet. Das Enzym wurde unter folgenden Bedingungen eingesetzt:

Tabelle 3.20: Phosphorylierungsansatz mit PNK

| Komponente | Volumen |
|--------------------------------------|----------|
| PCR-Produkt (20 pM 5'-OH-Enden) | x µl |
| 10 x Phosphorylierungspuffer (Roche) | 2 µl |
| ATP (20 pM) | y µl |
| H ₂ O millipore | ad 19 µl |
| PNK 10 U/µl | 1 µl |

Der Phosphorylierungsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und vor der weiteren Verwendung der DNA phenolisiert, präzipitiert und in einem gewünschten Volumen H₂O gelöst.

3.10.4 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (1 U/µl, Invitrogen) verwendet. Dieses Enzym verknüpft freie 3'-OH-Gruppen eines DNA-Fragments mit 5'-Phosphatgruppen eines anderen (oder des gleichen bei Plasmiden) DNA-Fragments. Die Menge des jeweiligen Inserts bei Ligationen mit linearisierten Plasmiden wurde entsprechend der Beschaffenheit der Enden (Cohesive- oder Blunt-Ends) angepasst, also in 3- bzw. 5-fachem Überschuß eingesetzt. Auf diese Art sollte ein ebenfalls ablaufendes Rezirkularisieren von linearisierten Plasmiden eingedämmt werden. Alternativ wurden vor der Ligrationsreaktion die linearisierten Plasmide einer Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase (Roche) oder Shrimp Alkaline Phosphatase (USB) unterworfen (3.10.2). Die erforderliche Menge des Inserts wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Xng_{(\text{Vektor})} / bp_{(\text{Vektor})} \times 3(\text{oder } 5) \times bp_{(\text{Insert})} = Yng_{(\text{Insert})}$$

Folgender Standardansatz wurde zur Ligation pipettiert:

Tabelle 3.21: Standardansatz zur Ligation mit T4-DNA-Ligase

| Blunt Ends | |
|--------------------------------|-------------|
| linearisierter Vektor | 0,15-0,3 pM |
| Insert | 0,45-0,9 pM |
| 5 x Ligase-Puffer (Invitrogen) | 4 µl |
| T4-DNA-Ligase (1 U/µl) | 1 µl |
| H ₂ O Millipore | ad 20 µl |
| Cohesive Ends | |
| linearisierter Vektor | 0,15-0,3 pM |
| Insert | 0,75-1,5 pM |
| 5 x Ligase-Puffer (Invitrogen) | 4 µl |
| T4-DNA-Ligase (1 U/µl) | 1 µl |
| H ₂ O Millipore | ad 20 µl |

Die Ligation erfolgte über Nacht in einem möglichst geringen Volumen (max. 20 µl) bei einer Temperatur von 16°C im Wasserbad.

Sollten zwei PCR-Produkte nach einer Restriktion ligiert werden, so wurden diese in äquimolaren Mengen zum Standardansatz pipettiert.

Nach erfolgter Ligation wurde der Ansatz phenolisiert und einer Ethanolpräzipitation unterzogen (3.2.5,3.2.6).

3.11 Inaktivierung/Deletion von Genen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von Genen und Clustern in *Streptococcus pneumoniae* inaktiviert bzw. deletiert.

Je nach genomischer Organisation der Bereiche up- und downstream der betreffenden Gene, wurden verschiedene Strategien zu deren Inaktivierung bzw. Deletion verfolgt. Gene, welche am 3'-Ende eines putativen Operons, gefolgt von einem intergenen Bereich lagen, wurden durch Integration einer Resistenzkassette (3.11.2) inaktiviert. Hierbei wurde meist ein Großteil des Gens durch die Resistenzkassette ersetzt. In diesen Fällen war die Gefahr von Effekten auf die Transkription und Translation downstream liegender Gene gering. War jedoch keine Terminatorstruktur downstream eines solchen Gens zu erkennen, oder befand sich das Gen am Anfang oder innerhalb eines putativen Operons, so wurde das betreffende Gen durch die Konstruktion eines Minigens, welches unter Verwendung der Janus-Kassette (3.11.3) konstruiert wurde, deletiert. Hierdurch sollten Effekte auf Transkription und Translation downstream liegender Gene minimiert werden.

Generell wurde bei den Transformationen von *Streptococcus pneumoniae* die Lebendkeimzahl durch das Ausplattieren von Verdünnungen auf D-Blutagar der zur Transformation eingesetzten Kultur bestimmt und die Transformationseffizienz nach 3.1.6 berechnet. Die Transformationseffizienzen sollten hierbei im für *Streptococcus pneumoniae* R6 zu erwartenden Bereich von 0,1 bis 1 % der Lebendkeimzahl liegen. Dies bedeutete, die eingefügte Deletion stellt für die Zelle kein Problem dar. War die Transformationseffizienz jedoch geringer, so bestand der Verdacht, daß das durch das zu deletierende Gen kodierte Protein eine unter den gegebenen Wachstumsbedingungen essentielle Funktion ausübte und nur solche Bakterien der eingesetzten Kultur überlebten, welche zugleich eine spontane Mutation in einem anderen, funktionell gekoppelten Gen aufwiesen, was eine lebensfähige Deletionsmutante erst ermöglichte. In solchen Deletionsmutanten war jedoch unsicher, ob die zu untersuchenden Effekte tatsächlich durch die Deletion des entsprechenden Gens und nicht durch eine spontane Mutation verursacht wurde, womit solche Deletionsmutanten nicht weiter verwendet wurden.

3.11.1 Verwendete Resistenzkassetten

***aad9*-Kassette**

Die *aad9*-Kassette ist ein von LeBlanc et al., 1991 aus *Enterococcus faecalis* isoliertes und charakterisiertes 1158 bp *ClaI-NdeI*-Fragment, auf welchem die Spectinomycin-Adenyltransferase AAD(9) durch das *aad9*-Gen kodiert ist. AAD(9) katalysiert den Transfer von AMP unter Hydrolyse von ATP auf das Spectinomycin, welches hierdurch inaktiviert wird. Die *aad9*-Kassette in der vorliegenden Arbeit wurde aus dem Plasmid pCR2.1spec (Zähler, 1999) durch PCR-Amplifikation des *ClaI-NdeI*-Fragments mit den Primern *spc_for* und *spc_rev* (Tabelle 2.5, 2.3) gewonnen.

***tetM*-Kassette**

Die *tetM*-Kassette aus *Streptococcus mitis* B6 (König et al., 1998) wurde als 2853 bp-Fragment durch PCR-Amplifikation mit den Primern *tetMklon-for2* und *tetMklon_rev* (Tabelle 2.5, 2.3) aus dem pPP2-Plasmid (Halfmann et al., 2007a) gewonnen. Das *tetM*-Gen kodiert für ein ribosomales Schutzprotein, welches die Inhibition der Interaktion von Aminoacyl-tRNA mit der 30S-Untereinheit der Ribosomen verhindert.

***ermAM*-Kassette**

Die *ermAM*-Kassette aus dem *Streptococcus faecalis*-Plasmid pAM β 1 (Martin et al., 1987) wurde mit entsprechenden Primern (Tabelle 2.5, 2.3) aus *Streptococcus pneumoniae* R6*dltA::ermAM* (Kovács et al., 2006) amplifiziert. Das *ermAM*-Gen (*erythromycin resistance transmethylase*) kodiert für eine 23S rRNA Methylase und verhindert durch Dimethylierung der 23S rRNA Target-Site am Ribosom die Interaktion des Ribosoms mit Erythromycin.

Janus-Kassette

Die Janus-Kassette (Sung et al., 2001) wurde in der vorliegenden Arbeit zur Konstruktion sogenannter Minigene eingesetzt. Sie besitzt einerseits einen synthetisch veränderten Kanamycin-Resistenzmarker (*kan*-Gen, ursprünglich aus dem *Streptococcus faecalis*-Plasmid pJH1 stammend) und andererseits das Wildtyp-Allel des ribosomalen Proteins RpsL (*rpsL*⁺) aus *Streptococcus pneumoniae* R800 (Lefevre et al., 1979), welches bei Integration der Janus-Kassette in das Genom eines zuvor durch Einführung einer Punktmutation im chromosomalen *rpsL*-Gen (Adenosin 167 zu Cytosin) hergestellten, Streptomycin-resistenten *Streptococcus pneumoniae* R6 zur Streptomycinsensitivität führt. Das *rpsL*⁺-Gen der Janus-Kassette dient somit als Marker zur Detektion von Transformanten (3.11.3), da es im Vergleich zum chromosomal kodierten *rpsL*-Gen eines Streptomycin-resistenten Stammes das dominante Allel darstellt. Die durch das *aphIII*-Gen kodierte 3'5"-Aminoglycosid Phosphotransferase des TypIII katalysiert den Transfer einer Phosphatgruppe unter Hydrolyse von ATP auf das Kanamycin, womit dieses inaktiviert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Janus-Kassette als 1358 bp-Fragment mit den Primern *janus_f* und *janus_r* (Tabelle 2.5, 2.3) durch PCR-Amplifikation aus *Streptococcus pneumoniae* R6 Δ *spr0282* (McKessar et al., 2007) gewonnen.

3.11.2 Inaktivierung von Genen durch Integration von Resistenzkassetten

Die Inaktivierung von Genen durch Integration von Resistenzkassetten wurde wie in Abbildung 3.1 dargestellt, durchgeführt.

Zunächst wurden die Resistenzkassette, sowie die flankierenden Bereiche (Abb.3.1, schwarze Balken) des zu inaktivierenden Gens (Abb.3.1, roter Balken) in einer PCR mit

entsprechenden Primern amplifiziert. Je nach weiterem Vorgehen (Herstellung des Konstruktes durch überlappende PCR (3.6) oder über eine Restriktion und Ligation mit der Resistenzkassette) wurden entweder Primer mit den unter 3.6 beschriebenen komplementären Anhängen von 20 bp oder Primer mit Restriktionsschnittstellen eingesetzt. Nach einer überlappenden PCR mit beiden flankierenden Bereichen und der Resistenzkassette (Abb. 3.1, grüner Balken) oder nach deren Restriktion und Ligation konnte direkt in *Streptococcus pneumoniae* transformiert und selektiert werden.

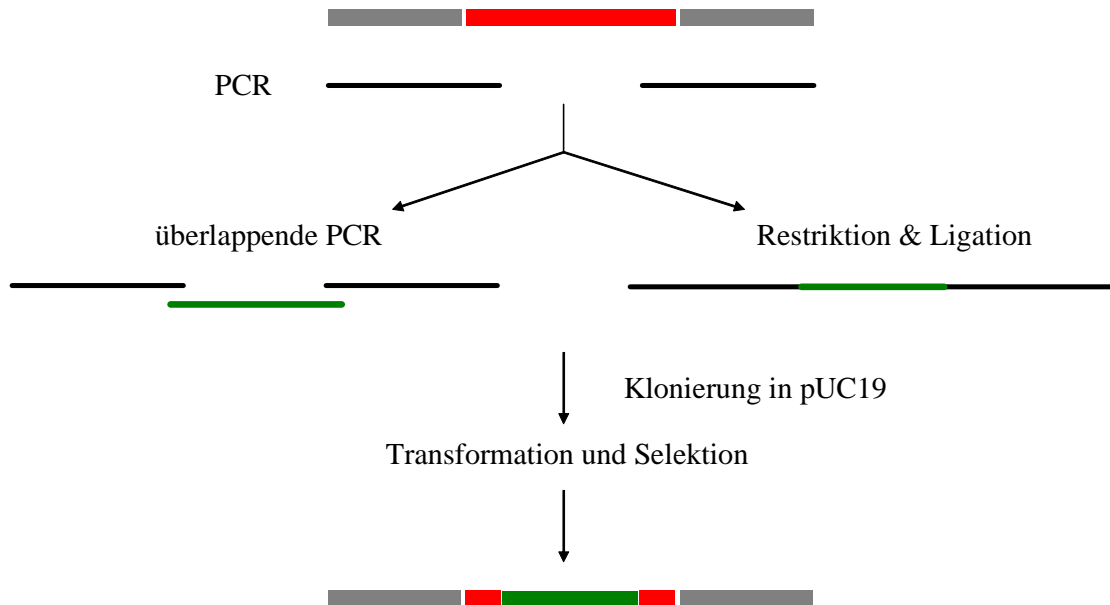


Abbildung 3.1: Strategien zur Inaktivierung von Genen mittels Integration von Resistenzkassetten: Die Inaktivierung von Genen erfolgte hierbei über ein Konstrukt, welches durch überlappende PCR oder durch Restriktion und Ligation der Ausgangsfragmente hergestellt wurde. Roter Balken: Zu inaktivierendes Gen; Grauer Balken: Genomischer Bereich up- und downstream der zu inaktivierenden Gene; schwarze Balken: Mittels PCR amplifizierte flankierende Bereiche des durch eine Resistenzkassette zu ersetzenden Abschnitts; grüner Balken: Resistenzkassette

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurden die durch überlappende PCR hergestellten Konstrukte teilweise in pUC19 kloniert und danach als entsprechende Derivate von pUC19 transformiert. Die entsprechenden Bereiche im Genom der Deletionsmutanten wurden durch Kontroll-PCRs auf isolierter chromosomaler DNA mit Primern, welche upstream bzw. downstream der äußersten, zur Amplifizierung der flankierenden Bereiche verwendeten Primer lagen, überprüft und gegebenenfalls sequenziert.

3.11.3 Deletion von Genen durch Konstruktion von Minigenen

Bei der Herstellung von Minigenen besteht das Problem, daß nach Inaktivierung eines Gens durch die Resistenzkassette und deren anschließender Deletion durch ein vorkonstruiertes Minigen, kein Resistenzmarker mehr vorhanden ist, auf dem eine Selektion der Transformanten durchführbar wäre. Die Deletion von Genen durch Konstruktion von Minigenen wurde deshalb, wie in Abbildung 3.2 dargestellt unter Verwendung der Janus-Kassette (3.11.1) durchgeführt. Die Janus-Kassette bietet aufgrund ihres Kanamycinresistenzmarkers und ihres Streptomycinsensitivitätsmarkers die Möglichkeit einer Detektion von Streptomycin- bzw. Kanamycinsensitiven Transformanten in einem Streptomycin-resistenten Ausgangsstamm. Die hierzu eingesetzten Stämme wurden im

Vorfeld mit einem PCR-Produkt, amplifiziert aus chromosomaler DNA von *Streptococcus pneumoniae* AmiA9 (Sicard, 1964; Salles, 1992), welches einen Streptomycinresistenzmarker trug (3.11.1, *rpsL*), transformiert und auf Streptomycin selektioniert. Das PCR-Produkt war 4984 bp lang, und wurde mit den Primern *amiA9fwd1* und *amiA9rev1* hergestellt.

Zunächst wurde die Janus-Kassette, sowie die flankierenden Bereiche (Abb.3.2, schwarze Balken) des zu inaktivierenden Gens (Abb.3.2, roter Balken) durch PCR mit entsprechenden Primern amplifiziert. Bei der Amplifikation der flankierenden Bereiche wurden solche Primer verwendet, welche an ein Ende des Amplifikats des upstream der zu deletierenden Region liegenden flankierenden Bereichs eine *Bam*HI-Schnittstelle anfügten und an das eine Ende des Amplifikats des downstream liegenden Bereichs in zwei getrennten Ansätzen eine *Apa*I- oder eine *Bam*HI-Schnittstelle anfügten (Abbildung 3.2).

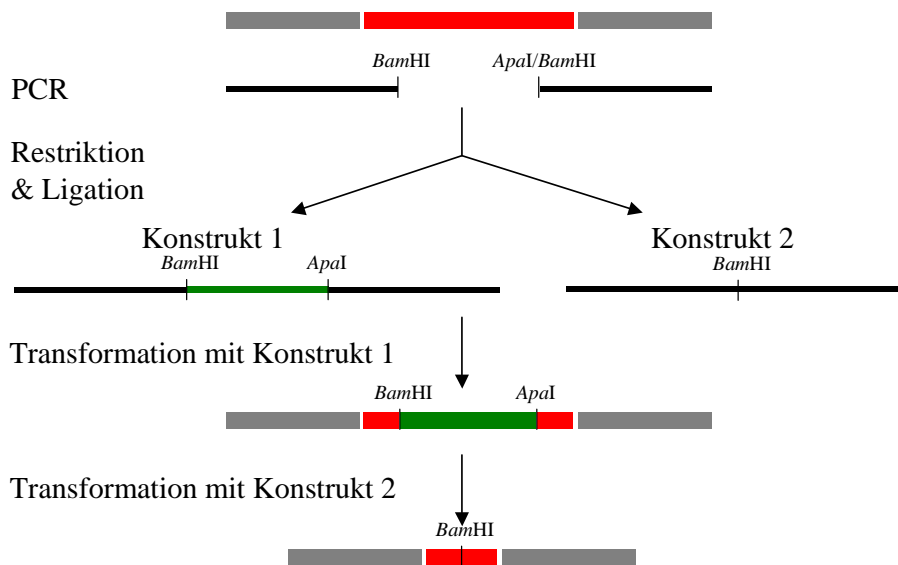


Abbildung 3.2: Strategie zur Deletion von Genen durch Konstruktion von Minigenen: Die Herstellung von Minigenen erfolgte hierbei über zwei Konstrukte. Konstrukt 1 diente zum Austausch des zu deletierenden Gens mit der Janus-Kassette (hier grüner Balken). Konstrukt 2 diente nach erfolgreicher Integration der Janus-Kassette zu deren Excision. Auf Konstrukt 2 war das Minigen als In-Frame-Fusion des zu inaktivierenden Gens vorkonstruiert. Roter Balken: Zu inaktivierendes Gen; Grauer Balken: Genomischer Bereich up- und downstream der zu inaktivierenden Gene; schwarze Balken: Mittels PCR amplifizierte flankierende Bereiche des durch eine Resistenzkassette zu ersetzenden Abschnitts. *Bam*HI und *Apa*I: Position der angefügten Restriktionsschnittstellen.

Hierdurch konnten die Up- und Downstreamfragmente nach entsprechenden Restriktionen mit der an einem Ende der Janus-Kassette liegenden *Bam*HI-Schnittstelle und der am anderen Ende liegenden *Apa*I-Schnittstelle ligiert werden oder die Up- und Downstreamfragmente über die *Bam*HI-Schnittstellen direkt miteinander ligiert werden. Im Ansatz mit den flankierenden Bereichen und der Janus-Kassette entstand Konstrukt 1 (Abb.3.2), im Ansatz ohne Janus-Kassette entstand Konstrukt 2 (Abb.3.2). Konstrukt 2 trug das Minigen als In-Frame-Fusion weniger Kodons des 5'- und 3'-Endes des zu deletierenden Gens.

In einer ersten Transformation wurden die wie oben beschrieben hergestellten Streptomycin-resistenten Stämme (R6*rpsL* oder P406*rpsL*) mit Konstrukt 1 transformiert und auf 200 µg/ml Kanamycin selektioniert. Im Anschluß erfolgte eine Überprüfung der Streptomycin-Sensitivität der Kanamycin-resistenten Transformanten auf 200 µg/ml Streptomycin. Durch

die Integration der Janus-Kassette und des auf ihr kodierten, dominanten *rpsL*⁺-Allels (3.11.1), sollten nun alle Transformanten eine Sensitivität gegen Streptomycin aufweisen. Transformanten mit dem gewünschten Resistenzphänotyp Kanamycin^R/Streptomycin^S wurden zu einer weiteren Transformation eingesetzt, wobei Konstrukt 2 verwendet wurde. Hierbei erfolgte die Selektion auf 200 µg/ml Streptomycin. Alle Transformanten sollten nun durch die Excision der Janus-Kassette und des auf ihr kodierten *rpsL*⁺-Allels wieder eine Streptomycinresistenz aufweisen. Zur Kontrolle wurden die Transformanten noch auf Platten mit 200 µg/ml Kanamycin überstrichen. Da die Janus-Kassette nunmehr durch Konstrukt 2 ersetzt war, sollten die Transformanten auch keine Kanamycin-Resistenz mehr aufweisen. Nach Integration von Konstrukt 2 befand sich anstelle des ursprünglichen Gens nunmehr das gewünschte Minigen.

Die resultierenden Stämme wurden ebenfalls durch Kontroll-PCRs mit Primern, welche upstream bzw. downstream der äußersten, zur Amplifizierung der flankierenden Bereiche verwendeten Primer lagen, überprüft und die entsprechenden genomischen Bereiche gegebenenfalls sequenziert.

3.12 Bestimmung der 5'-Enden von mRNA durch 5'-RACE (Rapid Amplification of 5'-cDNA Ends)

RACE ist eine Methode, welche zur Bestimmung von 5'- und 3'-Enden von RNA angewendet werden kann (Argaman et al., 2001; Bensing et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Identifikation von Transkriptionsstartpunkten verwendet. Zuerst wurde Gesamt-RNA aus dem entsprechenden Stamm isoliert. Zur Diskriminierung von intakten 5'-RNA-Enden und Degradationsprodukten, wurde mit einem Ansatz eine Behandlung mit Tobacco Acid Pyrrophosphatase (TAP) durchgeführt, ein weiterer verblieb unbehandelt. Zwecks anschließender reverser Transkription und späterer Amplifikation der 5'-Enden wurde im nächsten Schritt ein RNA-Oligonukleotid bekannter Sequenz an die 5'-Enden der RNA ligiert. Nach reverser Transkription mit einem Primer, welcher innerhalb des betreffenden Gens liegt, wurden die 5'-Enden mit einem zum RNA-Oligonukleotid komplementären Primer und einem weiteren, genspezifischen Primer amplifiziert. Die erhaltenen Banden, welche nur in der TAP-behandelten Probe zu sehen waren, wurden sequenziert. Das erste Nukleotid nach dem 3'-Ende des ligierten RNA-Oligonukleotids stellte den zu identifizierenden Transkriptionsstart dar.

Isolierung von Gesamt-RNA

Die zur Bestimmung mittels 5'-RACE benötigte RNA wurde, wie unter 3.3 beschrieben, isoliert, aufgereinigt, begutachtet und quantifiziert. Hierbei wurde jedoch auf eine Säulenaufreinigung mittels RNeasy Midi-Kit (Qiagen) (3.3.2) verzichtet, da dies zum Verlust von sehr kleinen Transkripten <100bp führen kann. Gegebenenfalls wurde erneut phenolisiert und gefällt (3.3.2), bis eine ausreichende Reinheit erreicht wurde.

Behandlung der RNA mit Tobacco Acid Pyrrophosphatase (TAP)

Die isolierte RNA wurde im Folgenden in zwei Ansätzen weiter verwendet. In einem Ansatz wurde die RNA zur Abtrennung eines Pyrophosphats des am 5'-Ende liegenden Triphosphats mit TAP behandelt. Ein zweiter Ansatz wurde ohne TAP-Behandlung weiter verwendet. Die Abtrennung des Pyrophosphats war notwendig, um die mRNA als Substrat für die T4-RNA-Ligase zugänglich zu machen und somit die Ligation eines RNA-Oligonukleotids im folgenden Schritt zu ermöglichen. Durch diese beiden Ansätze konnte zwischen den gesuchten Transkriptionsstartpunkten und RNA-Abbauprodukten unterschieden werden, da nur solche mRNA ein Triphosphat an ihrem 5'-Ende besitzt, welche nicht durch eine

beginnende Degradation entsprechender RNasen in *Streptococcus pneumoniae* geschnitten wurde. Zur Behandlung mit TAP wurde folgender Standardansatz unter Zusatz eines RNase-Inhibitors (SUPERaseIN, Ambion 20 U/ μ l) pipettiert und inkubiert:

Tabelle 3.22: Standardansatz zur TAP-Behandlung von mRNA

| Ansatz mit TAP | | Ansatz ohne TAP | |
|----------------------------------|--------------|----------------------------------|------------|
| Komponente/Inkubation | Menge | Komponente/Inkubation | Menge |
| RNA (3 μ g/ml) | 5 μ l | RNA (3 μ g/ml) | 5 μ l |
| → 5 min bei 55°C | | → 5 min bei 55°C | |
| DEPC-Wasser | 34,5 μ l | DEPC-Wasser | 37 μ l |
| SUPERaseIN (Ambion, 20/ μ l) | 2 μ l | SUPERaseIN (Ambion, 20/ μ l) | 2 μ l |
| 10 x TAP-Puffer (Biozym) | 5 μ l | 10xTAP-Puffer (Biozym) | 5 μ l |
| TAP (Biozym, 10 U/ μ l) | 2,5 μ l | - | - |
| → Abspaltung: 60 min bei 37°C | | → Abspaltung: 60 min bei 37°C | |

Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze phenolisiert, mit Ethanol präzipitert (3.3.2) und in 55 μ l DEPC-H₂O gelöst.

Ligation eines RNA-Oligonukleotids an die 5'-Enden der RNA

In einer Ligation mit T4-RNA-Ligase wurde das RNA-Oligonukleotid „RACE“ (Tabelle 2.5, 2.3) an die 5'-Enden in beiden Ansätzen ligiert. Hierzu wurde folgender Standardansatz pipettiert und inkubiert:

Tabelle 3.23: Standardansatz zur Ligation von RNA

| Ansatz mit TAP-behandelter RNA | | Ansatz ohne TAP-Behandlung | |
|-----------------------------------|------------|------------------------------------|------------|
| Komponente/Inkubation | Menge | Komponente/Inkubation | Menge |
| RNA (15 μ g) | 55 μ l | RNA (15 μ g) | 55 μ l |
| → 5 min bei 55°C | | → 5 min bei 55°C | |
| RNA-Oligo „RACE“ | 5 μ l | RNA-Oligo „RACE“ | 5 μ l |
| → Denaturierung: 5 min bei 95°C | | → Denaturierung: 5 min bei 95°C | |
| 10 x RNA-Ligase-Puffer (NEB) | 10 μ l | 10 x RNA-Ligase-Puffer (NEB) | 10 μ l |
| T4-RNA-Ligase (NEB, 20U/ μ l) | 5 μ l | T4-RNA-Ligase (NEB, 20 U/ μ l) | 5 μ l |
| SUPERaseIN (Ambion) | 4 μ l | SUPERaseIN (Ambion) | 4 μ l |
| DEPC-Wasser | 21 μ l | DEPC-Wasser | 21 μ l |
| → Ligation bei 17°C über Nacht | | → Ligation bei 17°C über Nacht | |

Zur Inaktivierung der T4-RNA-Ligase wurde der Ansatz im Anschluß wie unter 3.3.2 beschrieben, phenolisiert, mit Ethanol präzipitiert und in 50 μ l DEPC-Wasser gelöst.

RT-PCR mit genspezifischen Primern

Das Umschreiben von RNA in cDNA wurde mit 5-10 μ l der RNA aus der T4-RNA-Ligase-Reaktion, wie in 3.7 beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurde jeweils ein für das Gen, von welchem der Transkriptionsstart bestimmt werden sollte, spezifischer Primer eingesetzt. Diese Primer waren in der Regel komplementär zu einem Sequenzabschnitt 20-30 bp downstream des Translationsstartpunktes.

Amplifizierung der cDNA

Die hergestellte cDNA wurde in einer PCR (Taq-Standard, 3.6) amplifiziert. Hierzu wurden 2 μ l der RT-PCR eingesetzt. Als Primer kamen ein zum ligierten RNA-Oligonukleotid komplementärer Primer (RACE_PCR_5', Tabelle 2.5, 2.3) und ein weiterer, genspezifischer Primer, welcher jedoch upstream des zuvor in der RT-PCR eingesetzten genspezifischen

Primers lag, zum Einsatz. Standardmäßig wurde das Annealing bei 50°C für 40 s durchgeführt, eine Elongationszeit von 60 s gewählt und 40 Zyklen eingestellt.

Agarosegel-Analyse und Sequenzierung

Je 10 µl aus dem PCR-Ansatz der TAP-behandelten- und der TAP-unbehandelten Probe wurden zur Analyse auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Fragmente, welche nur in dem TAP-behandelten Ansatz sichtbar waren, wurden sequenziert (3.9).

3.13 Bestimmung von Promotor-Aktivitäten

Im Zuge dieser Arbeit war es von Interesse, die Aktivitäten von identifizierten Promotoren in verschiedenen Mutanten zu bestimmen und zu vergleichen. Auf diese Art sollten regulatorische Effekte auf diese Promotoren aufgedeckt werden.

3.13.1 Das Pneumo-Promotor-Probe Plasmid pPPP2

Zur Bestimmung von Promotor-Aktivitäten wurden die entsprechenden Promotor-Regionen in das integrative Pneumo-Promotor-Probe Plasmid pPPP2 (Abbildung 3.3; Halfmann et al., 2007a) kloniert.

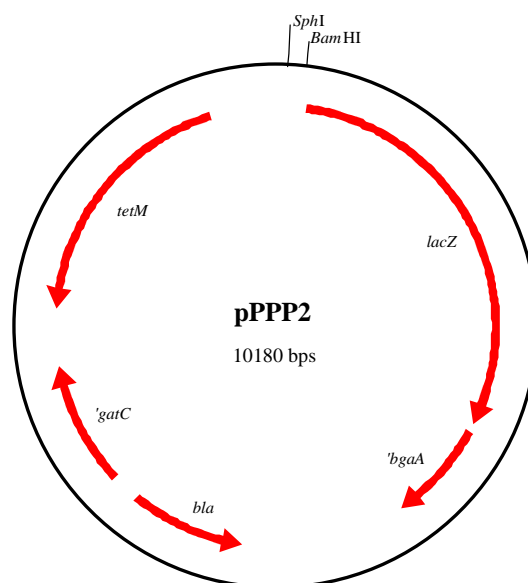


Abbildung 3.3: Karte des Plasmids pPPP2: *SphI* und *BamHI*: Restriktionsschnittstellen zur Klonierung von Promotorfragmenten; *gatC* und *bgaA*: Bereiche zur Integration von pPPP2 in den *bgaA-gatC*-Locus in *Streptococcus pneumoniae* mittels homologer Rekombination; *lacZ*: Promotorloses Gen der β -Galactosidase; *tetM*: Tetracyclin-Resistenzmarker; *bla*: Ampicillin-Resistenzmarker.

Dieses Plasmid bot die Möglichkeit, nach entsprechender Klonierung des zu testenden Promotors upstream eines promotorlosen β -Galactosidase-Gens (*lacZ*), durch Messung der β -Galactosidaseaktivität in einem modifizierten Miller-Assay eine Aussage über die Stärke des entsprechenden Promotors zu treffen. Die Promotoren konnten als *SphI*-/*BamHI*-Fragment vor das β -Galactosidase-Gen *lacZ* kloniert werden. Nach Transformation in *E. coli* DH5 α

(3.1.8), Selektion, Präparation der Plasmide (3.2.3) und Überprüfung der Plasmide durch PCR mit den Primern MCS_fwd_Kontr und 274-lac (Tabelle 2.5, 2.3) konnten die entstandenen Reporterplasmide in die entsprechenden Stämme von *Streptococcus pneumoniae* transformiert werden. Als Integrationsort in das Genom von *Streptococcus pneumoniae* wurde die *bgaA-gatC*-Region gewählt. Durch die Integration wurde das Gen der endogenen β -Galactosidase von *Streptococcus pneumoniae* (*bgaA*) inaktiviert, womit die gemessenen Aktivitäten alleine der auf dem pPP2 kodierten β -Galactosidase zuzuordnen waren. Zur Selektion in *E. coli* und *Streptococcus pneumoniae* besaß pPP2 Resistenzmarker für Ampicillin und Tetracyclin. Die Integration in *Streptococcus pneumoniae* wurde unter Verwendung der Primer EII_fwd_Kontr und tetM_rev_Kontr in einer PCR überprüft.

3.13.2 β -Galactosidaseassay

Im von Miller (1972) vorgestellten β -Galactosidase-Assay findet eine Umsetzung des chromogenen Substrats o-Nitrophenol- β -D-Galactopyranosid (ONPG), katalysiert durch die β -Galactosidase, zu Galactose und o-Nitrophenol (ONP) statt. Das freiwerdende ONP bewirkt eine Gelbfärbung der Lösung, welche bei 420 nm im Photometer gemessen werden kann. Die Extinktion ist dabei ein direktes Maß der β -Galactosidasekonzentration im Ansatz. Prinzipiell entspricht der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Assay dem klassischen Miller-Assay, er wurde jedoch in drei Punkten verändert angewandt. Im Miller-Assay werden die Zellmembranen mit Hilfe von Chloroform durchlässig gemacht, wodurch die β -Galactosidase ins Medium austritt. In dieser Arbeit wurde jedoch die spezifische Eigenschaft der Autolyse von *Streptococcus pneumoniae* ausgenutzt und durch die Zugabe von Triton-X-100 induziert. Hierdurch war sichergestellt, daß die gebildete β -Galactosidase quantitativ durch die Messung bei 420 nm erfasst wurde. Im Falle des Miller-Assays handelt es sich um einen klassischen Endpunktassay. Hierdurch läßt sich ein linearer Verlauf der Messung nicht verifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Verlauf der Bildung des ONPs im Photometer als Kinetik der Zeit aufgezeichnet. Als dritte Änderung wurde als Bezugsgröße für die β -Galactosidaseaktivität nicht die Zelldichte, sondern die Proteinmenge im Reaktionsansatz herangezogen.

Zur Durchführung des β -Galactosidaseassays wurden Vorkulturen in CpH8-Medium der entsprechenden Stämme angesetzt und bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer Zelldichte von N=40-60 wurden 15 ml vorgewärmtes CpH8-Medium zu einer Zelldichte zu N=2-3 angeimpft und weiter bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden 0,5-3 ml Kultur entnommen (die genaue Menge war hierbei abhängig von der erreichten Zelldichte), für 2 min bei 14000 rpm und RT in einer Eppendorfzentrifuge pelletiert und in 500 μ l Lysepuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 37°C. Nach vollständiger Lyse wurden die entnommenen Proben auf Eiswasser gesammelt und gelagert. Zur Durchführung des Assays wurden 200 μ l Lysat oder geeignete Verdünnungen in eine Küvette der Weglänge 1 cm gegeben und in einem auf 30°C geheizten Photometer (Uvikon 922 Spectrophotometer, Kontron Instruments) für 2 min vorgewärmt. Durch Zugabe von 800 μ l ONPG-Lösung wurde die Reaktion gestartet und die OD₄₂₀ in Intervallen von 30 s für 15 min bei 30°C gemessen. Als Referenz diente ein Ansatz mit 200 μ l Lysepuffer und 800 μ l ONPG-Lösung. Die gemessenen Werte für die Absorption bei 420 nm wurden gegen die Zeit aufgetragen und aus dem linearen Bereich der Geraden die Steigung bestimmt. Die Gesamt-Proteinkonzentration des Lysats wurde nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung von RotiQuant (Roche, Karlsruhe) bestimmt. Die Berechnung der β -Galactosidaseaktivität erfolgte als Units in nmol freigesetztes ONP pro mg Protein pro Minute:

$$\text{Units} = \frac{s * V}{\epsilon * d * m} \quad [\text{nmol}/(\text{min} * \text{mg})]$$

d = Weglänge der Küvette = 1cm

ϵ = Absorptionskoeffizient von ONP bei 420 nm

m = Masse des Proteins im Ansatz [mg]

s = Steigung der Absorptions-Zeit-Geraden ($\Delta\text{OD}_{420}/\Delta t$ [1/min])

Tabelle 3.24: Zu β -Galactosidaseassays eingesetzte Lösungen

| Lösung | Komponente | Konzentration/Menge |
|-------------|----------------------------------|---------------------|
| Z-Puffer | Na ₂ HPO ₄ | 60 mM |
| | NaH ₂ PO ₄ | 46 mM |
| | MgSO ₄ | 60 mM |
| | β -ME | 2,7 ml/l |
| | pH 7, Lagerung bei 4°C | |
| Lysepuffer | Z-Puffer | |
| | Triton-X-100 | 0,1 % (v/v) |
| ONPG-Lösung | Z-Puffer | |
| | ONPG | 1 mg/ml |

Sollten β -Galactosidase-Assays in Deletionsmutanten durchgeführt werden, so wurden diese stets mit zwei Klonen der zu untersuchenden Deletionsmutante durchgeführt. Dies sollte, ähnlich wie die Bestimmung der Transformationseffizienz bei der Deletion von Genen (3.11) sicherstellen, daß beobachtete Effekte auf Promotoren auch tatsächlich durch die eingefügte Deletion verursacht wurden.

Im Fall einer Bestimmung der Aktivitätsänderung eines Promotors in Abhängigkeit der jeweiligen Wachstumsphase, wurden im entsprechenden Stamm zusätzlich die Aktivitäten eines nicht regulierten Promotors zu den entsprechenden Zeitpunkten bestimmt. Dies sollte sicherstellen, daß eventuell zu beobachtende Aktivitätsänderungen nicht etwa durch eine Akkumulation von β -Galactosidase im Verlauf des Wachstums oder durch sonstige Effekte, die zu einer Änderung der Aktivität unregulierter Promotoren führen konnten, hervorgerufen wurden. Hierzu wurden die Stämme, in denen die Aktivität eines Promotors in Abhängigkeit der Wachstumsphase untersucht werden sollte, mit dem Promotor-Probe-Plasmid pPP2vegM (Halfmann et al., 2007a) transformiert und die Aktivität des unregulierten Promotors P_{vegM} parallel zu der Aktivität des zu untersuchenden Promotors bestimmt.

3.14 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA Assay)

(nach Halfmann et al., 2007b)

Zum Nachweis der Interaktion eines Proteins mit DNA wurden in der vorliegenden Arbeit Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) durchgeführt. Bei einer Bindung des Proteins an die DNA läuft dieser Protein-DNA-Komplex langsamer in einem Agarosegel als die DNA oder das Protein alleine. Dieses auch als Shift bezeichnete Phänomen wird durch eine Färbung der DNA z.B. mittels Ethidiombromid oder SYBR Green sichtbar. Alle Promotor-tragenden Fragmente, welche zur Bestimmung der Promotoraktivitäten verwendet wurden (3.13), wurden auch in EMSA-Assays eingesetzt. Als Protein, von welchem die mögliche Interaktion mit den entsprechenden Promotor-tragenden Fragmenten getestet werden sollte, stand nach der in 3.21 beschriebenen Methode aufgereinigtes His₆-Reg11 Protein zur

Verfügung. Die Interaktion von His₆-Reg11 mit den entsprechenden Promotoren sollte sowohl in phosphorylierter- als auch in unphosphorylierter Form untersucht werden.

Die zu untersuchenden Promotor-tragenden Fragmente wurden in einem Taq-Standardansatz mittels PCR (3.6) aus chromosomaler DNA von *Streptococcus pneumoniae* mit entsprechenden Primern (Tabelle 2.5, 2.3) amplifiziert und auf eine Konzentration von 2,5 ng/μl in 1 x Bandshift Puffer eingestellt. Zur Phosphorylierung von His₆-Reg11 wurden 30 μg des Proteins mit 12,5 mM Acetylphosphat in 1 x Bandshiftpuffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine Inkubation von His₆-Reg11 in verschiedenen Konzentrationen von 0-10 μM mit je 5 ng DNA. Das Gesamtvolumen betrug jeweils 15 μl in 1 x Bandshift Puffer. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 25°C. Die Ansätze wurden danach mit je 3 μl 6 x Bandshift Probenpuffer versetzt und komplett auf ein 8 % TBE-Polyacrylamidgel geladen. Der Gellauf erfolgte für 1 h bei 15 V/cm und Raumtemperatur in 1 x TBE-Puffer. Gelherstellung und Elektrophorese wurden in Mini-Protean 3 Apparaturen der Firma Bio-Rad durchgeführt. Vor Beladung der Gele wurde ein Vorlauf zur Äquilibrierung des Gels durchgeführt. Hierzu wurde das Gel ohne Proben für 30 min bei 15 V/cm und Raumtemperatur laufen gelassen. Zur Analyse der Gele wurden sie mit SYBR GreenI (Molecular Probes) für 20 min unter leichtem Schütteln gefärbt und in einem FluorImager 595 (Molecular Dynamics) eingescannt.

Tabelle 3.25: Lösungen zur Durchführung von EMSA-Assays

| Lösung | Komponente | Konzentration/Menge |
|----------------------------|---|---------------------|
| 1 x 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-Lösung | H ₂ O | 5 ml |
| | 3 M Na-Acetat, pH 5 | 16,5 μl |
| | DTT | 772,5 mg |
| | Sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C | |
| Acetylphosphat | Acetylphosphat | 10 mM |
| | In 0,5 M Tris pH 7,4 | |
| 5 x TBE | Tris | 1,1 M |
| | EDTA | 25 mM |
| | Borsäure | 900 mM |
| | pH 8,3 | |
| 6 x Bandshift Probenpuffer | TBE | 0,15 x |
| | Glycerin | 40 % (v/v) |
| | Bromphenolblau | 0,2 % (w/v) |
| | pH 7,9 | |
| Polyacrylamidgel 8 % | 5 x TBE | 2 ml |
| | 10 % APS | 50 μl |
| | TEMED | 5 μl |
| | 30 % AA (w/v) 0,8 % BAA (w/v) | 2,7 ml |
| | H ₂ O | 5,25 ml |

3.15 Detektion von Transkripten

Ein Gen ist oftmals in einer Transkriptionseinheit mit anderen Genen organisiert, bildet mit diesen ein funktionell zusammenhängendes Operon (Jacob & Monod, 1961). In der vorliegenden Arbeit wurden im Zuge der Charakterisierung von Genen Transkripte detektiert und deren Längen annähernd bestimmt. Hierzu wurden die im Folgenden beschriebenen Strategien verfolgt.

3.15.1 Detektion mittels PCR auf cDNA

Eine Möglichkeit, die Transkriptlänge von mRNA bei bekanntem Transkriptionsstart zu bestimmen, besteht darin, DNaseI-verdaute Gesamt-RNA unter Verwendung von Random-Hexamer-Primern in einer reversen Transkription in cDNA umzuschreiben. Mit dieser cDNA als Template wird im Anschluß versucht, überlappende Fragmente aus dem genomischen Bereich des vermuteten Transkripts eines Gens oder eines putativen Operons zu amplifizieren. Beim Ausbleiben eines Produktes kann daraus geschlossen werden, daß aus einem Teil dieser Region kein Transkript unter den physiologischen Bedingungen vorhanden war. Als Kontrolle dient hier die Durchführung der gleichen PCRs auf DNaseI-verdauter RNA, jedoch vor der reversen Transkription. Hierbei wird die RNA in 10-fachem Überschuß im Vergleich zur später eingesetzten cDNA-Menge eingesetzt.

Zur Detektion von Transkripten wurde Gesamt-RNA laut Protokoll in 3.3 isoliert, aufgereinigt, mit DNaseI verdaut und quantifiziert. Auf eine Säulenaufreinigung mittels RNeasy Midi-Kits (Qiagen) (3.3.2) wurde jedoch verzichtet, da dies zum Verlust von sehr kleinen Transkripten <100nt führen kann. Gegebenenfalls wurde erneut phenolisiert und gefällt (3.3.2), bis eine ausreichende Reinheit erreicht wurde.

10 µg der isolierten Gesamt-RNA wurden in Standardansätzen zur reversen Transkription unter der Verwendung von Random-Hexamer-Primern (Roche) eingesetzt (3.7). Unter Verwendung entsprechender Primerpaare (2.3, Tabelle 2.5) wurden in 50 µl Taq-Standardansätzen mit 100 ng der hergestellten cDNA und zusätzlich mit 1 µg Gesamt-RNA als Template PCRs mit folgendem Programm durchgeführt.

Tabelle 3.26: PCR-Programm zur Bestimmung von Transkriptlängen

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [s] |
|----------------------|-----------------|-----------------|
| 1. Denaturierung | 96 | 600 |
| 2. Denaturierung | 96 | 60 |
| 3. Primer-Annealing | 50 | 60 |
| 4. Elongation | 72 | 60 ¹ |
| 5. finale Elongation | 72 | 300 |

¹) Die Schritte 2-4 wurden 30x wiederholt.

Von den PCR-Ansätzen wurden je 10 µl mit 2 µl 6 x Probenpuffer vermischt und mittels Elektrophorese in einem 1 % Agarosegel analysiert.

3.15.2 Detektion mittels Northern-Blot-Analyse

(Thomas, 1980; modifiziert)

Eine weitere Möglichkeit um Transkripte zu detektieren, bzw. deren Länge zu bestimmen, stellt die Northern-Analyse dar. Isolierte Gesamt-RNA wird zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Im Anschluß wird das Transkript mit einer zu einem Teil des Transkriptes komplementären (hier zum 5'-Ende der Transkripte), meist mit Digoxigenin (DIG) markierten RNA-Sonde hybridisiert. Über einen DIG-spezifischen, mit Alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP) wird das markierte Transkript, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, mit Hilfe des chemilumineszenten Substrats CDP-Star detektiert. Hierbei führt die Dephosphorylierung von CDP-Star durch die Alkalische Phosphatase (AP) zu einem metastabilen Dioxetan-Phenolat-Anion, welches unter Lichtemission bei 466 nm zerfällt und so die an das Transkript hybridisierte Sonde auf einem Röntgenfilm sichtbar macht.

Zur Detektion von eventuellen Transkripten mittels Northern-Analyse wurde Gesamt-RNA aus der exponentiellen Wachstumsphase und nach Erreichen der stationären Phase aus *Streptococcus pneumoniae* wie unter 3.3 beschrieben isoliert, aufgereinigt, mit DNaseI verdaut und quantifiziert. Hierbei wurde abermals auf eine Säulenaufreinigung mittels RNeasy Midi-Kits (Qiagen) (3.3.2) verzichtet (vgl. 3.15.1). Gegebenenfalls wurde erneut phenolisiert und gefällt (3.3.2), bis eine ausreichende Reinheit erreicht wurde. Von beiden Isolaten wurden je 5 µg RNA für 15 min bei 65°C denaturiert und sofort für 2 min in Eiswasser gestellt. Danach wurden die Proben mit 5 µl 2 x RNA-Ladepuffer (Fermentas) vermischt und in einem denaturierenden 1 % Agarosegel (3.4) mit 5 V/cm für eine Dauer von 5 h aufgetrennt. Als Größenstandard wurde ein digoxigeninmarkierter Molekulargewichtsmarker (RNA molecular weight marker I, Roche) aufgetragen. Im Anschluß wurde das Gel kurz in Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert (3.4). Äquibriert wurde das Gel 2 x 15 min in 20 x SSC und RT auf einem Taumeltisch (Rocky 3D). Der Transfer der aufgetrennten RNA mittels Kapillarblot (Sambrook et al., 1989) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Nr. 1417240, Roche) wurde in 20 x SSC-Hochsalzpuffer über Nacht durchgeführt. Hierzu wurde eine Apparatur gemäß Abbildung 3.4 aufgebaut, wobei darauf geachtet wurde, daß keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Die RNA wird bei dieser Methode alleine durch die Kapillarwirkung des eingesetzten Puffers auf die Membran transferiert (schwarzer Pfeil, Abbildung 3.4).

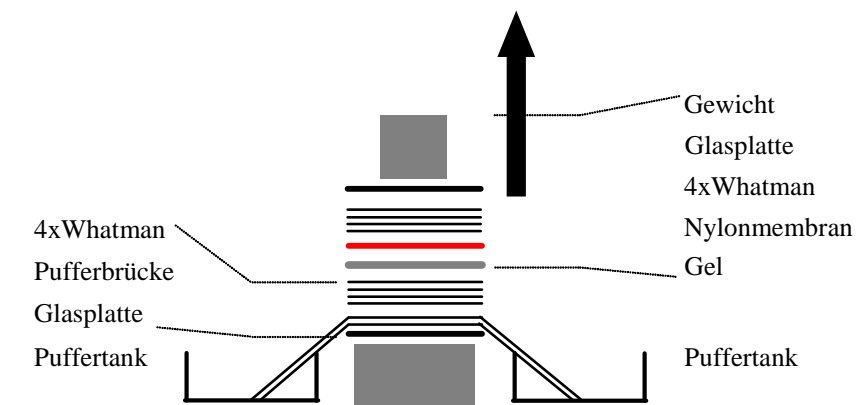


Abbildung 3.4: Aufbau der Blotapparatur zum Kapillarblot von RNA: Durch die entstehende Kapillarwirkung (schwarzer Pfeil) diffundiert die RNA aus dem Gel (grauer Balken) und wird auf der positiv geladenen Nylonmembran (rot) immobilisiert.

Auf eine Glasplatte wurden zwei Streifen (10 cm x 40 cm), mit 20 x SSC getränktes Whatman Papier (3 mm Chr, Schleicher & Schuell) als Pufferbrücke gelegt, welche mit ihren Enden in zwei Puffertanks mit genügend 20 x SSC getaucht wurden. Auf diese wurden vier weitere, in 20 x SSC getränkte Streifen Whatman Papier geschichtet (13,7 cm x 10 cm). Danach folgte das äquilibrierte Gel mit der Oberseite nach unten, sowie die ebenfalls in 20 x SSC äquilibrierte Nylonmembran. Den Abschluß bildeten vier weitere Lagen Whatman Papier (13,7 cm x 10 cm), gefolgt von einem genügend großen Stapel Papierhandtücher, einer Glasplatte und einem Gewicht von ~600 g. Nach erfolgtem Transfer wurde das Gel zur Kontrolle des Transfers mit Ethidiumbromid gefärbt und begutachtet. Die transferierte RNA wurde im Anschluß durch UV-Crosslinking (1200 µJ/cm², Crosslinker Modell BLX254, MWG Biotech, Ebersberg) auf der Nylonmembran kovalent gebunden. Es folgte eine Inkubation der Membran für 30 min bei 50°C mit 20 ml vorgewärmten Prähybridisierungspuffer in einem Hybridisierungssofen (HYBAID) unter mäßiger Rotation.

Die Hybridisierung mit der 5'-DIG-markierten DNA-Sonde (10 pM/ml) wurde in 20 ml vorgewärmtem Hybridisierungspuffer bei 50°C über Nacht im Hybridisierungsofen bei leichter Rotation durchgeführt. Alle weiteren Wasch- und Äquilibrierungsschritte, das Blocken der Membran, sowie die Antikörperbehandlung mit Anti-DIG-AP fab-Fragment (Roche) wurden laut Protokoll der Firma Roche (DIG Wasch and Block Buffer Set) durchgeführt. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Behandlung der Membran mit CDP-Star laut Herstellerangaben (Roche). Die Signale wurden auf Röntgenfilmen (ECL Hyperfilm, Amersham Biosciences) bei verschiedenen Expositionszeiten dokumentiert. Die Röntgenfilme wurden manuell laut Herstellerprotokoll entwickelt. Die Größenbestimmung der detektierten Signale erfolgte über eine Bestimmung der Lauflänge im Vergleich zu Fragmenten bekannter Größe.

Tabelle 3.27: Zur Northern-Analyse eingesetzte Lösungen

| Lösung | Komponente | Konzentration/Menge |
|--|---|---------------------|
| 20 x SSC | NaCl | 3 M |
| Prähybridisierungspuffer | Na ₃ -Citrat x 2H ₂ O | 0,3 M |
| | SDS | 5 % (w/v) |
| | Na ₂ PO ₄ | 200 mM |
| Hybridisierungspuffer | Blocking Reagent (Roche) | 2 % (v/v) |
| | Prähybridisierungspuffer | 20 ml |
| 5'-DIG-markierte DNA-Sonde | 5'-DIG-markierte DNA-Sonde | 10 pM/ml |
| Anti-DIG-AP-fab Fragment (Roche) | | 100 µM |
| DIG Wasch and Block Buffer Set (Roche) | | 0,75 U/µl |
| CDP-Star (Roche) | | 0,25 mM |

3.16 Mikroarray-gestützte globale Transkriptomanalyse

Eine globale Transkriptomanalyse mittels Mikroarraytechnologie bietet die Möglichkeit, durch den Vergleich der Transkriptome verschiedener Stämme, Effekte und Kompensationsmechanismen, welche durch Mutationen hervorgerufen wurden, zu charakterisieren. Prinzipiell gliederte sich die Transkriptomanalyse in der vorliegenden Arbeit in fünf Abschnitte. Die Herstellung der Mikroarray-Slides, die Isolierung von Gesamt-RNA aus den zu vergleichenden Stämmen, die Markierung von Gesamt-RNA mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, die Hybridisierung und die Analyse der Daten stellten die durchgeführten Arbeitsschritte dar.

3.16.1 Die Oligo-Sets für *Streptococcus pneumoniae* R6

Das Oligo-Set von MWG Biotech AG

Die in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen wurden zum größten Teil auf der Basis eines kommerziell erworbenen *Streptococcus pneumoniae* R6 Oligonukleotid-Sets der MWG Biotech AG durchgeführt. Das eingesetzte Oligonukleotid-Set umfasste 2018 genspezifische 50mer-Oligonukleotide (Oligos). Zusätzlich befanden sich 3 für *Arabidopsis* spezifische Oligos als Negativkontrollen im Set. Von 28 der 2046 im Genom von *Streptococcus pneumoniae* R6 annotierten offenen Leseraster war aufgrund der hohen Sequenzhomologie kein Oligo vorhanden. Die 2018 Oligos waren jeweils komplementär zu den letzten 50 Nukleotiden am 3'-Ende der betreffenden Gene. Am 5'-Ende besaßen die Oligos einen Amino-C6-Linker, welcher als reaktive Gruppe zur kovalenten Bindung auf den

zur Herstellung der Mikroarray-Slides verwendeten EpoxySlides fungierte. Die Oligos befanden sich in 6 Mikrotiterplatten als 50 μM -Lösung in Spotpuffer. Zusätzlich befanden sich in jeder Mikrotiterplatte Pufferkontrollen. Die Platten wurden bei -20°C , versiegelt mit Adhäsionsfolie (SealPlate, EXCEL Scientific), aufbewahrt.

Kombiniertes *Streptococcus pneumoniae* R6/TIGR4 Oligo-Set

Gegen Ende der vorliegenden Arbeit stand das OligoSet von MWG Biotech AG nicht mehr zur Verfügung. Im Nano & Bio-Center der TU Kaiserslautern wurde stattdessen ein Oligo-Set designt, welches neben 2347 für alle in R6 annotierten Gene spezifischen-, sowie für intergenische Bereiche spezifischen 70mer Oligonukleotide enthielt (www.nbz.uni-kl.de/de/bio/microarray/r6tigr4oligos.html). Zudem enthielt das Oligo-Set weitere 616 Oligos, von welchen 488 spezifisch für Gene und intergenische Bereiche in *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 waren, 44 spezifisch für tRNAs und repetitiven Sequenzen waren und 84 Oligos Positiv-, Negativ- und Stringenzkontrollen darstellten. Am 5'-Ende besaßen die Oligos einen Amino-C6-Linker. Die Oligos befanden sich in 9 Mikrotiterplatten als 10 μM Lösung in Spotpuffer. Die Platten wurden bei -20°C , versiegelt mit Adhäsionsfolie (SealPlate, EXCEL Scientific), aufbewahrt.

3.16.2 Herstellung der Mikroarray-Slides

Zur Herstellung der Mikroarray-Slides wurde ein SpotArray24 Microarray Spotting System von PerkinElmer und 32 SMP3-Pins (Telechem) verwendet. Das eingesetzte Spotting System verwendet das Kontaktverfahren zum Aufbringen der Oligos auf Epoxy-Slides (Schott Nexterion slide E). Die Steuerung des Herstellungsprozesses wurde über die zugehörige SpotArray-Software (PerkinElmer) vorgenommen. Vor Beginn des Spottings wurden die eingesetzten Epoxy-Slides mit einem Diamantschreiber beschriftet. Die Slides wurden in die Spottingkammer verbracht, die Mikrotiterplatten mit den Oligos aufgetaut und bei 800xg und 4°C für 2 min zentrifugiert. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Platten bei 4°C gelagert. Folgende Parameter wurden mittels der SpotArray-Software eingestellt (Tabelle 3.28).

Tabelle 3.28: Spotting Protokoll der ScanArray-Software

| Parameter | MWG Chipset | R6/TIGR4 Chipset |
|--|--------------------|-------------------------|
| Number of plates per plate change | 2 | 3 |
| Read barcodes on plates | no | no |
| Read barcodes on substrates | no | no |
| Number of pre-prints after each sample load | 10 | 10 |
| Pre-print spot spacing, center to center [μm] | 500 | 500 |
| Number of times to print each spot within array | 2 | 2 |
| Nominal spot diameter [μm] | 150 | 150 |
| Spot spacing, center to center [μm] | 345 | 345 |
| Location on array on substrate | center | center |
| Leave space for a barcode/label on bottom | yes | yes |
| Printing approach velocity [mm/s] | 10 | 10 |
| Printing departure velocity [mm/s] | 10 | 10 |
| Printing overtravel [μm] | 0 | 0 |
| Printing dwell time [ms] | 400 | 400 |
| Sample load overtravel [μm] | 100 | 100 |
| Sample load dwell time [ms] | 2500 | 2500 |
| Substrate thickness [mm] | 1,1 | 1,1 |
| Maximum number of spots per sample load | 120 | 120 |
| Speed of printhead X-Y motion | fast | fast |
| Lenght of wash procedure [s] | 6 | 6 |
| Number of times to wash | 4 | 4 |
| Lenght of dry procedure after washing [s] | 3 | 3 |

| | | |
|--|-----|-----|
| Do not print when humidity is outside of acceptable range | yes | yes |
| Minimum acceptable humidity [%RH] ¹ | 50 | 50 |
| Maximum acceptable humidity [%RH] ¹ | 70 | 70 |
| Control humidity level during printing procedure | yes | yes |
| Target humidity level [%RH] ¹ | 65 | 65 |
| Do not print when temperature is outside of acceptable range | yes | yes |

¹) RH=relative humidity

Nach der Durchführung des Spottings wurden die Slides für 30 min in einer Feuchtekkammer bei RT inkubiert und im Anschluß 60 min bei 85°C gebacken. Diese beiden Schritte bewirkten die Immobilisierung der gespotteten Oligos durch Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen der Amino-C6-Gruppe am 5'-Ende der Oligos und der Epoxy-Gruppe auf der Slideoberfläche. Vom Spotting wurde automatisch ein sogenanntes *.gal-File erstellt, in welchem die genaue Position jedes einzelnen Oligos auf dem Slide festgehalten und welcher für die Auswertung der Transkriptomanalysen herangezogen wurde.

Auf den so hergestellten Slides befanden sich im Fall des MWG Oligo-Sets und des R6/TIGR4 Oligo-Sets alle Oligos und Pufferkontrollen in je zweifacher Ausführung und in einer zuvor festgelegten Anordnung. Die Anordnung der genspezifischen Oligos entsprach hierbei absichtlich nicht ihrer Abfolge im Genom von *Streptococcus pneumoniae*.

Tabelle 3.29: Zur Herstellung der Mikroarray-Slides eingesetzte Puffer

| Lösung | Komponente | Konzentration |
|------------|------------|---------------|
| Spotpuffer | SSC | 3 x |
| | Betain | 1,5 M |

3.16.3 Markierung von Gesamt-RNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Um die Veränderungen im Transkriptom einer zu untersuchenden Mutante im Vergleich zum Parentalstamm aufzudecken, müssen beide RNA-Isolate mit verschiedenen Fluorophoren markiert werden. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Fluorophore waren Cy3 und Cy5 (PerkinElmer) und wurden in Form gelabelter dCTPs im Zuge einer reversen Transkription der isolierten Gesamt-RNA in die entstehende cDNA eingebaut.

Die zur Markierung eingesetzten RNA-Isolate aus dem zu untersuchenden Stamm 1, sowie dem Referenzstamm 2 wurden aus je 100 ml exponentiell wachsender Kulturen der gleichen Zelldichte wie unter 3.3 beschrieben isoliert. Zur Markierung wurden je 2 x 54 µg RNA beider Stämme eingesetzt. Hierbei wurden 54 µg RNA von Stamm 1 mit Cy3 und 54 µg RNA von Stamm 1 mit Cy5 markiert. Mit zwei Ansätzen zu 54 µg RNA von Stamm 2 wurde ebenso verfahren. Die Markierung der insgesamt 4 Ansätze in einer reversen Transkription wurde unter Verwendung des LabelStar Array Kits (Qiagen) laut Herstellerangaben durchgeführt. Als Primer kamen hier Random-Octamerprimer (Endkonzentration 2 µM; MWG) zum Einsatz.

Die Aufreinigung der Markierungsansätze erfolgte unter Verwendung des LabelStar Array Kits (Qiagen) und wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Die 4 Ansätze wurden nach ihrer Aufreinigung in je 20 µl Elutionspuffer (LabelStar Array Kit) eluiert und bis zur Hybridisierung bei -80°C aufbewahrt.

3.16.4 Hybridisierung

Die Ansätze mit markierter cDNA aus 3.16.3 wurden zur Hybridisierung mit den, wie unter 3.16.2 beschrieben, hergestellten Oligo-Slides verwendet. Hierbei wurde die Cy3-markierte cDNA von Stamm 1 zusammen mit der Cy5-markierten cDNA von Stamm 2 in einer Hybridisierung auf einem Slide eingesetzt. Parallel hierzu wurde die Cy5-markierte cDNA von Stamm 1 zusammen mit der Cy3-markierten cDNA von Stamm 2 in einer weiteren Hybridisierung eingesetzt. Dieser sogenannte DyeSwap stellt eine interne Kontrolle der Ergebnisse dar. Zugleich verdoppelt sich hierdurch die zur statistischen Auswertung (3.16.5) verfügbare Menge an Daten, wodurch die Statistik an sich an Aussagekraft gewinnt. Die maschinelle Hybridisierung wurde in einer Hybridisierstation der Firma Tecan (HS400) durchgeführt.

Vor der Hybridisierung wurden die vier markierten cDNA-Isolate aus 3.16.3 in einer SpeedVac unter Lichtausschluß getrocknet. Die zu vergleichenden Proben wurden paarweise in insgesamt 10 µl H₂O aufgenommen (Cy3-markierte cDNA von Stamm 1 mit Cy5-markierter cDNA von Stamm 2, sowie Cy5-markierte cDNA von Stamm 1 mit Cy3-markierter cDNA von Stamm 2). Zu den so hergestellten beiden Hybridisierungsansätzen wurden je 90 µl Hybridisierungspuffer (Nexterion Hyb und Formamid, 1:1) gegeben und vermischt. Die Ansätze wurden für 5 min bei 96°C denaturiert und bei dem Schritt „Probeninjektion“ (Tabelle 3.30) zur Hybridisierung mit den Oligos auf den Mikroarray-Slides zugegeben. Das an der Hybridisierungsstation eingestellte Hybridisierungsprotokoll ist in Tabelle 3.30 dargestellt. Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die hybridisierten Slides bis zum Einscannen (3.16.5) in der Stickstoffatmosphäre der Hybridisierungsstation unter Lichtausschluß belassen.

Tabelle 3.30: Hybridisierungsprotokoll

| Komponente | Waschdauer [min] | Applikationsdauer | Temperatur [°C] | Zyklen |
|--|------------------|-------------------|-----------------|--------|
| 0,1 % SDS | 0,5 | 0,5 min | 25 | |
| H ₂ O | 0,5 | | 25 | |
| Prähybridisierungspuffer | 0,5 | 30 min | 42 | |
| Prähybridisierungspuffer | 0,5 | | 40 | |
| Probeninjektion | | | 40 | |
| Hybridisierung | | 16 h | 40 | |
| 2 x SSC, 0,1 % SDS | 1 | 0,5 min | | 2 |
| 1 x SSC | 1 | 0,5 min | | 2 |
| 0,1 x SSC | 1 | 0,5 min | | |
| Trocknen | | 3 min | 30 | |
| Aufbewahrung in Stickstoffatmosphäre bis zum Scannen | | | | |

Tabelle 3.31: Zur Hybridisierung eingesetzte Puffer

| Lösung | Komponente | Konzentration |
|--------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Prähybridisierungspuffer | SSC | 5 x |
| | SDS | 0,1 % (w/v) |
| | BSA | 0,5 mg/ml |
| Hybridisierungspuffer | Nexterion Hyb/Formamid 1:1 | |
| 0,1 % SDS | SDS | 0,1 % (w/v) in H ₂ O |
| 0,1 % SDS 2 x SSC | SDS | 0,1 % (w/v) |
| | SSC | 2 x in H ₂ O |
| 1 x SSC | SSC | 1 x in H ₂ O |

Nach der so durchgeführten Hybridisierung konnten nunmehr 2 hybridisierte Slides gescannt und analysiert werden. Slide 1 lieferte den Vergleich von Cy3-markierter cDNA von Stamm 1

und Cy5-markierter cDNA von Stamm 2 und Slide 2 lieferte den Vergleich von Cy5-markierter cDNA von Stamm 1 und Cy3-markierter cDNA von Stamm 2.

3.16.5 Scannen und Analyse der Hybridisierungen

Scannen der hybridisierten Slides

Die Ergebnisse der Hybridisierungen wurden als *.tiff-Dateien in einem ScanArray4000 Microarray Analysis System erfasst. Durch Anregung der Cy3-markierten cDNA durch einen Laser der Wellenlänge 550 nm und Anregung der Cy5-markierten cDNA durch einen Laser der Wellenlänge 633 nm erfolgte hierbei das Scannen der hybridisierten Slides. Die Steuerung des Scannes erfolgte durch die ScanArray Express Software 2.1. Unter Verwendung der EasyScan-Option wurden die Slides zunächst mit einer niedrigen Auflösung von 50 μM gescannt, wobei die Photomultiplier Tube-Stärke (PMT) in der Form justiert wurde, daß beide Fluoreszenzkanäle in etwa die gleichen Signalintensitäten lieferten. Unter Verwendung der so ermittelten PMT-Werte wurden die hybridisierten Slides im Anschluß mit einer Auflösung von 10 μm gescannt.

Analyse der Hybridisierungen

Zur Analyse der eingescannten Slides wurde zunächst die EasyQuant-Methode der ScanArray Express Software verwendet. Hierzu wurden die eingescannten *.tiff-Dateien der hybridisierten Slides und die bei dem Spotting der Slides erstellte *.gal-Datei (3.16.2), welche die genaue Position jedes Oligos auf dem Slide und so die Information zum komplementären Gen in *Streptococcus pneumoniae* R6 liefert, benötigt. Die Quantifizierung der gemessenen Cy3- und Cy5-Intensitäten erfolgte durch die Adaptive circle-Option der Software. Die zur Normalisierung eingestellte Methode war LOWESS (Locally Weighted Scatter Plot Smoothing, Yang et al., 2001). Das Ergebnis der Quantifizierung wurde als *.csv-Datei gespeichert und in Excel weiterverarbeitet. Nach Überprüfung der Kontrollspots wurden diese aus der Ergebnisdatei entfernt und separat gespeichert. Spots, deren Intensität zu gering war, also ein Verhältnis Signal/Hintergrund von < 3 hatten, wurden gelöscht. Spots, welche durch die ScanArray Express Software als unbrauchbar bezeichnet wurden, wurden nach manueller Überprüfung ebenfalls gelöscht. Die modifizierte Ergebnisdatei wurde gespeichert und unter Verwendung der auf der Internetseite des Nano & Bio-Center der TU Kaiserslautern (www.nbc3.biologie.uni-kl.de/) bereitgestellten Anwendungen ausgewertet. Zur Auswertung standen durch die zuvor beschriebene Hybridisierung je vier Werte der gescannten Signalintensitäten aus den Stämmen 1 und 2 von jedem der durch komplementäre Oligos erfassten Gene aus *Streptococcus pneumoniae* R6 zur Verfügung. Zwei Werte ergaben sich alleine aus der Tatsache, daß jedes Oligo zweifach auf den Slides vorhanden war. Zwei Weitere ergaben sich durch die parallel laufenden Ansätze der Hybridisierung mit unterschiedlich markierter cDNA der beiden Stämme (Dye Swap). Alle Werte wurden in eine Excel-Datei kopiert und entsprechend der Vorgaben (www.nbc3.biologie.uni-kl.de/) formatiert. Alle Intensitätswert-Verhältnisse wurden danach unter Verwendung der Global Loess-Funktion (www.nbc3.biologie.uni-kl.de/ → Microarray → Normalization → Global) normalisiert. Die normalisierten Verhältnisse wurden wiederum in eine Excel-Datei kopiert und nach entsprechender Formatierung (www.nbc3.biologie.uni-kl.de/) mit der Funktion Ratio-Testing (www.nbc3.biologie.uni-kl.de/ → Microarray → Testing → Ratios) analysiert. Hierdurch wurden die Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in den verglichenen Stämmen 1 und 2 ermittelt. Es handelte sich hierbei um eine auf einem t-test basierende Signifikanztestung. Von den Verhältnissen der gescannten Intensitäten aus Stamm 1 und 2 wurden Logarithmen berechnet. Dies war notwendig, da sich Verhältnisse nicht normal, sondern log-normal verteilen (Limpert et al., 2001). Entsprachen die berechneten

Logarithmen der Verhältnisse einer log-normalen Verteilung, so wurde mit ihnen ein t-test durchgeführt. Dieser Test lieferte ein Konfidenzintervall für den wahren Wert des Verhältnisses und einen P-Wert für jedes Gen (Limpert et al., 2001). Aus den P-Werten werden angepasste P-Werte berechnet, anhand welcher die False Discovery Rate (FDR, Benjamini & Hochberg, 1995) und der Family Wise Error Rate (FWER, Dudoit et al., 2002) abgeschätzt werden können. Bei der Analyse der Mikroarraydaten in der vorliegenden Arbeit wurden nur solche Gene als signifikant angesehen, welche einen adjustierten P-Wert $<0,01$, also welche eine sogenannte False Discovery Rate (FDR) von kleiner als 1 % besaßen. Um zusätzlich auch die biologische Signifikanz der so als signifikant differentiell exprimiert ermittelten Gene zu gewährleisten, wurden nur Gene berücksichtigt, welche eine 2-fach erhöhte- bzw. erniedrigte Transkriptmenge (Verhältnis >2 oder $<0,5$) zeigten.

Die beschriebene Transkriptomanalyse zweier zu vergleichender Stämme wurde jeweils mit mindestens zwei voneinander getrennt angezogenen Kulturen beider Stämme durchgeführt. Somit standen zur statistischen Auswertung mindestens 8 Intensitätswerte der gemessenen Transkripte jedes Stammes, also insgesamt je 8 Transkriptverhältnisse zur Verfügung.

3.17 Genomischer Southern-Blot

(Smith & Summers, 1980; Southern, 1975)

Durchführung des Southern-Blots

Zur Durchführung eines genomischen Southern-Blots zwecks Vergleich einer bestimmten Region in verschiedenen Stämmen wurde zunächst chromosomale DNA der zu vergleichenden Stämme wie unter 3.2.1 beschrieben isoliert. Die chromosomale DNA wurde mit mehreren verschiedenen, an bestimmten Stellen up- und downstream der auf die An- oder Abwesenheit eines bestimmten Abschnitts zu prüfenden Region in getrennten Ansätzen verdaut. Hierzu wurde je 1,5 μg DNA der beiden Stämme in einer entsprechenden Anzahl getrennter Ansätze eingesetzt. Der Verdau wurde wie unter 3.10.1 beschrieben durchgeführt. Im Anschluß wurden die Ansätze mittels Agarosegelelektrophorese (3.4) in einem 0,8 % Gel mit 2 V/cm und RT über Nacht aufgetrennt. Hierbei wurde zur späteren Größenbestimmung detektierter Signale ein Digoxigenin-markierter Größenstandard (DNA Molecular Weight Marker VII-Dig labelled, Roche) zusätzlich mit aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde das Gel zur Kontrolle des Verdau kurz in Ethidiumbromid gefärbt und begutachtet. Im Anschluß erfolgte der Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Nr. 1417240, Roche) mittels Kapillartransfer (Sambrook et al., 2000), wobei kein wie unter 3.15.2 verwendeter Puffertank benötigt wurde. Für den Kapillartransfer der verdauten DNA genügte hierbei das im Gel gespeicherte Flüssigkeitsvolumen. Das Gel wurde zunächst 2 x 15 min in 0,25 M HCl auf einem Taumeltisch (Rocky 3D) bei RT inkubiert. Es folgte eine zweimalige Inkubation bei RT in Denaturierungslösung und eine Inkubation in Ammoniumacetatlösung für 60 min bei RT. Danach wurde das Gel mit der Slotseite nach unten auf eine Glasplatte gelegt. Die zuvor auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran wurde luftblasenfrei aufgelegt, gefolgt von drei Lagen Whatman Papier (3 mm Chr, Schleicher & Schuell). Abschließend wurden ca. 5 cm Papierhandtücher aufgestapelt und mit einer weiteren Glasplatte, sowie einem Gewicht ($\sim 0,6$ kg) beschwert. Der Transfer erfolgte bei RT über Nacht. Nach dem Blot wurde die DNA auf der Membran durch UV-Crosslinking immobilisiert ($1200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$, Crosslinker Modell BLX254, MWG Biotech, Ebersberg). Die Prähybridisierung wurde für 1 h bei 70°C in 20 ml Hybridisierungspuffer in einem Hybridisierungsofen (HYBAID) durchgeführt. Zur anschließenden Hybridisierung mit einer eigens hergestellten DIG-markierten DNA-Sonde wurde die Nylonmembran über Nacht in 20 ml Hybridisierungspuffer (+3 μg DIG-markierte DNA-Sonde) bei 70°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Die Sonde wurde zuvor für 10 min bei 100°C denaturiert und

bis zur Verwendung auf Eiswasser gehalten. Nach der Hybridisierung wurde die Membran 2 x für 5 min in Stringenzwaschlösung 1 bei RT auf einem Taumeltisch inkubiert, gefolgt von einer zweimaligen Inkubation in Stringenzwaschlösung 2 bei 65°C (berechnet für die eingesetzte Sonde) für 15 min. Danach wurde für 2 min in Detektionspuffer 1, 30 min in Detektionspuffer 2, sowie für 30 min in Antikörperlösung bei RT inkubiert. Es wurde erneut 2 x 15 min in Detektionspuffer 1, gefolgt von 2 min in Detektionspuffer 3 inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mittels Farbreaktion des an der DIG-markierten DNA-Sonde hybridisierten Anti-DIG-AP fab-Fragments in Farblösung bei 37°C.

Herstellung der digoxigeninmarkierten DNA-Sonde

Die digoxigeninmarkierte DNA-Sonde wurde durch Markierung eines ca. 300 bp PCR-Produktes, welches komplementär zu einem Teil des nach einem Restriktionsverdau chromosomaler DNA zu detektierenden DNA-Fragments war, hergestellt. Hierzu wurden 3 µg PCR-Produkt 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und auf Eiswasser gestellt. Folgender Ansatz wurde zur Markierung mit digoxigeninlabeltem dUTP (DIG DNA Labeling Mix, Roche) mittels Klenow-Enzym (Roche) pipettiert:

| | |
|------------------------------------|----------|
| PCR-Produkt | x µl |
| Hexanucleotide Mix (10 x, Roche) | 6 µl |
| Klenow-Enzym (2 U/µl, Roche) | 3 µl |
| DIG DNA Labeling Mix (10 x, Roche) | 6 µl |
| H ₂ O | ad 60 µl |

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C im Heizwasserbad inkubiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.32: Puffer zur Durchführung eines genomischen Southern-Blots

| Lösung | Komponente | Konzentration/Menge |
|------------------------|----------------------------------|---------------------|
| HCl 0,25 M | HCl 37 % | 21 ml |
| | H ₂ O | 979 ml |
| Denaturierungslösung | NaCl | 1,5 M |
| | NaOH | 0,5 M |
| Ammoniumacetatlösung | Ammoniumacetat | 1 M |
| | NaOH | 0,1 N |
| Hybridisierungslösung | SSC | 5 x |
| | N-Laurylsarcosin | 0,1 % (w/v) |
| | SDS | 0,02 % (w/v) |
| | Blocking Reagenz (Roche) | 10 g/l |
| Stringenzwaschlösung 1 | SSC | 2 x |
| | SDS | 0,1 % (w/v) |
| Stringenzwaschlösung 2 | SSC | 0,2 x |
| | SDS | 0,1 % (w/v) |
| Detektionspuffer 1 | Tris pH 7,5 | 100 mM |
| | NaCl | 150 mM |
| Detektionspuffer 2 | Detektionspuffer 1 | |
| | Blocking Reagenz (Roche) | 1 % (w/v) |
| Antikörperlösung | Detektionspuffer 2 | |
| Detektionspuffer 3 | Anti-DIG-AP fab-Fragment (Roche) | 0,75 U/µl |
| | Tris pH 9,5 | 100 mM |
| Farblösung | NaCl | 100 mM |
| | MgCl ₂ | 50 mM |
| | Detektionspuffer 3 | |
| | NBT/BCIP Stock Solution (Roche) | 60 µl/10 ml Puffer |

3.18 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(nach Laemmli, 1970)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde eine denaturierende, diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde eine vertikale Apparatur verwendet. Durch Zugabe von SDS wurden die Proteine in Lösung denaturiert, d.h. die Auftrennung nach ihrer Größe wurde nicht durch Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen beeinflusst. Zusätzlich wurden die Proteine durch das SDS gleichmäßig negativ geladen, wodurch sie bei der Elektrophorese in Richtung Anode wanderten. Die Beweglichkeit der Proteine ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molmasse und direkt für die Auftrennung nach ihrer Größe verantwortlich. Als Molekulargewichtsstandard wurde entweder ein peqGOLD Protein-Marker II (peqlab) oder ein LMW Calibration Kit (Amersham Biosciences) verwendet.

3.18.1 Herstellung der Gele und Elektrophorese

Die zur Elektrophorese benötigten Glasplatten (130 x 130 mm) wurden mit 0,1 % SDS, destilliertem Wasser und Ethanol gereinigt. Die beiden Glasplatten (Ohren- und Rückenplatte) wurden, durch 1,2 mm dicke Spacer getrennt, aufeinander gelegt, mit Klammern fixiert und mit heißer, 2 %iger Agaroselösung an den Rändern abgedichtet. Zwischen die beiden Platten wurde zuerst das ca. 8 cm hohe Trenngel gegossen.

Tabelle 3.33: Trenngel (12 %)

| Komponente | Konzentration/Menge |
|---|---------------------|
| H ₂ O millipore | 8,75 ml |
| Lower Tris | 6,25 ml |
| Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1;Rotiphorese Gel30, Roth) | 10 ml |
| TEMED | 40 µl |
| APS 10 % | 300 µl |

Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde das Trenngel mit 1 ml n-Butanol überschichtet. Sofort nach Erscheinen zweier klarer Linien an der Grenzschicht zwischen Trenngel und n-Butanol wurde das n-Butanol entfernt, die Oberfläche des Trenngels mit H₂O millipore gespült und mit Papier getrocknet. Auf das Trenngel wurde das ca. 2cm hohe Sammelgel gegossen.

Tabelle 3.34: Sammelgel (3,3 %)

| Komponente | Konzentration/Menge |
|---|---------------------|
| H ₂ O millipore | 6,4 ml |
| Upper Tris | 2,5 ml |
| Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1;Rotiphorese Gel30, Roth) | 1,1 ml |
| TEMED | 40 µl |
| APS 10 % | 300 µl |

Direkt nach dem Einfüllen zwischen die Glasplatten wurde ein Plexiglaskamm von oben zwischen die Glasplatten gesteckt, wobei die Zähne des Kammes vollständig und luftblasenfrei in die Lösung eintauchen mussten. Nach ca. 45 min Polymerisation wurde der Kamm und der untere Spacer gezogen und das fertige Gel in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Die Elektrophorese-Kammern wurden mit Laemmli-puffer befüllt. Die Proben wurden mit 2 x bzw. 5 x SDS-Probenpuffer vermischt und nach 10 min Kochen im Wasserbad auf das Polyacrylamidgel geladen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von

100 Volt für das Sammelgel und wurde beim Erreichen der Trennlinie von Sammel- und Trenngel durch die Bromphenolblau-Bande bei 200 Volt fortgesetzt. Nach dem Gellauf wurden die Glasplatten voneinander getrennt und das Trenngel zur Visualisierung der Proteinbanden gefärbt (3.18.2). Als Alternative zur oben erwähnten Apparatur konnten PAGE-Analysen in Mini-Protean 3 Apparaturen der Firma Bio-Rad durchgeführt werden. Hierzu wurden die gleichen Gele und Ansätze erstellt, wobei das Volumen den im Verhältnis kleineren Gelen angepasst wurde.

3.18.2 Färbung der Proteingele

Nach Durchführung der Elektrophorese wurde das Trenngel für 10 min in Färbelösung geschwenkt (auf Rocky 3D; Fixierung) und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Bis zum Abkühlen auf RT wurde das Gel weiter geschwenkt. Nach dem Abkühlen wurde die Färbelösung entfernt, das Gel mit Entfärbelösung überschichtet und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Dieser Vorgang wurde 2-3 mal wiederholt bis der Hintergrund entfärbt und die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Nach vollständigem Entfärben wurde das Gel auf einem Flachbettscanner zur Dokumentation eingescannt.

Tabelle 3.35: Lösungen zur Gelfärbung

| Lösung | Komponente | Konzentration |
|----------------|------------------------------|---------------|
| Färbelösung | Methanol | 40 % (v/v) |
| | Essigsäure | 7 % (v/v) |
| | Coomassie Brillant-Blue R250 | 0,25 % |
| Entfärbelösung | Methanol | 40 % (v/v) |
| | Essigsäure | 7 % (v/v) |

3.19 Auftrennung und Markierung von Penicillin-Bindeproteinen (Pbp)

Zur Visualisierung von Pbps aus verschiedenen Stämmen von *Streptococcus pneumoniae* wurden diese mit Bocillin, einem fluoreszierenden Penicillin V-Derivat markiert. Zunächst wurden aus Übernachtskulturen je 10 ml vorgewärmtes CpH8-Medium 1:20 angeimpft und bei 37°C inkubiert. Nachdem eine Zelldichte von N=40 erreicht wurde, wurden je 2 ml der Kulturen für 5 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Pellets wurden in je 40 µl 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2 resuspendiert. Aus jedem Ansatz wurden 2 x 5 µl entnommen und mit je 5 µl Lysepuffer (0,2 % Triton-X-100 in 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2) vermischt. Zu einem Ansatz wurden 5 µl Bocillinlösung (0,01 mM), zum anderen Ansatz 5 µl H₂O pipettiert und 20 min bei 37°C inkubiert. Zu den Ansätzen wurden je 15 µl 2 x SDS-Probenpuffer gegeben, gemischt und 5 min bei 100°C denaturiert. Nach dem Abkühlen und erneuter 2 min Zentrifugation bei 14000 rpm wurden die Überstände, wie in 3.18 beschrieben, in einem SDS-Gel aufgetrennt. Hierzu wurde jedoch ein 10 %iges Trenngel eingesetzt und von den Proben je 2,5 µl, 5 µl und 15 µl aufgetragen. Zur Visualisierung der bocillinmarkierten Pbps wurde das Gel in einem FluorImager 595 (Molecular Dynamics) eingescannt.

3.20 Bestimmung des Proteingehalts von Lösungen

Der Proteingehalt von Lösungen wurde, wie bereits unter Abschnitt 3.13.2 beschrieben, nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung von RotiQuant (Roche, Karlsruhe) und des dort beschriebenen Mikroansatzes aus geeigneten Verdünnungen bestimmt.

3.21 Überexpression und Aufreinigung von Proteinen

3.21.1 Das pQE30-Expressionssystem

(The QIAexpressionist, Qiagen)

Mit dem pQE30-Expressionssystem können klonierte Gene als 6xHis-tag-Fusionsproteine durch IPTG-vermittelte Induktion exprimiert werden. Das in pQE30 klonierte Gen steht unter Kontrolle des T5-Promotors. Eine *lacI^f* Mutation auf einem F-Faktor in dem zur Expression benutzten Stamm *E. coli* XL1blue (2.1, Tabelle 2.2) führt zur konstitutiven Expression großer Mengen an *lac*-Repressor. Dieser *lac*-Repressor kann durch Bindung an zwei zwischen dem T5-Promotor des Plasmids und der Shine-Dalgarno-Sequenz vor dem klonierten Gen befindlichen *lac*-Operator-Regionen eine Backgroundexpression effektiv eindämmen.

3.21.2 Überexpression

Max. 20 ml LB-Flüssigmedium (30 µg/ml Tet, 200 µg/ml Amp) wurden mit *E. coli* XL1 blue, welche die entsprechenden pQE30-Derivate beherbergten, beimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Max. 1000 ml vorgewärmtes LB-Medium (30 µg/ml Tet, 200 µg/ml Amp) wurden mit der ÜK im Verhältnis 1:20 beimpft und bei 37°C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 1,1 inkubiert. Die Dokumentation des Bakterienwachstums erfolgte laut 3.1.1. 1 ml der Kultur wurde als uninduzierte Kontrolle entnommen, zentrifugiert, das Pellet in 50 µl 5 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bis zur Analyse mittels SDS-PAGE (3.18) bei -20°C eingefroren. Weitere 20 ml der Kultur wurden entnommen und getrennt als uninduzierte Kontrolle weiter inkubiert. Danach wurde die Expression des Fusionsproteins durch die Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die induzierte und die nicht induzierte Kultur wurden über Nacht bei 15°C schüttelnd weiter inkubiert. Von der induzierten Kultur wurde gegen Ende der Inkubation 1 ml Probe entnommen, wie oben zentrifugiert, in 5 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bis zur SDS-Analyse (3.18) als induzierte Kontrolle eingefroren. Durch Zentrifugation in JA10 Bechern für 20min bei 5000 rpm (4400xg) und 4°C wurden die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und vom Pellet das Naßgewicht bestimmt. Es wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

3.21.3 Herstellung von Lysaten

Das Pellet wurde in 35 ml Lysepuffer resuspendiert und 4 x 1 min mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier B-12) auf Eis lysiert. Die Kontrolle des Zellaufschlusses wurde mittels Mikroskopie durchgeführt. Das hergestellte Lysat wurde bei 22500 xg für 40 min und 4°C zentrifugiert und der Überstand weiter verwendet. Vom Überstand wurden 5 µl mit 5 µl 2 x SDS-Probenpuffer vermischt und bis zur Analyse mittels SDS-PAGE bei -20°C aufbewahrt.

3.21.4 Aufreinigung unter nativen Bedingungen

Der Überstand der hergestellten Lysate wurden zur Aufreinigung des 6 x His-Fusionsproteins unter nativen Bedingungen eingesetzt. Die Aufreinigung wurde mit Ni⁺-NTA-Säulen durchgeführt. Der 6 x His-Tag des Fusionsproteins bildet hierbei einen in Abwesenheit von Imidazol stabilen Komplex mit dem an die Matrix gebundenen Ni⁺-Ionen. Proteine, welche 1 Histidin oder 2, 3 und 4 aufeinander folgende Histidine enthalten, binden ebenfalls an die Ni⁺-Ionen. Bei Erhöhung der Imidazolkonzentration konkurriert jedoch das Imidazol zunehmend mit Histidinen bei der Komplexbildung mit Ni⁺-Ionen. Durch ein aufeinanderfolgendes Waschen mit Elutionspuffern mit immer höherer Imidazolkonzentration werden Proteine mit 1, 2 und mehr Histidinen nach und nach eluiert. Die Fusionsproteine eluieren hierbei aufgrund der höheren Stabilität der Ni-6xHis-Komplexe als letztes von den Säulen und können so abgetrennt werden.

Zu je 4 ml des klaren Lysats wurden je 1 ml 50 % Ni-NTA-Slurry gegeben und für 1 h auf dem Rolltisch langsam bei 4°C gedreht. Das Lysat wurde auf eine Säule (Econo-Pac, BioRad) gegeben und der Durchfluß aufgefangen. Es wurde zweimal mit 40 ml Waschpuffer gewaschen und der Durchfluß jeweils aufgefangen. Die Elution des 6 x His-Fusionsproteins wurde in fünf Elutionspuffern mit steigender Imidazolkonzentration (20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM) durchgeführt. Von den hergestellten fünf Elutionspuffern wurde, beginnend mit 20 mM Imidazol, je 6 x 1 ml auf die Säule gegeben und die Eluate in ERGs und Aliquots zu 1 ml gesammelt. Von allen Fraktionen wurden je 10 µl mit 2,5 µl 5 x SDS-Probenpuffer vermischt und bis zur Analyse mittels SDS-PAGE bei -20°C aufbewahrt. Die gesammelten Fraktionen selbst wurden wegen der hohen Imidazolkonzentration bei 4°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976) unter Verwendung von RotiQuant (Roth) in dem dort beschriebenen Mikroansatz durchgeführt. Die Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden unter Verwendung von PD10-Säulen (GE Healthcare) nach Herstellerangaben einer Umpufferung unterzogen. Hierbei wurde der imidazolhaltige Elutionspuffer gegen einen entsprechenden Inkubationspuffer ausgetauscht (Bandshiftpuffer, 3.14). Nach Überprüfung der Reinheit der Proteine mittels SDS-PAGE (3.18) und deren Konzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm, wurden die aufgereinigten Fusionsproteine aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Tabelle 3.36: Verwendete Lösungen zur Überexpression und Aufreinigung von 6xHIS-Fusionsproteinen

| Lösung | Komponente | Konzentration |
|--------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Lysepuffer | NaH ₂ PO ₄ | 50 mM |
| | NaCl | 300 mM |
| | Imidazol | 10 mM |
| | pH 8,0, eingestellt mit NaOH | |
| Waschpuffer | NaH ₂ PO ₄ | 50 mM |
| | NaCl | 300 mM |
| | Imidazol | 10 mM |
| | pH 8,0, eingestellt mit NaOH | |
| Elutionspuffer 1-5 | NaH ₂ PO ₄ | 50 mM |
| | NaCl | 300 mM |
| | Imidazol | 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM |
| | | |
| | pH 8,0, eingestellt mit NaOH | |

4. Ergebnisse

4.1 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten aus Familie P006

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Piperacillin-resistenten Mutanten von *Streptococcus pneumoniae* R6 aus der Familie P006 wurden von Laible 1987 isoliert und auch bereits teilweise phänotypisch und genetisch charakterisiert (Laible et al., 1987; Hakenbeck et al., 1994; Grebe et al., 1997; 1.6). Um einen Überblick der phänotypischen Eigenschaften der fünf Mutanten in Familie P006 zu erlangen, wurden zu Beginn dieser Arbeit erneut Wachstum, Morphologie, genetische Kompetenz, sowie deren MHK für Piperacillin untersucht. Dies sollte zugleich sicherstellen, daß die in dieser Arbeit erzielten Resultate mit den bereits zuvor gemachten Beobachtungen bezüglich der Mutanten aus Familie P006 in Beziehung gesetzt werden konnten.

4.1.1 Wachstum und Zellmorphologie

Kulturen der fünf Mutanten P106, P206, P306, P406 und P506, sowie des Referenzstammes R6 wurden wie unter 3.1.2 beschrieben in CpH8-Medium angezogen und deren Wachstum gemäß 3.1.1 dokumentiert. Die Wachstumsexperimente wurden zur Kontrolle dreifach durchgeführt. Abbildung 4.1 zeigt das beobachtete Wachstumsverhalten aller Stämme der Familie P006.

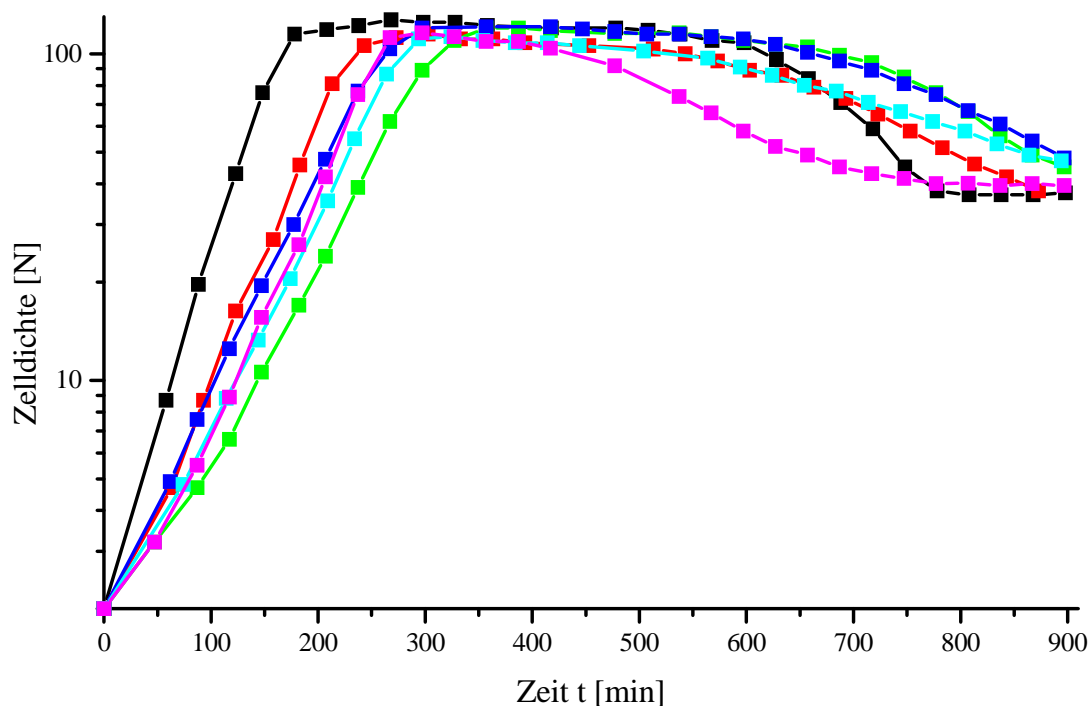


Abbildung 4.1: Wachstumsverhalten der Mutanten aus Familie P006: Aufgetragen wurde die Zelldichte in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min], wobei die Wachstumskurven der einzelnen Stämme auf eine Zelldichte von $N=2$ bei $t=0$ normalisiert wurden. Das Wachstum wurde bis zur vollendeten Lyse in CpH8-Medium verfolgt. Die Kurven stellen Beispiele aus drei unabhängigen Experimenten dar. ■ R6; ■ P106; ■ P206; ■ P306; ■ P406; ■ P506.

Anhand des Wachstumsverhaltens der Mutanten aus Abbildung 4.1 wird ersichtlich, daß alle fünf Piperacillin-resistenten Stämme eine längere Generationszeit als der Referenzstamm R6 aufwiesen. In Tabelle 4.1 sind die laut 3.1.1 berechneten Generationszeiten aufgeführt.

Tabelle 4.1: Generationszeiten und Wachstumsraten der Mutanten aus Familie P006

| Stamm/Mutante | Wachstumsrate μ [min^{-1}] | Generationszeit g [min] ¹⁾ |
|---------------|---|---|
| R6 | 0,0225 | 30 |
| P106 | 0,0185 | 38 |
| P206 | 0,0151 | 46 |
| P306 | 0,0147 | 47 |
| P406 | 0,0175 | 39 |
| P506 | 0,0192 | 36 |

¹⁾gerundet

Ausgehend von Mutante P106 stieg die Generationszeit im Vergleich zu *Streptococcus pneumoniae* R6 bis zur Mutante P306 an. Die Mutanten P406 und P506 hingegen zeigten wiederum kürzere Generationszeiten. Weiterhin ist aus Abbildung 4.1 ersichtlich, daß sich alle fünf Mutanten durch ein verändertes Lyseverhalten auszeichneten. Alle Mutanten lysierten im Vergleich zu R6 erheblich langsamer. P106, P406 und P506 besaßen zudem verkürzte stationäre Phasen, wobei Mutante P506 im direkten Vergleich zu R6 eine erheblich verkürzte stationäre Phase aufwies. Veränderte Lysephänotypen können eine Vielzahl verschiedener Ursachen haben. Die bereits in der *cpoA*-Mutante P106 verlangsamte Lyse könnte die von Grebe et al., 1997 vermutete Beteiligung von CpoA an der Teichonsäuresynthese stützen, denn ohne intakte Teichonsäuren können die bei der Autolyse beteiligten Enzyme (z.B. LytA) von *Streptococcus pneumoniae* ihre Wirkung nicht entfalten (Tomasz & Westphal, 1971; Giudicelli & Tomasz, 1984; Briese & Hakenbeck, 1985).

Die Mutanten aus Familie P006 zeigten bei einer mikroskopischen Untersuchung (3.1.4) keine zellmorphologischen Abweichungen im Vergleich zum Referenzstamm R6. Zu beobachten waren für *Streptococcus pneumoniae* R6 typische Diplokokken, nebst vereinzelt auftretenden Monokokken und kurzen Zellketten.

4.1.2 Genetische Kompetenz

Da Grebe et al. (1997) über eine verminderte genetische Kompetenz in Mutante P106 berichteten, wurde das für *Streptococcus pneumoniae* charakteristische Merkmal der natürlich auftretenden, genetischen Kompetenz bei den Piperacillin-resistenten Mutanten in einer wie unter 3.1.7 beschriebenen Kompetenz-Testung untersucht. Hierzu wurden von in CpH8-Medium wachsenden Kulturen aller Mutanten ab einer Zelldichte von $N=5$ im Abstand von 10-20min, abhängig von deren Generationszeit, Aliquots entnommen und mit je 600ng chromosomaler DNA des Streptomycin-resistenten *Streptococcus pneumoniae* AmiA9 transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf D-Blutagarplatten mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin. Die Bestimmung der Lebendkeimzahl erfolgte durch das Ausplattieren geeigneter Verdünnungen der Transformationsansätze auf Platten ohne Antibiotikum. Nach 24h Inkubation bei 37°C wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und der prozentuale Anteil der Streptomycin-resistenten Keime der Lebendkeimzahl (%(LKZ)) bestimmt. Die so ermittelten Transformationseffizienzen für verschiedene Zelldichten während des Wachstums jeder Mutante wurden als Funktion der Zelldichte aufgetragen. In Abbildung 4.2 sind die so erstellten Kompetenzkurven von einer Zelldichte von $N=5$ bis in die stationäre Phase ($N=120-130$) dargestellt. Der Referenzstamm R6 zeigte hiernach in CpH8-Medium über die gesamte exponentielle Wachstumsphase eine genetische Kompetenz mit Transformationseffizienzen zwischen 0,5 und 2 %(LKZ). Die Mutanten P106, P206 und P306 hingegen waren lediglich

zu Beginn der exponentiellen Phase bei Zelldichten von $N=5-25$ transformierbar. Die maximal erreichbare Transformationseffizienz der Mutanten in diesem Kompetenzpeak von 0,2-0,3 % (LKZ) lag hierbei um eine Zehnerpotenz unter der des Referenzstammes R6 mit 2,3 % (LKZ). Dies entspricht dem von Grebe et al. (1997) beobachteten Kompetenzphänotyp für die Mutante P106. Die Mutanten P406 und P506 zeigten zwar eine vergleichbare verminderte maximale Kompetenz, jedoch waren beide auch nach ihrem Kompetenzpeak bis zum Eintritt in die stationäre Phase mit 100-fach bis 1000-fach geringerer Effizienz im Vergleich zu R6 transformierbar.

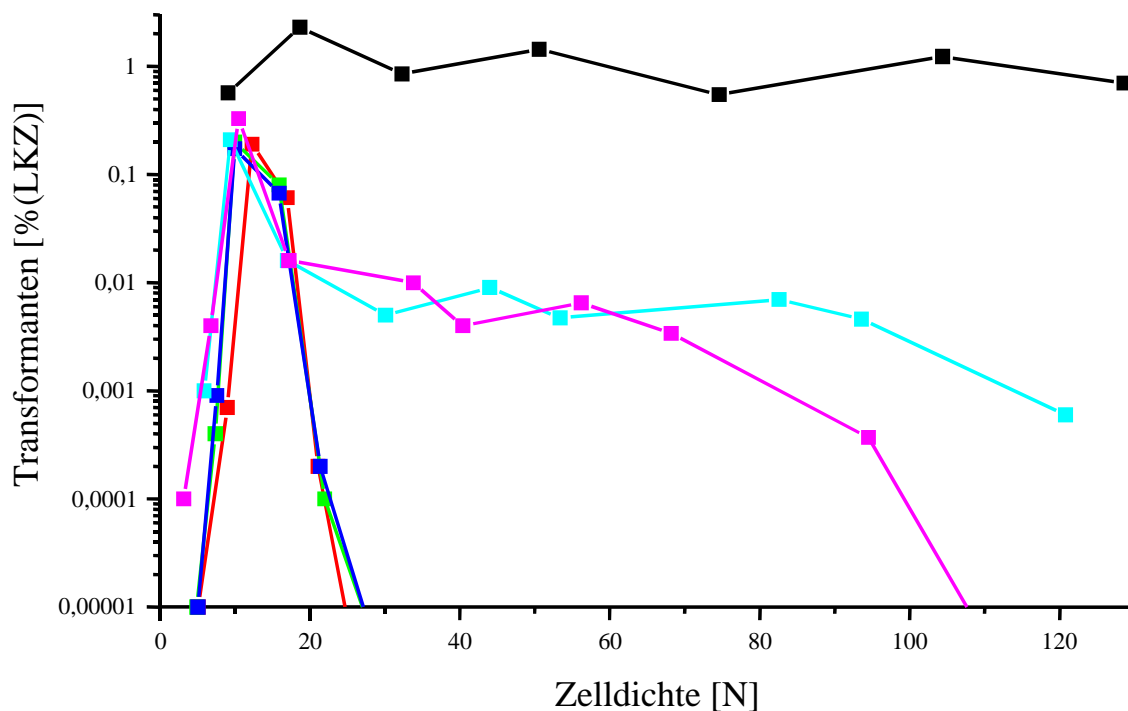


Abbildung 4.2: Genetische Kompetenz der Mutanten P106, P206, P306, P406 und P506 im Vergleich zu R6: Dargestellt wurden die Transformationseffizienzen als prozentualer Anteil der Lebendkeimzahl [% (LKZ)] in Abhängigkeit der Zelldichte in Nepheloeinheiten [N]. ■ R6; ■ P106; ■ P206; ■ P306; ■ P406; ■ P506.

4.1.3 MHK von Piperacillin

Zur Verifizierung der von Laible et al. (1987) und Grebe et al. (1997) beobachteten minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Piperacillin für die Mutanten der Familie P006, wurden diese erneut bestimmt. Die erneute Bestimmung wurde durchgeführt, da selbst geringfügige Änderungen in der Komposition der Nährmedien und Nährböden zu einer veränderten MHK führen konnten. Folglich war es notwendig, die MHK bei den in dieser Arbeit verwendeten Kulturbedingungen zu testen. Die MHK-Bestimmung der Mutanten wurde wie unter 3.1.5 beschrieben durchgeführt. In Tabelle 4.2 sind die MHK-Werte für die untersuchten Mutanten, nebst den von Grebe et al. (1997) beobachteten aufgeführt.

Tabelle 4.2: MHK von Piperacillin für Mutanten der Familie P006

| Stamm/Mutante | MHK [$\mu\text{g/ml}$] | MHK [$\mu\text{g/ml}$], Grebe et al., 1997 |
|---------------|--------------------------|--|
| R6 | 0,015 | 0,016 |
| P106 | 0,04 | 0,02-0,05 |
| P206 | 0,08 | 0,05 |
| P306 | 0,18 | 0,05-0,10 |
| P406 | 0,19 | 0,10-0,15 |
| P506 | 0,26 | 0,2 |

Wie aus Tabelle 4.2 ersichtlich, stieg die MHK von Piperacillin kontinuierlich, ausgehend vom Referenzstamm R6 bis hin zur höchstresistenten Mutante P506 an. Hierbei zeigten sich die größten Anstiege zwischen R6 und P106, P106 und P206, P206 und P306 sowie P406 und P506. Die Resistenzsprünge zwischen den einzelnen Mutanten entsprachen den von Grebe et al. (1997) gemachten Beobachtungen, wobei die MHK-Werte jedoch von den dort beschriebenen abwichen. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigten und vervollständigten somit die von Laible et al. (1987) und Grebe et al. (1997) beschriebenen Phänotypen der Mutanten und dienten in der vorliegenden Arbeit als Grundlage zum Vergleich mit den Phänotypen später hergestellter Deletionsmutanten. Generell konnte festgestellt werden, daß mit einem Anstieg der MHK für Piperacillin Veränderungen im Wachstums- und Lyseverhalten, sowie der natürlichen genetischen Kompetenz einhergehen.

4.2 Globale Transkriptomanalysen der Mutanten aus Familie P006

Innerhalb der Familie P006 konnten bereits in einigen Mutanten Punktmutationen identifiziert und dem entsprechenden Anstieg der MHK von Piperacillin zugeordnet werden (Hakenbeck et al., 1994; Grebe et al., 1997; vgl. 1.6). Betroffen waren die Penicillin-Bindeproteine Pbp2b in P206, Pbp2x in P306, sowie die Glycosyltransferase CpoA in P106, einer bis zu diesem Zeitpunkt unbekannten Resistenzdeterminante. Um ein tieferes Verständnis über die Funktion und die Effekte der resistenzvermittelnden Mutation im *cpoA*-Gen zu erlangen und um die unbekannteten Resistenzdeterminanten in den Mutanten P406 und P506 eventuell identifizieren zu können, wurden von allen fünf Stämmen globale Transkriptomanalysen, wie unter 3.16 beschrieben durchgeführt. Die zur Mikroarray-basierten Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in CpH8-Medium exponentiell wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von $N=40$ gewonnen (3.3; 3.16.3). Die Analysen wurden mit je drei getrennt angezogenen und isolierten Gesamt-RNA-Präparationen jedes Stammes durchgeführt. Verwendet wurde ein kommerzielles Oligo-Set der Firma MWG (3.16.1). Das Transkriptom jeder der fünf Mutanten wurde mit dem des Referenzstamms *Streptococcus pneumoniae* R6 verglichen. Hierbei wurden nur solche Gene, deren Transkriptverhältnisse einen Wert von >2 oder $<0,5$ besaßen und deren Transkriptverhältnisse nach Durchführung der statistischen Analyse einen P-Wert von $<0,01$ aufwiesen (3.16.5) als signifikant gewertet.

4.2.1 Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in den Mutanten aus Familie P006

Bei der globalen Transkriptomanalyse der Mutanten aus Familie P006 im Vergleich zu *Streptococcus pneumoniae* R6 konnten umfangreiche Veränderungen im Transkriptom der einzelnen Mutanten beobachtet werden. In Tabelle 4.3 wurden alle Gene, welche nach der statistischen Analyse eine signifikant veränderte Transkriptmenge aufwiesen, aufgeführt. Da in zahlreichen wissenschaftlichen Veröffentlichungen nicht mit dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm R6, sondern mit dem nahe verwandten *Streptococcus pneumoniae*

TIGR4 (Tettelin et al., 2001) gearbeitet wurde, sind zusätzlich zu den annotierten *orfs* in R6 die homologen annotierten *orfs* im Stamm TIGR4 angegeben. Eine komplette Auflistung der Ergebnisse nebst der bei der Signifikanztestung erhaltenen P-Werte befindet sich im Anhang der vorliegenden Arbeit unter 7.1 bis 7.5.

Von den 2018 auf dem zur Transkriptomanalyse eingesetzten Oligo-Slide vorhandenen genspezifischen Oligos (3.16.1) zeigten in P106 72, in P206 114, in P306 93, in P406 102 und in P506 171 Gene ein Transkriptmengenverhältnis von >2 oder $<0,5$. Im Durchschnitt entsprach dies 5,4 % des annotierten und durch die Oligos des eingesetzten Chipsatzes abgedeckten Genoms. Wie aus Abbildung 4.3 zu ersehen, wiesen eine Vielzahl von einzelnen Genen lediglich ein Transkriptmengenverhältnis von 2 bis 3 oder 0,5 bis 0,33 auf (hellgrün hinterlegte Werte für ein Verhältnis zwischen 2 und 3, bzw. rosa hinterlegte Werte für ein Verhältnis zwischen 0,5 und 0,33 in Abbildung 4.3). Meist handelte es sich hierbei um Gene, welche in der aus der entsprechenden Mutante isolierten, höher-resistenten Folgemutante keine signifikant veränderten Transkriptmengen mehr aufwiesen. Dagegen konnten eine Reihe von oftmals geclusterten Genen identifiziert werden, welche eine zum Teil erhebliche Änderung ihrer Transkriptmenge im Vergleich zu R6 aufzeigten (grün hinterlegte Werte für ein Verhältnis von >3 , bzw. rot hinterlegte Werte für ein Verhältnis $<0,33$ in Abbildung 4.3). Meist zeigte diese Gruppe von Genen schon in der *cpoA*-Mutante P106 eine von R6 signifikant abweichende Transkriptmenge, wobei die Abweichung oftmals in jeder weiteren, resistenteren Mutante zunahm. In dieser Gruppe konnten aufgrund bereits veröffentlichter Publikationen eine Vielzahl von Genen zu verschiedenen Regulons und Clustern zusammengefasst werden:

So zeigten in Übereinstimmung mit dem unter 4.1.2 beobachteten Kompetenzdefekt in allen Mutanten ab Mutante P106 zahlreiche Gene, welche im Stamm TIGR4 unter der Kontrolle des Kompetenzregulons, reguliert durch das Zweikomponentensystem ComDE, stehen (Peterson et al., 2004), in allen Mutanten um mehr als dreifach erniedrigte Transkriptmengen (gelb markiert in Abbildung 4.3).

Ein weiteres Gencluster (*blp*; deSaizieu et al., 2000; hellblau markiert in Abbildung 4.3), welches, kontrolliert durch das Zweikomponentensystem 13 (BlpH/BlpR), vermutlich an der Produktion, dem Export und der Immunität gegen ein Bacteriocin beteiligt ist, zeigte ebenfalls eine Transkriptmengenverhältnis von kleiner 0,33 ab Mutante P106.

Ein aus *Enterococcus faecalis* bekanntes Cytolysin-Gencluster (Gilmore et al., 1994; lila markiert in Abbildung 4.3), vermutlich reguliert durch den transkriptionellen Regulator PlcR, zeigte eine mehr als dreifach erhöhte Transkriptmenge in Mutante P306 mit steigender Tendenz in den folgenden Mutanten der Familie P006.

Zudem zeigte eine putative Transkriptionseinheit, das *ytrA*-Cluster (orange markiert in Abbildung 4.3), vermutlich reguliert durch den transkriptionellen Regulator YtrA, eine teilweise über dreifach erhöhte Transkriptmenge in Mutante P106, P306 und P506. Das in *Bacillus subtilis* genetisch ähnlich organisierte *ytrA*-Cluster ist dort an der Aufnahme von Acetoin beteiligt (Yoshida et al., 2000).

Weiterhin konnten vier Cluster von Genen identifiziert werden, welche ein Transkriptmengenverhältnis von >3 oder $<0,33$, meist schon in Mutante P106 aufwiesen, jedoch noch nicht charakterisiert wurden (*spr0096-spr0107*; *spr0276-spr0282*; *spr0388-spr0389*; *spr1546-spr1549*; alle grau markiert in Abbildung 4.3). Die Gene *spr0276-spr0282* scheinen an der Verwertung von Cellobiose unter Kontrolle des Zweikomponentensystems 08 (Kin08/Reg08), beteiligt zu sein (McKessar et al., 2007). Das Gencluster *spr0096-spr0107* scheint aufgrund der bei Blast-Analysen gefundenen Homologien für ein weiteres, für die Bildung, den Export und die Immunität gegen ein Bacteriocin verantwortliches System zu kodieren. Im Gencluster *spr1546-spr1549* existiert eventuell, aufgrund der von Blast-Analysen gefundenen Homologien ebenfalls ein Gen für einen ABC-Transporter, mit Ähnlichkeit zu CylA aus dem Cytolysin-Gencluster von *Enterococcus faecalis*.

4. Ergebnisse

| Gen-Nr. in R6 | Gen-Nr. in TIGR4 | Gen | Funktion/Domäne | Verhältnis der Transkriptmenge [Mutante/R6] | | | | |
|------------------|---------------------|-------|--|---|------|------|------|------|
| | | | | P106 | P206 | P306 | P406 | P506 |
| spr0013 | SP2006 | comX | Alternative sigma factor ComX | 0,30 | 0,33 | 0,26 | 0,25 | 0,29 |
| spr0020 | SP0018 | comW | positive factor involved in competence | 0,10 | 0,14 | 0,24 | 0,32 | 0,29 |
| spr0021 | SP0019 | purA | Adenylosuccinate synthetase | | | 0,50 | 0,40 | |
| spr0026 | SP0024 | - | Conserved hypothetical protein, putative carbonic anhydrase | | | | | 2,36 |
| spr0030 | SP0029 | - | Hypothetical protein | 0,23 | 0,22 | 0,23 | 0,26 | 0,24 |
| spr0031 | SP0031 | - | Hypothetical protein | 0,20 | 0,21 | 0,20 | 0,13 | 0,33 |
| spr0033 | SP0033 | - | Putative Succinyl-CoA synthetase, alpha subunit-related enzyme | | | | | 2,03 |
| spr0035 | SP0035 | aspC | Aspartate aminotransferase | | | | | 2,23 |
| spr0036 | SP0036 | - | Conserved hypothetical protein, putative DNA repair protein RecO | | | | | 2,27 |
| spr0040 | SP0041 | blpU | Amphipathic pore-forming peptide precursor | 0,16 | | 0,35 | 0,30 | 0,13 |
| spr0043 | SP0042 | comA | Transport ATP-binding protein ComA | 0,46 | 0,25 | | 0,47 | |
| spr0049 | SP0048 | purN | 5'-phosphoribosylglycinamide transformylase 1 | 0,46 | | 0,38 | | 0,21 |
| spr0068 | SP0075 | - | Conserved hypothetical protein, truncation; PNP phosphorylase family | | 2,06 | | | 2,97 |
| spr0069 | SP0077 | - | Hypothetical protein | | | | | 4,23 |
| spr0070 | SP0078 | trkH | Trk transporter membrane-spanning protein - K+ transport | | | | | 3,13 |
| spr0071 | SP0079 | trkA | Trk transporter NAD+ binding protein - K+ transport | | | | | 2,80 |
| spr0072 | SP1764 | - | Conserved hypothetical protein, putative glycosyltransferase | | | 0,46 | | |
| spr0074 | - | - | Hypothetical protein, truncation, putative glycosyltransferase | | | 0,44 | | |
| spr0096 | SP0107 | - | Hypothetical protein, LysM-domain | 2,96 | | | | |
| spr0098 | SP0109 | - | Hypothetical protein, putative bacteriocin | | | 0,31 | 0,47 | 0,18 |
| spr0099 | SP0110 | - | ABC transporter membrane-spanning permease - aa transport | 0,06 | 0,06 | 0,27 | 0,45 | 0,23 |
| spr0100 | SP0111 | - | ABC transporter ATP-binding protein - aa transport | 0,48 | | | | |
| spr0101 | SP0112 | - | ABC transporter solute-binding protein - aa transport | | 0,26 | | | |
| spr0102 | - | argG | Argininosuccinate synthase | | 0,30 | 0,29 | 0,45 | 0,35 |
| spr0104 | SP0108 | - | Hypothetical protein, HTH-XRE-domain | 0,49 | 0,49 | | 0,49 | |
| spr0105 | - | - | Bacteriocin transporter, peptidase c39 family, truncation | | 0,46 | 0,45 | | 0,34 |
| spr0106 | - | - | Putative bacteriocin transporter, truncation | | | 0,44 | 0,46 | 0,24 |
| spr0107 | - | - | Hypothetical protein | | | | | 0,25 |
| spr0110 | SP0108 | - | Hypothetical protein | | 0,43 | | | |
| spr0127 | SP0124 | cibB | Competence induced bacteriocin B | 0,22 | | 0,08 | 0,11 | 0,16 |
| spr0128 | SP0125 | cibA | Competence induced bacteriocin A | 0,11 | 0,39 | 0,07 | 0,13 | 0,34 |
| spr0129 | SP0127 | - | Peptidase M22 domain, putative glycoprotease | | | | | 2,45 |
| spr0130 | SP0128 | rimI | Ribosomal protein alanine acetyltransferase | | | | | 2,02 |
| spr0133 | SP1582 | - | Degenerate transposase (orf2) | | | | | 2,54 |
| spr0141 | SP0142 | - | Hypothetical protein | | | | 5,36 | 4,31 |
| spr0142 | SP0143 | - | Hypothetical protein, CAAX amino terminal protease family protein | | | | 4,58 | 3,98 |
| spr0143 | SP0144 | - | Hypothetical protein, CAAX amino terminal protease family protein | | | 2,90 | 2,74 | |
| spr0149 | SP0151 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | | | | | 2,02 |
| spr0157 | SP0159 | - | Conserved hypothetical protein, membrane protein | | 0,49 | | | |
| spr0162 | SP0176 | ribA | Riboflavin biosynthesis; GTP-cyclohydrolase II. | 0,40 | | | | 0,46 |
| spr0171 | SP0186 | uvrA | Excinuclease ABC - subunit A | | | | | 2,07 |
| spr0177 | SP0194 | - | Conserved hypothetical protein | | | | | 2,02 |
| spr0181 | - | orf47 | orf47 protein | 0,38 | | | | |
| spr0186 | SP0207 | - | Hypothetical protein, putative ribonucleoside triphosphate reductase | | | | | 2,40 |
| spr0191 | SP0212 | rplB | 50S Ribosomal protein L2 | | | | | 0,48 |
| spr0251 | SP0274 | polC | DNA polymerase III, alpha subunit | 0,35 | | | | |
| spr0262 | SP0285 | adhP | Alcohol dehydrogenase, propanol-preferring. | | 0,31 | | | |
| spr0264 | SP0287 | - | Conserved hypothetical protein, xanthine uracil permease family | | 2,00 | | | |
| spr0268 | SP0291 | sulC | GTP cyclohydrolase | | | | | 2,20 |
| spr0271 | SP0294 | rplM | 50S Ribosomal protein L13 | | | | | 2,01 |
| spr0276 | SP0303 | bglA | 6-phospho-beta-glucosidase | 0,37 | 0,46 | 0,40 | 0,48 | 0,46 |
| spr0277 | SP0304 | - | Conserved hypothetical protein, truncation, MtN3_slv domain | 0,34 | 0,50 | 0,38 | 0,27 | 0,14 |
| spr0278 | SP0305 | - | Phosphotransferase system sugar-specific E1b component | 0,39 | 0,27 | | 0,44 | 0,42 |
| spr0279 | SP0306 | bglG | Transcription antiterminator BglG family | 0,43 | 0,35 | | | |
| spr0280 | SP0308 | - | Phosphotransferase system sugar-specific E1a component | 0,38 | 0,50 | | | 0,24 |
| spr0282 | SP0310 | - | Phosphotransferase system sugar-specific E1c component | | | | 0,45 | |
| spr0288 | SP0318 | kdgK | 2-keto-3-deoxygluconate kinase | | | 0,48 | | |
| spr0304 | SP0336 | pbpX | Penicillin-binding protein 2X | | | | | 2,06 |
| spr0306 | SP1217 | - | Hypothetical protein | | | | 2,56 | |
| spr0310 | SP0342 | dexB | Alpha, 1-6-glucosidase | | 0,44 | | | |
| spr0311 | - | - | Hypothetical protein | | 0,47 | | | |
| spr0340 | SP0383 | mvaK2 | Phosphomevalonate kinase | | | | | 2,06 |
| spr0363 | SP0401 | recD | Exonuclease V | | | | 0,50 | 2,24 |
| spr0385 | SP0425 | accC | Biotin carboxylase (a subunit of acetyl-CoA carboxylase (ACC)) | | | | | |
| spr0388 | SP0429 | - | Hypothetical protein | 0,34 | 0,27 | 0,19 | 0,22 | 0,19 |
| spr0389 | SP0430 | - | Hypothetical protein | 0,38 | 0,18 | 0,29 | | 0,23 |
| spr0427 | SP0480 | trkA | Trk transporter NAD+ binding protein - K+ transport | | | | | 2,12 |
| spr0441 | SP0499 | pgk | Phosphoglycerate kinase | | 0,44 | | | |
| spr0445 | SP0508 | - | Putative type I restriction enzyme, truncation | | 2,62 | 2,89 | | 3,08 |
| spr0446 | SP0507 | - | Putative type I restriction enzyme, truncation | | | | | 0,34 |

Abbildung 4.3: Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in den Mutanten der Familie P006 bei logarithmischem Wachstum (Zelldichte N=40): Dargestellt sind alle Gene mit einem Transkriptverhältnis zu R6 von > 2 oder < 0,5, sowie einem P-Wert < 0,01. Gen-Nr. in R6: Annotierte orfs in *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); Gen-Nr. in TIGR4: Zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs in *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); Gen: Bezeichnung charakterisierter Gene; ■ Transkriptmengenverhältnis < 0,3; ■ Transkriptmengenverhältnis zwischen 0,2 bis 0,3; ■ Transkriptmengenverhältnis zwischen 2 bis 3; ■ Transkriptmengenverhältnis > 3; ■ Gene des Kompetenzregulons; ■ Gene des *blp*-Clusters; ■ Gene des *ytrA*-Clusters; ■ Gene des *cyl*-Clusters; ■ Gene des TCS11-Clusters; ■ Gene des *lic1*-Operons; ■ sonstige Cluster unbekannter Funktion.

4. Ergebnisse



Abbildung 4.3 (Fortsetzung): Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in den Mutanten der Familie P006 bei logarithmischem Wachstum (Zelldichte N=40): Dargestellt sind alle Gene mit einem Transkriptverhältnis zu R6 von > 2 oder $< 0,5$, sowie einem P-Wert $< 0,01$. Gen-Nr. in R6: Annotierte orfs in *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); Gen-Nr. in TIGR4: Zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs in *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); Gen: Bezeichnung charakterisierter Gene; ■ Transkriptmengenverhältnis $< 0,3$; ■ Transkriptmengenverhältnis zwischen 0,2 bis 0,3; ■ Transkriptmengenverhältnis zwischen 2 bis 3; ■ Transkriptmengenverhältnis > 3 ; ■ Gene des Kompetenzregulons; ■ Gene des *blp*-Clusters; ■ Gene des *ytrA*-Clusters; ■ Gene des *cyl*-Clusters; ■ Gene des TCS11-Clusters; ■ Gene des *licI*-Operons; ■ sonstige Cluster unbekannter Funktion.

4. Ergebnisse



Abbildung 4.3 (Fortsetzung): Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in den Mutanten der Familie P006 bei logarithmischem Wachstum (Zelldichte N=40): Dargestellt sind alle Gene mit einem Transkriptverhältnis zu R6 von > 2 oder $< 0,5$, sowie einem P-Wert $< 0,01$. Gen-Nr. in R6: Annotierte orfs in *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); Gen-Nr. in TIGR4: Zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs in *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); Gen: Bezeichnung charakterisierter Gene; ■ Transkriptmengenverhältnis $< 0,3$; ■ Transkriptmengenverhältnis zwischen 0,2 bis 0,3; ■ Transkriptmengenverhältnis zwischen 2 bis 3; ■ Transkriptmengenverhältnis > 3 ; ■ Gene des Kompetenzregulons; ■ Gene des *blp*-Clusters; ■ Gene des *ytrA*-Clusters; ■ Gene des *cyl*-Clusters; ■ Gene des TCS11-Clusters; ■ Gene des *lic1*-Operons; ■ sonstige Cluster unbekannter Funktion.

4. Ergebnisse

| | | | | | | | | | |
|---------|--------|----------------|---|------|------|------|------|------|-------|
| spr1773 | SP1957 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | | | | | | 2,78 |
| spr1774 | SP1958 | - | Hypothetical protein | | | | | | 2,40 |
| spr1786 | SP1971 | - | Hypothetical protein | 0,20 | | 0,19 | 0,26 | 0,24 | |
| spr1814 | SP2000 | <i>rr11</i> | Response regulator 11, LuxR type | | | | | | 13,85 |
| spr1815 | SP2001 | <i>hk11</i> | Histidine kinase 11 | | | | | | 22,36 |
| spr1816 | SP2002 | - | Conserved hypothetical protein, putative permease | | | | | | 18,41 |
| spr1817 | SP2003 | - | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | | | | | | 12,13 |
| spr1818 | SP2005 | - | Hypothetical protein, putative membrane protein | | | | | | 7,89 |
| spr1826 | SP2013 | - | Conserved hypothetical protein, putative permease | | 0,44 | 0,49 | | 0,43 | |
| spr1829 | SP2016 | <i>nadC</i> | Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase | 0,38 | 0,33 | 0,33 | | 0,40 | |
| spr1831 | - | - | Putative ATP binding domain, truncation | 0,28 | 0,48 | 0,20 | 0,21 | | 0,30 |
| spr1834 | SP2022 | <i>ptcC</i> | Phosphotransferase system system, cellobiose-specific IIc component | | | | | | 0,49 |
| spr1856 | - | - | Putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 0,12 | 0,29 | 0,08 | 0,15 | | 0,30 |
| spr1857 | - | - | Putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 0,16 | 0,27 | 0,26 | 0,26 | | 0,34 |
| spr1858 | SP2047 | - | Hypothetical protein | 0,08 | 0,23 | 0,48 | | 0,30 | |
| spr1859 | SP2048 | - | Conserved hypothetical protein, N-terminal methylation motif | 0,07 | 0,16 | 0,31 | | 0,28 | |
| spr1861 | SP2050 | <i>cglD</i> | Competence protein | 0,08 | 0,18 | 0,08 | 0,08 | | 0,22 |
| spr1862 | SP2051 | <i>cglC</i> | Competence protein | 0,09 | 0,19 | 0,32 | | 0,27 | 0,25 |
| spr1863 | SP2052 | <i>cglB</i> | Competence protein | 0,06 | 0,18 | 0,14 | 0,09 | | 0,23 |
| spr1864 | SP2053 | <i>cglA</i> | Competence protein | 0,09 | 0,14 | 0,11 | 0,08 | | 0,37 |
| spr1869 | SP2058 | <i>tgt</i> | tRNA-guanine transglycosylase (guanine insertion enzyme) | | 0,46 | 0,41 | | | |
| spr1878 | SP2066 | <i>thrC</i> | Threonine synthase | | | | | | 2,03 |
| spr1879 | SP2067 | - | Hypothetical protein, Gamma-glutamylcysteine synthetase-like | | | | | | 2,51 |
| spr1885 | SP2073 | - | ATP-binding/membrane spanning protein - unknown substrate | | | | | | 2,33 |
| spr1887 | SP2075 | - | ATP-binding/membrane spanning protein - unknown substrate | | | | | | 2,08 |
| spr1902 | SP2091 | <i>gpdA</i> | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+] | | | | | | 2,11 |
| spr1907 | SP2097 | <i>dapD</i> | Tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase-related protein | | | | | | 2,26 |
| spr1913 | SP2103 | <i>rrmA</i> | 23S rRNA m1G745 methyltransferase | 0,46 | | 2,45 | | | |
| spr1914 | SP2104 | - | Hypothetical protein | | | | | | 8,63 |
| spr1916 | SP2106 | <i>malP</i> | Maltodextrin phosphorylase | | 0,23 | | | | |
| spr1917 | SP2107 | <i>malM</i> | 4-alpha-glucanotransferase (amylomaltase) | | 0,15 | 0,47 | | | |
| spr1919 | SP2109 | <i>malC</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - maltose/maltodextrin | | 0,43 | | | | |
| spr1920 | SP2110 | <i>malD</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - maltose/maltodextrin | | | | | | 2,05 |
| spr1923 | SP2113 | - | ABC transporter, ATP and permease component | | | | | | 2,40 |
| spr1928 | SP2118 | - | Hypothetical protein | | | | | | 2,04 |
| spr1933 | SP1115 | <i>rgg</i> | Positive transcriptional regulator of glucosyltransferase and Spp phenotype | | | | | | 2,66 |
| spr1936 | SP2127 | <i>tkiC</i> | Putative transketolase c-terminal section | | | | | | 2,25 |
| spr1937 | SP2128 | <i>tkiN</i> | Putative transketolase n-terminal section | | | | | | 2,49 |
| spr1938 | SP2129 | - | PTS EIIc component | | | | | | 2,05 |
| spr1939 | SP2130 | - | PTS EIIb component | | | | | | 2,61 |
| spr1940 | SP2131 | - | Transcriptional regulator, BglG family | | | | | | 0,46 |
| spr1953 | SP2145 | - | Conserved hypothetical protein, putative alpha-1,2-mannosidase | | | | | | 2,67 |
| spr1968 | SP2162 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIc component | | 0,42 | | | | |
| spr1969 | SP2163 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIb component | | 0,43 | | | | |
| spr1970 | SP2164 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIa component | | 0,49 | | | | |
| spr1971 | SP2165 | <i>fucU</i> | Fucose pathway protein, function unknown | | 0,37 | | | | |
| spr1972 | SP2166 | <i>fucA</i> | L-fucose phosphate aldolase | | 0,41 | | | | |
| spr1973 | SP2167 | <i>fcsK</i> | Fucose kinase | | 0,41 | | | | |
| spr1987 | SP2183 | - | Hypothetical protein, truncation | | 2,35 | | | | |
| spr1988 | SP2184 | <i>glpF</i> | Glycerol uptake facilitator protein | | 2,63 | | | | |
| spr1993 | SP2188 | <i>hsp33</i> | Chaperonin (heat shock protein 33) | | | | | | 2,85 |
| spr1995 | SP2190 | <i>pspC</i> | Choline binding protein A | | | | | | 3,75 |
| spr1996 | SP2191 | - | Putative isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase | | | | | | 2,35 |
| spr1997 | SP2192 | <i>hk06</i> | Histidine kinase | | | | | | 2,06 |
| spr1998 | SP2193 | <i>rr06</i> | Response regulator | | | | | | 2,29 |
| spr1999 | SP2194 | <i>clpC</i> | Class III stress response-related ATPase, truncation | | | | | | 2,23 |
| spr2000 | SP2194 | <i>clpC</i> | Class III stress response-related ATPase, truncation | | | | | | 2,22 |
| spr2001 | SP2195 | <i>ctsR</i> | Transcriptional regulator CtsR | | | | | | 2,77 |
| spr2006 | SP2201 | <i>cbpD</i> | Choline binding protein D | 0,26 | 0,21 | | 0,31 | | |
| spr2012 | SP2207 | <i>comFC</i> | Involved in transformation (competence for DNA uptake) | 0,12 | 0,14 | 0,29 | 0,19 | | 0,30 |
| spr2013 | SP2208 | <i>comFA</i> | Required for DNA uptake; related to ATP-dependent RNA/DNA helicases | 0,17 | 0,19 | 0,32 | 0,34 | | 0,45 |
| spr2014 | SP2209 | - | Conserved hypothetical protein | | | | | | 2,20 |
| spr2016 | - | - | Transposase, uncharacterized, truncation | | | | | | 2,20 |
| spr2021 | SP2216 | <i>gsp-781</i> | General stress protein GSP-781 | | | | | | 2,56 |
| spr2041 | SP2235 | <i>comE</i> | Response regulator | | | 0,21 | 0,14 | | 0,14 |
| spr2042 | SP2236 | <i>comD</i> | Histidine protein kinase | 0,05 | 0,12 | 0,24 | 0,13 | | 0,36 |
| spr2043 | SP2237 | <i>comC</i> | Competence stimulating peptide precursor (CSP) | 0,08 | 0,16 | 0,24 | 0,19 | | 0,17 |
| spr2045 | SP2239 | <i>sphra</i> | Serine protease | | 0,31 | 0,33 | | | 0,41 |
| spr2046 | SP2240 | <i>spoIJ</i> | Chromosome segregation protein | | | 0,49 | | | 0,48 |

Abbildung 4.3 (Fortsetzung): Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in den Mutanten der Familie P006 bei logarithmischem Wachstum (Zelldichte N=40): Dargestellt sind alle Gene mit einem Transkriptverhältnis zu R6 von > 2 oder < 0,5, sowie einem P-Wert < 0,01. Gen-Nr. in R6: Annotierte orfs in *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); Gen-Nr. in TIGR4: Zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs in *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); Gen: Bezeichnung charakterisierter Gene; ■ Transkriptmengenverhältnis < 0,3; ■ Transkriptmengenverhältnis zwischen 0,2 bis 0,3; ■ Transkriptmengenverhältnis zwischen 2 bis 3; ■ Transkriptmengenverhältnis > 3; ■ Gene des Kompetenzregulons; ■ Gene des *blp*-Clusters; ■ Gene des *ytrA*-Clusters; ■ Gene des *cyl*-Clusters; ■ Gene des TCS11-Clusters; ■ Gene des *licI*-Operons; ■ sonstige Cluster unbekannter Funktion.

Für die Gene *spr0388* und *spr0389* konnte aufgrund der durchgeführten Blast-Analysen und Domänensuche nur eine Assoziation mit der Zellmembran vermutet werden.

Die Mutante P406 zeigte drei auffällig erhöht transkribierte Gencluster, welche in den anderen Mutanten nicht beobachtet werden konnten. Eines dieser Cluster, welches für ein weiteres Zweikomponentensystem (Kin11/Reg11) kodierende Gene enthielt (TCS11-Cluster; braun markiert in Abbildung 4.3), zeigte eine bis zu 22-fach höhere Transkriptmenge als in R6. Andererseits fiel hier das *lic1*-Operon und ein einzelnes Gen (*spr1914*) durch ein Transkriptmengenverhältnis von bis zu 8 auf. Das *lic1*-Operon kodiert für Proteine, welche für den Import von Cholin, sowie für dessen Aktivierung als CDP-Cholin und die Bereitstellung von CDP-Ribitol kodieren. Beides sind Precursor, welche zur Synthese der Teichonsäuren in *Streptococcus pneumoniae* benötigt werden. Bei *spr1914* handelt es sich um ein uncharakterisiertes, vermutlich membrangebundenes essentielles Protein (Song et al., 2005). Zu der Gruppe von Genen, welche lediglich ein Transkriptmengenverhältnis von 2-3 oder 0,5 bis 0,33 aufwiesen, gehörten in Mutante P506 das Gen des Response-Regulators CiaR (*spr0707*) des Zweikomponentensystems CiaRH, sowie einige, unter dessen Kontrolle stehende Gene (*spr0782*, *htrA*, *spoOJ*). Dem Zweikomponentensystem CiaRH konnte bereits in einer auf dem nicht-lytischen β -Lactam Cefotaxim isolierten Familie von resistenten Mutanten (C-Mutanten, Guenzi et al., 1994; Mascher et al., 2006a) eine Rolle bei der Cefotaxim-Resistenz und der Zellwandintegrität zugeordnet werden. Jedoch führte hier eine Induktion des CiaRH-Systems zur erhöhten Resistenz gegen Cefotaxim. In Mutante P506 konnten jedoch 2 bis 3-fach erniedrigte Transkriptmengen beobachtet werden. In Mutante P506 zählte zur Gruppe mit moderat veränderten Transkriptmengen auch das Gen für das Penicillin-Bindeprotein Pbp2x, in welchem bereits in Mutante P306 eine zur erhöhten Piperacillin-Resistenz führende Punktmutation identifiziert werden konnte (Hakenbeck et al., 1994; 1.6). In keiner weiteren Mutante der Familie P006 konnten veränderte Transkriptmengen der bekannten, in die Resistenz gegen β -Lactame verwickelten Gene (*pbp*-Gene, *ciaRH* oder *cpoA*; 1.2) beobachtet werden. Zumindest auf mRNA-Ebene scheint es in der *cpoA*-Mutante P106, sowie P206, P306 und P406 keine Veränderungen von bereits bekannten Resistenzdeterminanten für β -Lactame zu geben.

Die zum Teil erheblich veränderten Transkriptmengen des Kompetenzregulons, des *blp*-Regulons, des Cytolysin-Genclusters, des *lic1*-Operons, des TCS11-Clusters, sowie einer Reihe uncharakterisierter Cluster mit eventueller Fähigkeit zur Bacteriocin-Produktion oder zur Kodierung von integralen Membranfunktionen, waren ein Hinweis darauf, daß in der *cpoA*-Mutante P106, sowie in den noch uncharakterisierten Mutanten P406 und P506 solche Mechanismen oder Proteine verändert waren, welche direkt oder indirekt am Aufbau der Zellhülle, ihrer Integrität oder ihrer Funktionen beteiligt sind. Die beobachteten Cluster stellten deshalb auch potentielle Kandidaten, welche für die erhöhte Resistenz in Mutante P406 und P506 verantwortlich sein konnten, dar (4.5; 4.7). Zudem ist die Aktivität von Quorum-Sensing Systemen wie z.B. dem Kompetenzsystem oder dem *blp*-System auf intakte Strukturen in der Zellhülle angewiesen. Die beschriebene *cpoA*-Mutation in P106 würde die eventuelle Funktion von CpoA als Glycosyltransferase beim Aufbau eines Membranlipidankers (Berg et al., 2001; Edman et al., 2003; 1.2; 1.4) sicherlich beeinträchtigen und könnte somit zu einer veränderten Zellhülle mit eventuellen Auswirkungen auf die Resistenz gegen β -Lactame führen.

4.2.2 Gene und Cluster mit signifikant veränderten Transkriptmengen in P106

Die von Grebe et al., 1997 beschriebene Mutation in *cpoA* in Mutante P106 führte zur Erhöhung der MHK für Piperacillin (Laible et al., 1987; Grebe et al., 1997; 4.1.3). Zusätzlich konnte ein Wachstums- und Lysedefekt (4.1.1), sowie eine verminderte natürliche genetische

Kompetenz festgestellt werden (Grebe et al., 1997; 4.1.2). Der einzige Hinweis auf die Funktion von CpoA wurde von Edman et al., 2003 geliefert. Hiernach ist CpoA eine α -Galactosyl-Glycosyl-Diacylglycerin-Synthase (EC2.4.1.208), welche in der Lage ist, einen Galactosylrest von UDP-Galactose auf Monoglucosyldiacylglycerin zu transferieren (1.2; 1.4). In *Staphylococcus aureus* ist eine α -Diglucosyl-Diacylglycerin-Synthase (YpfP) am Aufbau des Membranlipidankers der Lipoteichonsäuren beteiligt (Kiriukhin et al., 2001). Durch die Transkriptomanalyse der Mutante P106 konnten eventuell weitere Hinweise auf die von CpoA ausgeübte Funktion erhalten werden. Das Transkriptom der Mutante P106 zeigte 72 Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen (4.2.1). Von diesen 72 Genen waren 41 Teil des Kompetenzregulons (gelb markiert in Abbildung 4.3). Meist zeigten diese Gene ein Transkriptverhältnis von $<0,33$, schienen also erheblich reprimiert. Zu diesen Genen gehörte das Gen für CbpD, ein Cholinbindeprotein, welches eine 4-fach niedrigere Transkriptmenge aufwies. CbpD benötigt, wie alle Cholinbindeproteine intakte, mit Phosphorylcholin (PCho) verbundene Teichonsäuren um seine Aktivität zu entfalten. CbpD wird eine Funktion als Mureinhydrolase zugeschrieben und ist für die kompetenzinduzierte Zelllyse im Zusammenwirken mit LytA verantwortlich (Kausmally et al., 2005; 1.5). Dies könnte ein Grund für den Lysedefekt in den Mutanten der Familie P006 sein und könnte als weiterer Hinweis auf die eventuelle Beteiligung von CpoA an der Synthese der Lipoteichonsäuren gewertet werden. Zudem wurde ein Kompetenzdefekt in Mutanten mit veränderten Teichonsäuren bereits beschrieben (Zhang et al., 1999; Tomasz, 1968). Einige Gene des *blp*-Bacteriocin-Clusters zeigten ein Transkriptmengenverhältnis $<0,5$ (4.2.1). Zudem waren zwei weitere uncharakterisierte Cluster von Genen (*spr0098-spr0107*; *spr1546-spr1549*), welche aufgrund von Blast-Analysen im Verdacht standen, ebenfalls das Potential zur Produktion von Bacteriocinen zu besitzen, reprimiert. Kovács et al. (2006) zeigten, daß D-Alanylierte Teichonsäuren zur Resistenz gegen kationische antimikrobielle Peptide in Stamm R6 beitragen. Da es sich im Fall von R6 bereits um eine *dltA*-Mutante handelt (Kovács et al., 2006), R6 also kein D-Ala an seinen Teichonsäuren besitzt, könnte ein zusätzlicher Defekt in der Struktur von Lipoteichonsäuren, hervorgerufen durch den Ausfall der eventuellen Funktion von CpoA bei der Synthese des Lipidankers für Lipoteichonsäuren, zur Sensitivität gegen die eigenen Bacteriocine in Stamm R6 führen. Eine Reprimierung der bacteriocinproduzierenden Cluster wie *blp*, *spr0098-spr0107* oder *spr1546-spr1549* schien dadurch sinnvoll zu sein. Alle weiteren Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in P106 waren entweder Gene von hypothetischen Proteinen unbekannter Funktion oder Gene mit moderat signifikant veränderten Transkriptmengen, welche keinen ersichtlichen Zusammenhang zwischen dem beobachteten Phänotyp in der *cpoA*-Mutante P106 erkennen liesen. Eine Deletion des *cpoA*-Gens im Wildtyp-Stamm R6, sowie die Charakterisierung der resultierenden Mutante R6 Δ *cpoA* konnte eventuell zu einem definierterem Phänotyp führen und weitere Hinweise auf die Funktion von CpoA geben (4.3; 4.4).

4.2.3 Gene und Cluster mit signifikant veränderten Transkriptmengen im Vergleich von P306, P406 und P506

Neben der näheren Charakterisierung der Effekte von CpoA, waren in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich jene Mechanismen in den Mutanten P406 und P506 von Interesse, welche zur erhöhten Resistenz gegen Piperacillin in den beiden Mutanten führten (1.6; 1.7). Die Basis zu deren Identifizierung sollte durch die in der globalen Transkriptomanalyse identifizierten Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen (4.2.1) gelegt werden. Da die bei der Transkriptomanalyse von P306, P406 und P506 identifizierten Gene sehr zahlreich waren (in P306 93, in P406 102 und in P506 171; 4.2.1), war es notwendig, die Gruppe von Kandidatengenen, welche eventuell zur Resistenzhöhung führten, weiter einzuengen.

Generell konnten die in der Transkriptomanalyse auffälligen Gene in zwei Gruppen eingeteilt werden. Einerseits die Gene mit moderat veränderten Transkriptmengen mit einem Verhältnis von 2 bis 3 oder von 0,5 bis 0,33, und andererseits die Gruppe von meist in Clustern organisierten Genen mit stark veränderten Transkriptmengen (>3 -fach oder $<0,33$ -fach; 4.2.1). Am erfolgversprechendsten erschien es, zunächst die Gene der zuletzt genannten Gruppe in P306, P406 und P506 auf Unterschiede in ihren Transkriptmengen hin zu vergleichen.

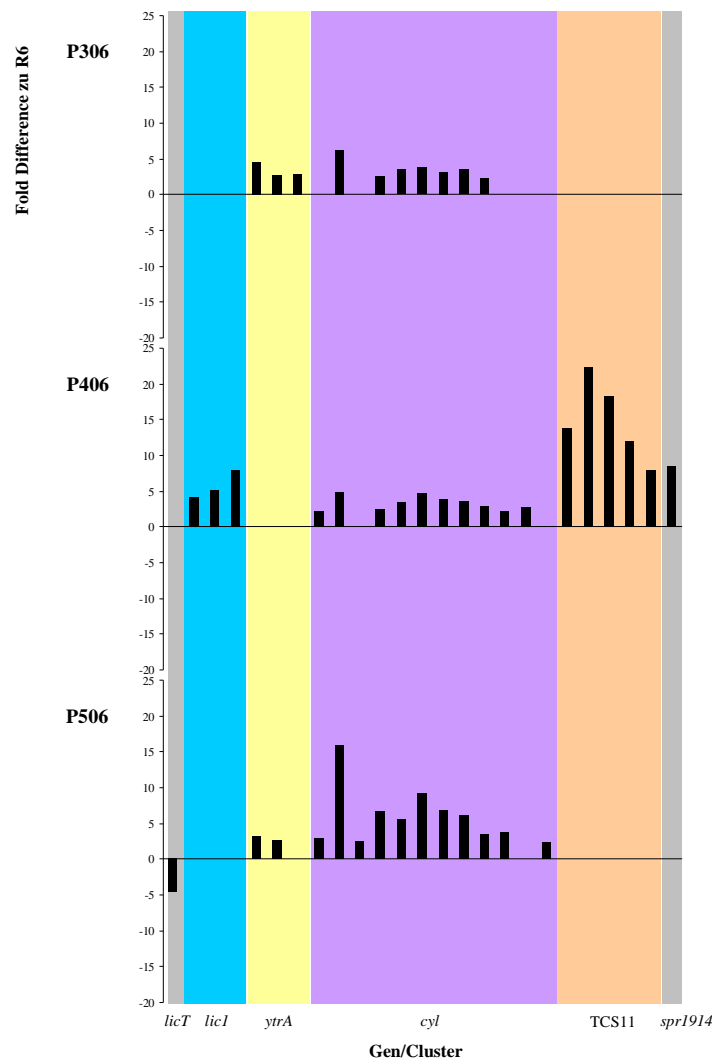


Abbildung 4.4: Gene und Gen-Cluster mit signifikant veränderten Transkriptmengen im Vergleich von P306, P406 und P506: Dargestellt wurden einzelne Gene mit einer mindestens 4-fach oder 0,25-fach veränderten Transkriptmenge und Gen-Cluster unbekannter Funktion mit putativen transkriptionellen Regulatoren bei einer mindestens 3-fach oder 0,33-fach veränderten Transkriptmenge. Gen-Cluster, bei welchen aufgrund der bereits beschriebenen Funktion keine Beteiligung an einer Resistenzerhöhung zu erwarten war, wurden nicht berücksichtigt. Die Gene der einzelnen Cluster wurden farbig hinterlegt. Einzelne Gene wurden grau hinterlegt.

Hierbei wurden nur solche einzelnen Gene berücksichtigt, welche entweder in der aus der entsprechenden Mutante isolierten, resistenteren Mutante erheblich höhere (>4), oder erheblich geringere Transkriptmengen ($<0,25$) aufwiesen. Vermutliche Transkriptionseinheiten (Operons) wurden berücksichtigt, wenn sie neben einem entsprechend hohen Unterschied ihrer Transkriptmengen auch Gene für putative

transkriptionelle Regulatoren beinhalteten. Eine Deletion der Gene solcher Regulatoren, welche wahrscheinlich die sich im Cluster befindenden Gene regulierten, konnte die Wahrscheinlichkeit, eine zur Resistenzhöhung führende Determinante zu identifizieren, erhöhen. Gencluster und Regulons, welche aufgrund ihrer bereits beschriebenen Funktion anscheinend keine für den Resistenz-Phänotyp relevante Funktion zukam, wurden hierbei nicht berücksichtigt (Kompetenzregulon, *blp*, *spr0276-spr0282*). Diese Auswahlkriterien bargen selbstverständlich die Gefahr, eventuelle resistenzvermittelnde Determinanten zu übersehen, da auch gering veränderte Transkriptverhältnisse zu ungleich höheren Effekten auf Proteinebene führen konnten. Jedoch wurde aufgrund der hohen Anzahl Genen mit signifikant veränderten Transkriptmengen, um eine Vorauswahl zu treffen, zunächst auf diese Weise verfahren. In Abbildung 4.4 sind die Fold Differences zu R6 von den Genen und Clustern, welche den angelegten Kriterien in P306, P406 und P506 entsprachen, zusammengefasst.

In Mutante P406 verblieben nach Anlegen der zuvor beschriebenen Filterkriterien drei genetische Loci, welche ausschließlich im Transkriptom von P406 auftauchten. Das TCS11-Cluster, das *lic1*-Operon, sowie *spr1914*. Die Transkriptmengen des Cytolysin-Genclusters waren im Vergleich zum Parentalstamm P306 im Wesentlichen unverändert. Das *ytrA*-Cluster zeigte im Gegensatz zu den drei ersten Mutanten keine erhöhte Transkriptmenge. In Mutante P506 hingegen zeigte das *ytrA*-Cluster wieder eine erhöhte Transkriptmenge. TCS11-Cluster und *lic1*-Operon waren hier nicht mehr auffällig, wohingegen das Cytolysin-Gencluster seine höchste Veränderung der Transkriptmengen im Vergleich zu R6 in dieser Mutante zeigte. In P506 entsprach ein weiteres Gen den Filterkriterien: *licT* kodiert für einen putativen transkriptionellen Antiterminator der BglG-Familie. Diese aus den Resultaten der globalen Transkriptomanalyse herausgefilterten Gene sollten durch die Herstellung entsprechender Deletionen auf ihre Beteiligung an der Resistenz gegen Piperacillin in den Mutanten P406 und P506 hin untersucht werden (4.5; 4.7). Hierzu wurden das Cytolysin-Gencluster, das *ytrA*-Cluster, das *lic1*-Operon, sowie das TCS11-Cluster zunächst durch Blast- und Domänen-Analysen näher charakterisiert (4.2.4; 4.2.5; 4.2.6).

4.2.4 Das Cytolysin-Gencluster (*cyl*-Cluster)

Das von Gilmore et al., 1994 erstmals näher charakterisierte Cytolysin-Gencluster (*cyl*-Cluster) des pAD1-Plasmids aus *Enterococcus faecalis* trägt durch eines seiner Produkte, das hämolytisch, sowie bakteriolytisch wirkende Zweikomponentenpeptid maßgeblich zur Virulenz von *Enterococcus faecalis* bei (Coburn & Gilmore, 2003). In Abbildung 4.5 wurde die genetische Organisation des pAD1-kodierten und des putativen, in *Streptococcus pneumoniae* R6 vorkommenden *cyl*-Clusters dargestellt.

Die Proteine CylR1 und CylR2 bilden in *Enterococcus faecalis* ein regulatorisches Zweikomponentensystem, bestehend aus dem membrangebundenen CylR1 (68aa) und dem cytosolischen transkriptionellen Regulator CylR2 (63aa), welches die Transkription des *cyl*-Clusters durch einen Quorum-Sensing Mechanismus reguliert (Coburn & Gilmore, 2003). In R6 sind diese beiden Proteine nicht vorhanden. Jedoch ist im *cyl*-Cluster von R6 anstelle von CylR1 und CylR2 ein transkriptioneller Regulator der XRE-Familie (PlcR) kodiert, von welchem der N-Terminus Homologie zu CylR2 besitzt. In R6 sind noch weitere, in *E. faecalis* nicht vorhandene Peptide kodiert, für welche jedoch aufgrund der durchgeführten Blast- und Domänenanalyse und da es sich um eine putative Transkriptionseinheit handelte, ein funktioneller Zusammenhang mit den restlichen Cyl-Proteinen möglich zu sein scheint. Spr1772 besitzt Homologie zu einem auf dem *Lc. lactis*-Plasmid pBL1 kodierten Immunitätsprotein LclB (Martinez et al., 1999; Sanchez et al., 2000).

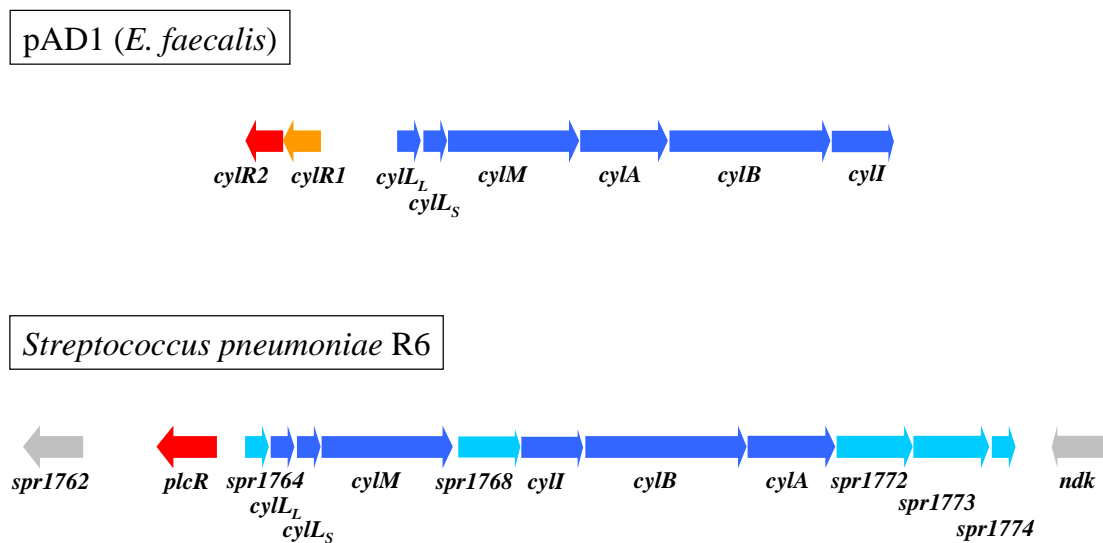


Abbildung 4.5: Genetische Organisation des *cyl*-Clusters aus *Enterococcus faecalis* und aus *Streptococcus pneumoniae* R6: Dargestellt wurde die Lokalisation der Gene des *cyl*-Clusters aus beiden Organismen. In R6 vorhandene Homologe zu den auf pAD1 kodierenden Genen (dunkelblaue Pfeile) wurden in R6 entsprechend benannt. Die Gene kodieren für folgende Proteine: CylL_L: L-Untereinheit des Cytolysins; CylL_S: S-Untereinheit des Cytolysins; CylM: CylL_L/CylL_S-modifizierendes, cytosolisches Protein; CylB: ABC-Exporter und Signalpeptidase; CylA: Serinprotease; CylI: Immunitätsprotein; CylR1 und CylR2: Regulatorisches Zweikomponentensystem; PlcR: Transkriptioneller Regulator. In R6 zusätzlich vorhandene Gene wurden durch hellblaue Pfeile dargestellt. Orange dargestellt wurde das in R6 nicht vorkommende CylR1. Graue Pfeile kennzeichnen die das *cyl*-Cluster in R6 flankierenden Gene.

LclB verleiht Immunität gegen Lactococcin 972, ein Bacteriocin aus *Lc. lactis* IPLA972. Spr1773 besitzt hohe Homologie zu ATPasen, welche im Verdacht stehen, am Transport antimikrobieller Peptide beteiligt zu sein. Spr1768 besitzt alle Domänen einer NADH-abhängigen FMN-Reduktase des WrbA-Typs. Im Fall von Spr1764 und Spr1774 konnte keine Homologie zu bereits beschriebenen Proteinen gefunden werden. CylL_L und CylL_S aus pAD1 entsprechen in R6 den von den Genen *spr1765* und *spr1766* kodierten Proteinen und wurden in Abbildung 4.5 entsprechend benannt. Hierbei könnte es sich in R6 um das aus *E. faecalis* bekannte Zweikomponenten-Cytolysin handeln. Nach Modifikation durch CylM (Gilmore et al., 1994; Booth et al., 1996), Sekretion und Entfernung des Signalpeptids von CylL_L und CylL_S durch CylB, sowie proteolytischer Aktivierung durch CylA und Oligomerbildung kann der CylL_L-CylL_S-Komplex seine lytische Aktivität entfalten. CylL_S fungiert hier zusätzlich als Signalpeptid in einem Quorum-Sensing Mechanismus und führt durch Interaktion mit dem membrangebundenen CylR1 über CylR2 zur Autoinduktion des *cyl*-Clusters (Coburn & Gilmore, 2003). Alle an den Modifikations-, Sekretions- und Aktivierungsreaktionen beteiligten Proteine sind bis auf CylR1 und CylR2 auch in R6 vorhanden (Abbildung 4.5). Bei CylI handelt es sich um ein Immunitätsprotein gegen das aktivierte Zweikomponenten-Cytolysin.

Durch die in den Mutanten P306, P406 und P506 kontinuierlich größer werdenden Transkriptmengen des *cyl*-Clusters (4.2.1; 4.2.3), bestand die Möglichkeit einer Beteiligung an der steigenden Piperacillin-Resistenz in diesen Mutanten. Durch die Herstellung von Deletionsmutanten des Regulators PlcR einerseits und des vermutlich durch ihn regulierten *cyl*-Clusters andererseits in den Mutanten P406 und P506 sollte deren Effekte auf die Piperacillin-Resistenz untersucht werden (4.5).

4.2.5 Das *ytrA*-Cluster

Die durch die Gene *spr1558-spr1560* kodierten Proteine des *ytrA*-Clusters in *Streptococcus pneumoniae* R6 wurden aufgrund ihrer erhöhten Transkriptmengen in den Mutanten P306, P406 und P506 (4.2.1; 4.2.3) ebenfalls näher durch Blast- und Domänenanalysen untersucht. In Abbildung 4.6 wurde die genetische Organisation des *ytrA*-Clusters in R6 dargestellt.



Abbildung 4.6: Genetische Organisation des *ytrA*-Clusters in *Streptococcus pneumoniae* R6. Dargestellt wurde die Lokalisation der Gene des *ytrA*-Clusters in R6. Die Gene kodieren für folgende Proteine: YtrA (rot): Transkriptioneller Regulator der GntR/YtrA-Familie; die blau markierten Proteine bilden einen putativen ABC-Transporter: Spr1559: ATPase; Spr1560: Permease; grau dargestellt sind die das *ytrA*-Cluster in R6 flankierenden Gene.

Das *ytrA*-Cluster besteht in R6 aus drei Genen, welche eventuell eine Transkriptionseinheit darstellen und welche durch den von *spr1558* kodierten putativen transkriptionellen Regulator reguliert werden könnten. Der transkriptionelle Regulator konnte anhand der von Rigali et al. (2002), aufgestellten Einteilung der Gruppe der GntR-artigen Proteine zur Untergruppe YtrA zugeordnet werden. *Spr1559* scheint für eine ATPase und *spr1560* für eine Permease zu kodieren. In Streptococceen ist das Cluster in seiner wie in Abbildung 4.6 dargestellten Organisation hoch konserviert. Funktionell wurde es jedoch in keinem dieser Organismen charakterisiert. In *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 gehört das Cluster zur Gruppe der auf das Quorum-Sensing-Peptid ComC des Kompetenzregulons reagierenden Gene (Peterson et al., 2004; 4.2.1). YtrA besitzt laut Blast-Analyse in *B. subtilis* mehrere homologe Proteine, welche alle putative Regulatoren des GntR-Typs darstellen. Die ähnlichsten unter diesen Proteinen sind YhcF und YtrA. Die ATPase-Komponente Spr1559 besitzt die größte Homologie zu YtrB, der durch *ytrB* kodierten ATPase-Komponente des *ytrABCX*-Operons in *B. subtilis*. Für Spr1560 hingegen konnte kein homologes Protein in *B. subtilis* identifiziert werden. Das *ytrABCX*-Operon in *B. subtilis* ist an der Aufnahme von Acetoin in Abwesenheit ausreichender C- und Energiequellen beteiligt (Yoshida et al., 2000). Durch die Deletion des *ytrA*-Clusters in den Mutanten P406 und P506 sollte dessen Effekt auf die Piperacillin-Resistenz untersucht werden (4.5).

4.2.6 Das *lic1*-Operon

Einzelne Funktionen der Gene des *lic1*-Operons mit bis zu 8-fach höheren Transkriptmengen in Mutante P406 (4.2.1, Abbildung 4.3; 4.2.3, Abbildung 4.4) wurden bereits charakterisiert (1.4). Das *lic1*-Operon ist Teil eines Clusters, welcher in *Streptococcus pneumoniae* am Einbau von Phosphoryl-Cholin (PCho) in die Teichonsäuren beteiligt ist. In Abbildung 4.7 wurde die genetische Organisation des *lic1*-Operons dargestellt.

Die beschriebenen und vermuteten Funktionen der einzelnen Gene des *lic1*-Operons, sowie dessen Regulation wurden bereits unter 1.4 ausgeführt.

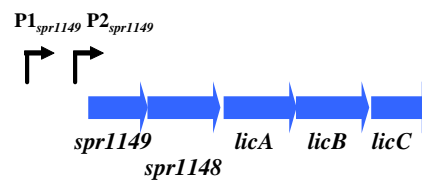


Abbildung 4.7: Genetische Organisation des *lic1*-Operons in *Streptococcus pneumoniae* R6. Das *lic1*-Operon beinhaltet 5 Gene (symbolisiert durch blaue Pfeile). Bereits beschriebene Promotoren wurden als schwarze Pfeile dargestellt. Das *lic1*-Operon wird von zwei Transkriptionsstartpunkten aus transkribiert ($P1_{spr1149}$ und $P2_{spr1149}$).

Aufgrund der für *Streptococcus pneumoniae* charakteristischen, essentiellen Funktion des *lic*-Clusters, musste trotz der auffällig erhöhten Transkriptmengen in Mutante P406 von einer Deletion zur Überprüfung des Beitrags zur Resistenzhöhung in dieser Mutante abgesehen werden.

4.2.7 Das Zweikomponentensystem-11-Cluster (TCS11)

In Mutante P406 konnte bei der globalen Transkriptomanalyse eine bis zu 22-fach erhöhte Transkriptmenge von fünf im Genom von *Streptococcus pneumoniae* R6 benachbarten Genen beobachtet werden (4.2.1; 4.2.3). Aufgrund der Organisation dieser fünf Gene im Genom wurde vermutet, daß es sich hierbei um eine Transkriptionseinheit handelte. Bei zwei von den in diesem Cluster vorhandenen Genen handelte es sich um die Gene für eine Histidin-Kinase *spr1815* (*kin11*) und für einen Response-Regulator *spr1814* (*reg11*). Beide Gene kodieren für die Proteine des bisher uncharakterisierten Zweikomponentensystems 11 aus *Streptococcus pneumoniae* R6 (1.3). In Abbildung 4.8 wurde die genetische Organisation des nach dem Zweikomponentensystem 11 benannten TCS11-Clusters dargestellt.

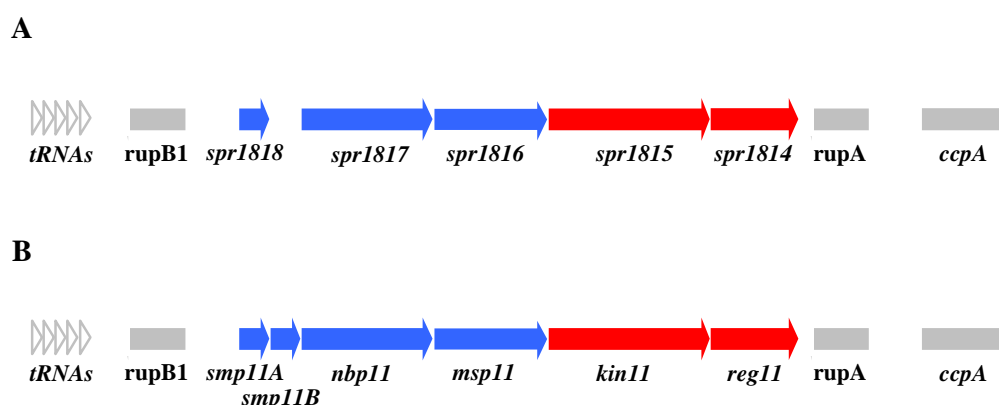


Abbildung 4.8: Genetische Organisation des TCS11-Clusters in *Streptococcus pneumoniae* R6. Als TCS11-Cluster wurden 5 benachbarte Gene im Genom von Stamm R6 bezeichnet (blaue und rote Pfeile). Die Gene *spr1815* und *spr1814* kodieren für das Zweikomponentensystem 11 (rote Pfeile). Grau markiert wurden flankierende Gene (graue Pfeile) und repetitive Regionen (graue Blöcke). A: Annotation im Genom von R6. B: Im Zuge der vorliegenden Arbeit modifizierte Annotation: *smp11A* und *smp11B*: Small membrane proteins 11A und 11B; *nbp11*: Nucleotide binding protein 11; *msp11*: Membrane spanning protein 11; *kin11*: Histidin-Kinase 11; *reg11*: Response-Regulator 11.

Annotiert waren im TCS11-Cluster im Genom von Stamm R6 (Genbank Nr. NC_003098) 5 Gene, welche für ein kleines 63aa zählendes Peptid (*spr1818*), eine ATPase (*spr1817*), eine putative Permease (*spr1816*), sowie die Histidin-Kinase (*spr1815*) und den Response-Regulator (*spr1814*) des Zweikomponentensystems 11 kodieren (Abbildung 4.8.A). Durch Sequenz-Vergleich mit dem nahe verwandten Stämmen TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028) und D39 (Genbank Nr. NC008533) konnte ein weiteres putatives *orf* downstream von *spr1818* identifiziert werden, welches in R6 nicht annotiert war. Da dieses *orf* über entsprechende Translationssignale (Startkodon sowie Shine-Dalgarno-Sequenz) verfügte, wurde es in der vorliegenden Arbeit als ein weiteres Gen des TCS11-Clusters behandelt (Abbildung 4.8.B, *smp11B*). Dieses zusätzliche Gen kodiert für ein weiteres kleines Peptid von 64aa. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Gennummern des TCS11-Clusters aus Gründen, welche in 4.10.7 erläutert wurden, durch alternative Bezeichnungen ersetzt (Abbildung 4.8.B). Für die beiden kleinen Peptide wurden die Bezeichnungen *smp11A* (vorher *spr1818*) und *smp11B* (small membrane protein of TCS11-Cluster A und B) eingeführt. Das ATPase-Gen *spr1817* wurde zu *nbp11* (nucleotide binding protein of TCS11-Cluster), das Permease-Gen *spr1816* zu *msp11* (membrane spanning protein of TCS11-Cluster) und die Gene des Zweikomponentensystems 11, *spr1815* und *spr1814* zu *kin11* (Kinase11) und *reg11* (Regulator11) umbenannt (Abbildung 4.8.B). Im Genom von *Streptococcus pneumoniae* R6 wurde das TCS11-Cluster von zwei repetitiven Elementen (*rupB1* und *rupA* in Abbildung 4.8.B; Oggioni & Claverys, 1999) flankiert. Zur näheren Charakterisierung wurden für alle im TCS11-Cluster kodierten Proteine Blast- und Domänenanalysen durchgeführt (Abbildung 4.9). In *Smp11A* und *Smp11B* konnten je zwei Transmembrandomänen (aa7-25 und 30-47 in *Smp11A*; aa5-22 und 34-56 in *Smp11B*), unter Nutzung der entsprechenden Funktionen auf www.smart.embl-heidelberg.de und www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html identifiziert werden. Bei *Nbp11* handelt es sich um eine ATPase der TC 3.A.1 Superfamilie (ATP binding cassette, ABC-superfamily; Busch & Saier, 2002) bzw. eine ATPase der AAA-Domänen-Familie (Patel & Latterich, 1998). Blast-Analysen konnten für *Nbp11* jedoch kein zur Zeit charakterisiertes, homologes Protein identifizieren, durch welches eine nähere Klassifizierung möglich geworden wäre. In der putativen Permease *Msp11* konnten 6 Transmembrandomänen identifiziert werden (aa20-39, aa54-76, aa97-119, aa134-156, aa165-187, aa216-238; Abbildung 4.9).

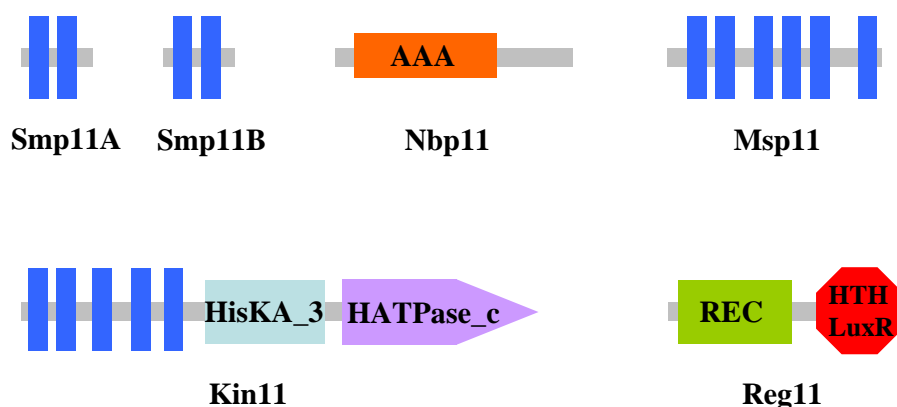


Abbildung 4.9: Funktionelle Domänen der durch das TCS11-Cluster kodierten Proteine. Graue Balken: Proteine; blaue Balken: Transmembrandomänen; AAA: ATPase-Domäne der AAA-Familie; HisKA_3: Dimerisations- und Phosphoakzeptordomäne (Pfam); HATPase_c: Katalytische Domäne der Histidinkinase; REC: Receiver Domäne (Phosphoakzeptor-Site, CheY-Familie); HTH_LuxR: Helix-Turn_Helix DNA-Bindedomäne des LuxR-Typs.

Msp11 zeigte, genau wie Nbp11 keine Homologie zu bereits charakterisierten Proteinen. Jedoch waren Homologe zu Msp11 und Nbp11 in anderen Gram-positiven Bakterien wie *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, sowie anderer Vertreter der Milchsäurebakterien immer in direkter Nachbarschaft im jeweiligen Genom kodiert. Kin11 besitzt an seinem N-Terminus 5 Transmembrandomänen (aa7-29, 33-50, 63-85, 105-122, 129-148). Es konnten keine größeren extracytoplasmären Loops zwischen diesen Transmembrandomänen, wie sie für die Stimulusperzeption im extrazellulären Raum meist erforderlich sind identifiziert werden. Es folgen eine Linkerregion und eine HisKA_3- (HPK7) Domäne (Abbildung 4.9; Grebe & Stock, 1999). HisKA_3-Domänen stellen die Dimerisations- und Phosphoakzeptordomänen von Histidin-Kinasen dar. C-terminal konnte eine HATPase_c-Domäne identifiziert werden (Grebe & Stock, 1999). HATPase_c-Domänen sind die katalytisch aktiven Zentren der Histidin-Kinasen, welche den Phosphoryltransfer von ATP auf die HisKA_3-Domäne katalysieren. Aufgrund der Domänenstruktur von Kin11 konnte sie der Gruppe der DesK-ähnlichen, intramembran-perzipierenden Histidin-Kinasen mit 4-6 Transmembrandomänen zugeordnet werden (Mascher et al., 2006c). Die direkte Nachbarschaft der Gene des Zweikomponentensystems 11 zu den Genen eines ABC-Transporters sprach zudem für eine eventuelle funktionelle Kopplung wie im Falle des Systems BceABRS (Ohki et al., 2003). Auch für Kin11 konnten keine Homologe mit beschriebenen Funktionen gefunden werden, wobei die homologen Proteine zu Kin11 jedoch ebenfalls in anderen Gram-positiven Bakterien in direkter Nachbarschaft zu Nbp11- und Msp11-Homologen kodiert waren. Reg11 besitzt eine N-terminale REC-Domäne (Pao & Saier Jr., 1995) und eine C-terminale HTH-LuxR-Domäne (Fuqua et al., 1994). REC-Domänen stellen die Phosphoakzeptor-Site von Response-Regulatoren, HTH-LuxR die DNA-Bindedomäne von Response-Regulatoren des LuxR-Typs dar. Da das TCS11-Cluster in Mutante P406 erheblich erhöhte Transkriptmengen im Vergleich zu Stamm R6 aufwies (4.2.1; 4.2.3), sollte durch die Konstruktion einer *kin11reg11*-Deletionsmutante von P406 überprüft werden, ob das TCS11-Cluster an der erhöhten Piperacillin-Resistenz in P406 beteiligt ist (4.7).

4.3 Phänotyp einer *cpoA*-Deletionsmutante (R6 Δ *cpoA*)

Die Glycosyltransferase CpoA wurde durch Grebe et al. (1997) als Teil eines unbekanntes Resistenzmechanismus gegen Piperacillin in *Streptococcus pneumoniae*, identifiziert (1.2). Die Deletion eines einzelnen Adenosin-Restes im Bereich des vermuteten 5'-Endes des *cpoA*-Transkriptes führte im Wildtyp-Stamm R6 zu dem Resistenzphänotyp von Mutante P106 (siehe Abbildung 4.10; Grebe et al., 1997; 1.2). Aufgrund des nicht kartierten Transkriptionsstartpunktes von *cpoA*, sowie des nicht bestimmten Translationsstarts, war jedoch unklar, was diese Mutation bewirkte. Von Grebe et al. (1997) konnte CpoA in Mutante P106 mit polyklonalen Anti-CpoA-Antikörpern nicht mehr detektiert werden. Ein Ansatz, diesen Effekt oder die Funktion von CpoA zu verstehen, sollte die Charakterisierung einer *cpoA*-Deletionsmutante darstellen. Zusammen mit den bei der phänotypischen Charakterisierung der Mutante P106 (4.1), sowie deren Transkriptomanalyse (4.2) beobachteten Effekten könnte dies dazu beitragen, die Funktion von CpoA in *Streptococcus pneumoniae* aufzuklären. Von Interesse war zudem, ob sich die beschriebene Mutation in P106 überhaupt auf dem *cpoA*-Transkript befindet. Hierzu sollte der Transkriptionsstartpunkt von *cpoA* durch eine 5'-RACE-Analyse bestimmt werden.

4.3.1 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *cpoA*

Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *cpoA* wurde wie unter 3.12 beschrieben durchgeführt. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus einer in CpH8-Medium exponentiell wachsenden Kultur der Zelldichte $N=40$ von *Streptococcus pneumoniae* R6 isoliert. Zur Herstellung von cDNA wurde der *cpoA*-spezifische Primer cpoARACE2 eingesetzt. Die Amplifikation des 5'-Bereichs des *cpoA*-Transkriptes mit der hergestellten cDNA als Template, wurde unter Verwendung des Primerpaares cpoARACE1 (*cpoA*-spezifisch) und RACE_PCR_5' (2.3, Tabelle 2.5) durchgeführt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des TAP-behandelten- und des TAP-unbehandelten Ansatzes war nur im TAP-behandelten Ansatz eine Bande sichtbar. Zumindest bei den zur Anzucht von $R6\Delta cpoA$ vorherrschenden Wachstumsbedingungen schien *cpoA*, aufgrund der Tatsache, daß nur eine Bande im TAP-behandelten Ansatz sichtbar war, nur von einem Transkriptionsstartpunkt aus transkribiert zu werden. Durch die Sequenzierung dieses erhaltenen PCR-Produktes aus dem mit TAP behandelten Ansatz (3.12) mit den Primern cpoARACE1 und RACE_PCR_5' konnte ein Transkriptionsstartpunkt von *cpoA* identifiziert werden (Abbildung 4.10).

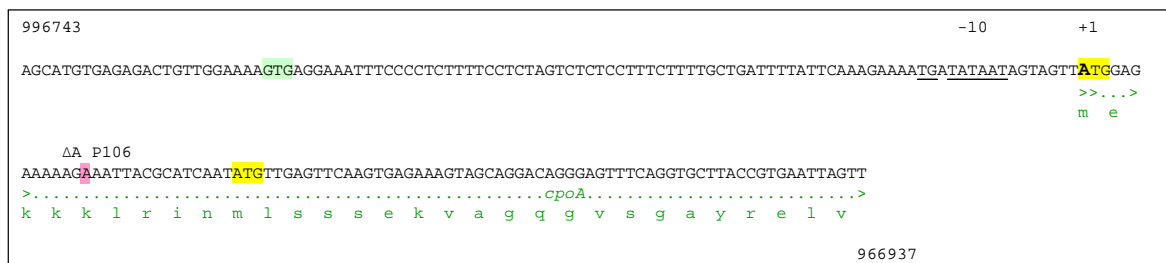


Abbildung 4.10: Promotorregion des *cpoA*-Gens. Dargestellt wurde die DNA-Sequenz von Position 996743 bis 966937 im Genom von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098). Fett gedruckt dargestellt wurde der in der 5'RACE-Analyse identifizierte Transkriptionsstart des *cpoA*-Gens. Unterstrichene Nukleotide stellen die erweiterte -10-Region von *cpoA* dar. Gelb hinterlegt wurden mögliche Startkodons. Grün hinterlegt wurde das annotierte Startkodon. Rosa hinterlegt wurde die in Mutante P106 zur erhöhten Piperacillin-Resistenz führende Deletion eines Adenosin-Restes (Grebe et al., 1997). Die Aminosäuresequenz von CpoA wurde in grünem Ein-Buchstaben-Code gezeigt.

Wie aus Abbildung 4.10 ersichtlich, befindet sich der Transkriptionsstart von *cpoA* 82 Basenpaare downstream des annotierten Startkodons. Der tatsächliche Translationsstartpunkt befindet sich downstream des bestimmten Transkriptionsstartpunktes. Die hieraus resultierenden, beiden möglichen Startkodons im Leseraster von *cpoA* wurden in Abbildung 4.10 gelb markiert. Die aus P106 beschriebene, zur erhöhten Piperacillin-Resistenz führende Deletion des Adenosin-Restes wurde rosa markiert. Die von Grebe et al. (1997) beschriebene Mutation befindet sich folglich auf dem Transkript von *cpoA*. Da jedoch upstream der beiden möglichen Startkodons keine konservierten Ribosomen-Bindestellen zu identifizieren waren, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Mutation zu einem Frameshift im Leseraster, oder zu einer veränderten Translationsinitiation führte. Handelte es sich bei dem mit dem Transkriptionsstartpunkt zusammenfallenden ATG um das tatsächliche Startkodon, so läge im Fall des *cpoA*-Transkriptes eine leaderless mRNA vor, womit die Deletion des Adenosin-Restes zu einem Frameshift führen würde. Ein tatsächliches Startkodon 15bp downstream des deletierten Adenosin-Restes, wäre aufgrund keiner sichtbaren Shine-Dalgarno-Sequenz ein Hinweis auf eine weniger effektive Translationsinitiation. Durch die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes konnte die Ursache des Phänotyps von Mutante P106 jedoch eher mit einem an die Translation von *cpoA* gebunden Effekt in Verbindung gebracht werden und würde die durch Grebe et al., 1997 beschriebene, nicht mögliche

Detektion von CpoA in Mutante P106 mit polyklonalen Anti-CpoA-Antikörpern stützen. Folglich müsste eine *cpoA*-Deletionsmutante einen mit dem von P106 vergleichbaren Phänotyp ergeben (4.3.2-4.3.4).

4.3.2 In-frame Deletion des *cpoA*-Gens in *Streptococcus pneumoniae* R6

Frühere Versuche zur Deletion von *cpoA* in *Streptococcus pneumoniae* R6 lieferten keine lebensfähigen Transformanten (Grebe et al., 1997), weshalb auf eine essentielle Funktion von CpoA spekuliert wurde. In einer von Song et al. (2005) veröffentlichten Liste essentieller Gene in *Streptococcus pneumoniae* wurde jedoch lediglich das downstream von *cpoA* liegende Gen *spr0982*, welches für eine weitere Glycosyltransferase kodiert, als essentiell ausgewiesen. In einem erneuten Versuch, *cpoA* zu deletieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Strategie gewählt, welche in der resultierenden Deletionsmutante einen möglichst geringen Effekt auf die Transkription und Translation des *spr0982*-Gens zur Folge haben sollte. Hierzu sollte nur die Glycosyltransferase-Domäne von CpoA im *cpoA*-Gen in-frame deletiert werden. Einerseits wurde dadurch sicherlich die von Edman et al. (2003) beschriebene Funktion der Glycosyltransferase inaktiviert und andererseits der Einfluß auf die Expression des downstream liegenden essentiellen *spr0982*-Gens minimiert. Zur Deletion der Glycosyltransferase-Domäne von CpoA wurde wie unter 3.11.3 beschrieben unter Verwendung der Janus-Kassette vorgegangen, wobei der Streptomycin-resistente R6*rpsL* als Ausgangsstamm verwendet wurde. Hierzu wurden ein zur Integration der Janus-Kassette in *cpoA* benötigtes Konstrukt 1 und ein zur Einbringung der In-frame Deletion und Excision der Janus-Kassette benötigtes Konstrukt 2 hergestellt. Zur Herstellung von Konstrukt 1 wurden unter Verwendung der Primerpaare *cpoA*seq1 und *cpoA*Lr, sowie *cpoA*Rf und *cpoA*seq5 die den zu deletierenden Bereich flankierenden Sequenzen mittels PCR aus genomischer DNA des Stammes R6 amplifiziert. Zur Herstellung von Konstrukt 2 wurden die gleichen Abschnitte amplifiziert, wobei für den downstream liegenden Bereich das Primerpaar *cpoA*Rf3 und *cpoA*_rev verwendet wurde.

Die beiden aufeinanderfolgenden Transformationen mit den hergestellten Konstrukten lieferten Transformationseffizienzen von 0,55 % bzw. 0,69 % der Lebendkeimzahl. Dies entsprach den für den Stamm R6 unter diesen Bedingungen zu erreichenden Werten (vgl. 4.1.2, Abbildung 4.2). Somit konnte die Gefahr der Selektion von Sekundärmutationen weitgehend ausgeschlossen werden (3.11).

Nach der Durchführung der Transformation des Streptomycin-resistenten R6*rpsL* mit Konstrukt 1, der Selektion auf Kanamycin, der Transformation der Kanamycin-resistenten Transformanten mit dem Konstrukt 2 und Selektion auf Streptomycin wurden vier einzelne Transformanten mittels PCR überprüft. Hierzu wurden die Primer *cpoA*_for und *cpoA*_rev eingesetzt. Alle vier Transformanten zeigten das im Fall einer korrekten Deletion erwartete Amplifikat (3297 bp). Zur Überprüfung des hergestellten Minigens wurde die entsprechende Region unter Verwendung der Primer *cpoA*seq1 bis 7 sequenziert. Die hergestellte *cpoA*-Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* wurde im Anschluß phänotypisch charakterisiert (4.3.3).

4.3.3 Charakterisierung der Deletionsmutante R6 Δ *cpoA*

4.3.3.1 Wachstum und Zellmorphologie

Kulturen der wie unter 4.3.2 beschrieben hergestellten Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* wurden zusammen mit Kulturen des Referenzstammes R6 und der Mutante P106 wie unter 3.1.2 beschrieben in CpH8-Medium angezogen und deren Wachstum gemäß 3.1.1 dokumentiert.

Die Wachstumsexperimente wurden dreifach durchgeführt. In Abbildung 4.11 wurden die Wachstumskurven von R6, R6 Δ *cpoA* und P106 dargestellt.

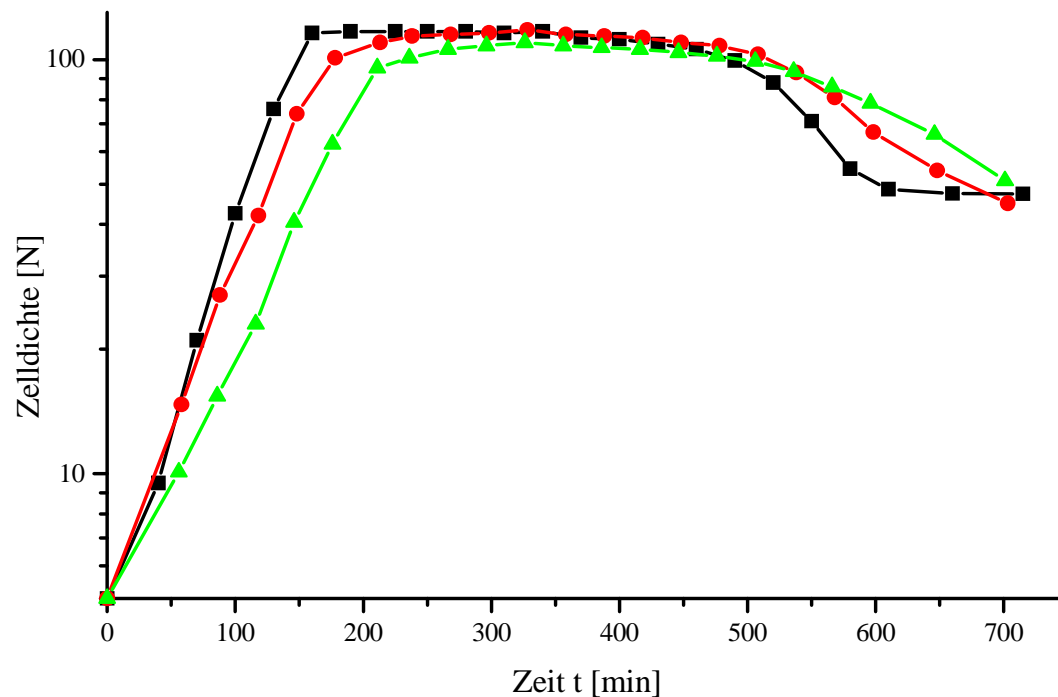


Abbildung 4.10: Wachstum der *cpoA*-Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* im Vergleich zu R6 und P106. Aufgetragen wurde die Zelldichte in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min], wobei die Wachstumskurven der einzelnen Stämme auf eine Zelldichte von $N=5$ bei $t=0$ normalisiert wurden. Das Wachstum wurde in C_pH₈-Medium verfolgt. Die Kurven stellen jeweils ein Beispiel aus drei unabhängigen Experimenten dar. ■ R6; ■ P106; ■ R6 Δ *cpoA*.

Im Wachstum der *cpoA*-Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* konnten zwei bei der phänotypischen Charakterisierung der Mutante P106 (4.1) gemachten Beobachtungen in noch ausgeprägterer Form beobachtet werden (Abbildung 4.11). Einerseits besaß R6 Δ *cpoA* eine noch längere Generationszeit als P106 (Tabelle 4.3). Andererseits konnte eine weiter verlangsamte Lyse von R6 Δ *cpoA* im Vergleich zu P106 beobachtet werden. Die Wachstumsrate und Generationszeiten der drei verglichenen Stämme wurden in Tabelle 4.3 gegenübergestellt.

Tabelle 4.3: Generationszeiten und Wachstumsraten von R6, P106 und R6 Δ *cpoA*

| Stamm/Mutante | Wachstumsrate μ [min ⁻¹] | Generationszeit g [min] ¹⁾ |
|-------------------------|--|---|
| R6 | 0,0230 | 30 |
| P106 | 0,0180 | 38 |
| R6 Δ <i>cpoA</i> | 0,0146 | 47 |

¹⁾ gerundet

Durch die Deletion von *cpoA* in R6 konnte somit gezeigt werden, daß die Ursache für die Wachstumseffekte in der Mutante P106 in einer verminderten Menge an CpoA begründet lag. Von Grebe et al. (1997) wurde aufgrund von Sequenzhomologien von CpoA zu entsprechenden Proteinen eine Beteiligung an der Teichonsäuresynthese vorgeschlagen (1.2; 1.4). Die bei der phänotypischen Charakterisierung, sowie der Transkriptomanalyse der Mutante P106 beobachteten Veränderungen stützten diese Vermutung (4.1; 4.2.2) oder standen zumindest nicht im Widerspruch. Eine verminderte Lyserate könnte als Hinweis auf einen Defekt in den Teichonsäuren gewertet werden (1.4). Eine weitere physiologische Funktion, welche den Teichonsäuren zugeschrieben wurde, ist die Funktion als Reservoir für zur Aktivität vieler Enzyme benötigte Mg²⁺-Ionen (Lambert et al., 1975; Neuhaus &

Baddiley, 2003 und Referenzen). Zudem sind Teichonsäuren an der elektromechanischen Expansion und -Kontraktion der Zellwand in Reaktion auf Veränderungen des pH-Wertes beteiligt (Neuhaus & Baddiley, 2003 und Referenzen). Zusätzliche Wachstumsexperimente in Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionenkonzentration und pH-Wert konnten somit weitere Hinweise auf eine eventuelle Beteiligung von CpoA an der Synthese von Teichonsäuren liefern (4.3.3.2).

Bei einer mikroskopischen Untersuchung (3.1.4) zeigten Zellen von $R6\Delta cpoA$ keine zellmorphologischen Abweichungen im Vergleich zum Referenzstamm R6.

4.3.3.2 Einfluß von Mg^{2+} und pH-Wert auf das Wachstum von $R6\Delta cpoA$

pH-Wert

Zur Charakterisierung des Wachstums von $R6\Delta cpoA$ bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich zu R6 wurden Kulturen beider Stämme wie unter 3.1.2 beschrieben in CpH8-, CpH6- und CpH4-Medium angezogen und deren Wachstum gemäß 3.1.1 dokumentiert. Die Wachstumsexperimente wurden zweifach durchgeführt. In Abbildung 4.12 wurden die Wachstumskurven von R6 (schwarz) und $R6\Delta cpoA$ (grün) bei pH8, pH6 und pH4 dargestellt. Deutlich war im Fall von $R6\Delta cpoA$ eine verminderte Säuretoleranz zu erkennen. $R6\Delta cpoA$ war bei einem pH-Wert von 6 bereits deutlich im Wachstum gehemmt, wohingegen R6 unter diesen Bedingungen erst ab der mittleren exponentiellen Phase ein langsames Wachstum zeigte. Bei einem pH-Wert von 4 konnte im Fall von $R6\Delta cpoA$ kein Wachstum mehr verzeichnet werden. R6 dagegen war auch bei diesen Bedingungen noch in der Lage, zumindest bis zu einer Zelldichte von $N=10$ zu wachsen. Die im Vergleich zu R6 erheblich verminderte Säuretoleranz von $R6\Delta cpoA$ konnte als Hinweis auf einen Defekt in den die elektromechanischen Eigenschaften der Gram-positiven Zellwand beeinflussenden Teichonsäuren gedeutet werden.

Mg^{2+} -Ionenkonzentration

Um die Abhängigkeit des Wachstumsphänotyps von $R6\Delta cpoA$ von der Verfügbarkeit von zweiwertigem Mg zu überprüfen, wurden Kulturen von $R6\Delta cpoA$ wie unter 3.1.2 beschrieben in CpH8- und CpH6-Medium mit zwei verschiedenen Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen (450 μM und 900 μM) angezogen und deren Wachstum gemäß 3.1.1 dokumentiert. In Abbildung 4.13 wurden die so erhaltenen Wachstumskurven von $R6\Delta cpoA$ aufgetragen. Bei regulären Wachstumsbedingungen in CpH8-Medium mit einer Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen von 450 μM zeigte $R6\Delta cpoA$ das bereits unter 4.3.3.1 beobachtete Wachstum mit entsprechender Generationszeit (Tabelle 4.4). Die Anwesenheit der doppelten Menge an verfügbarem zweiwertigen Mg (900 μM) führte bei pH8 zu einer Verkürzung der bis dahin beobachteten Generationszeit für $R6\Delta cpoA$ auf die für den Wildtyp R6 bestimmten 30 min (Tabelle 4.4). Eine erhöhte Verfügbarkeit von zweiwertigem Mg restaurierte folglich den Wachstumsdefekt von $R6\Delta cpoA$ auf den des Wildtyps R6. Bei einem erniedrigten pH-Wert von 6 und einer Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen von 450 μM zeigte $R6\Delta cpoA$ das bereits in Abbildung 4.12 gezeigte Verhalten. Die Generationszeit stieg im Vergleich von 50 min bei pH 8 auf 117 min bei pH6 (Tabelle 4.4). Dieser Effekt wurde durch die Anwesenheit der doppelten Menge an Mg^{2+} im Kulturmedium (900 μM) nahezu komplett aufgehoben, wobei erneut eine dem Wildtyp R6 ähnliche Generationszeit von nunmehr 34min bestimmt wurde.

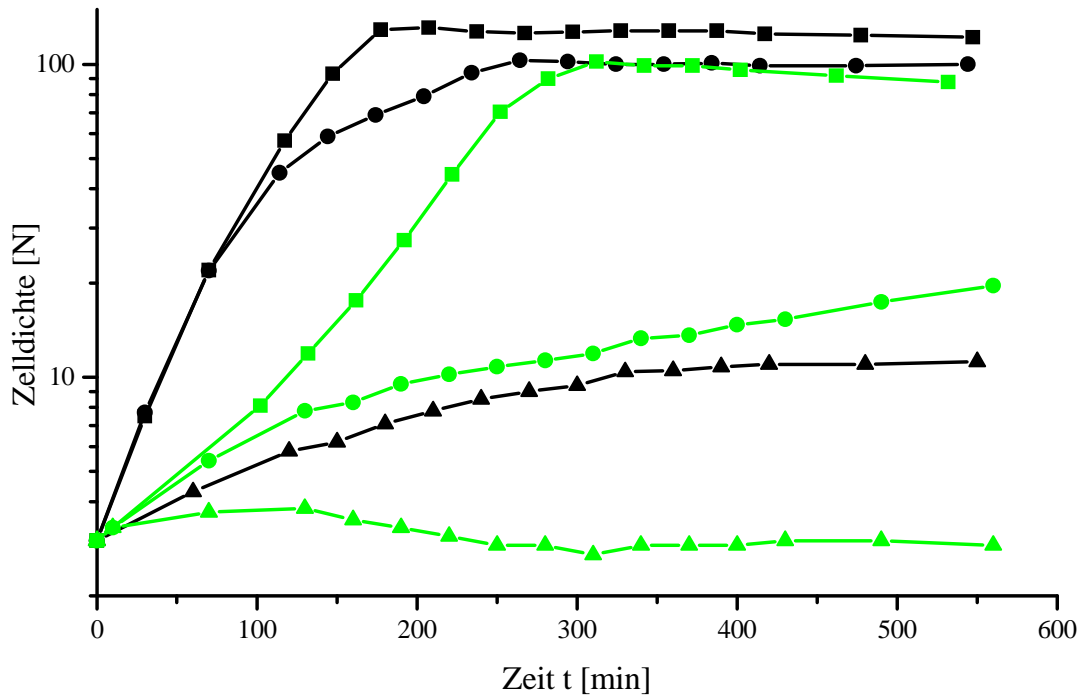


Abbildung 4.12: Einfluß des pH-Wertes auf das Wachstum der Deletionsmutante R6 Δ cpoA im Vergleich zu R6. Das Wachstum der Stämme wurde in C-Medium mit zuvor eingestellten pH-Werten verfolgt (CpH8-Medium, CpH6-Medium, CpH4-Medium). Aufgetragen wurde die Zelldichte in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min], wobei die Wachstumskurven der einzelnen Stämme auf eine Zelldichte von N=3 bei t=0 normalisiert wurden. Die Kurven stellen jeweils ein Beispiel aus zwei unabhängigen Experimenten dar. ■ R6 bei pH 8; ● R6 bei pH 6; ▲ R6 bei pH 4; ■ R6 Δ cpoA bei pH 8; ● R6 Δ cpoA bei pH 6; ▲ R6 Δ cpoA bei pH 4.

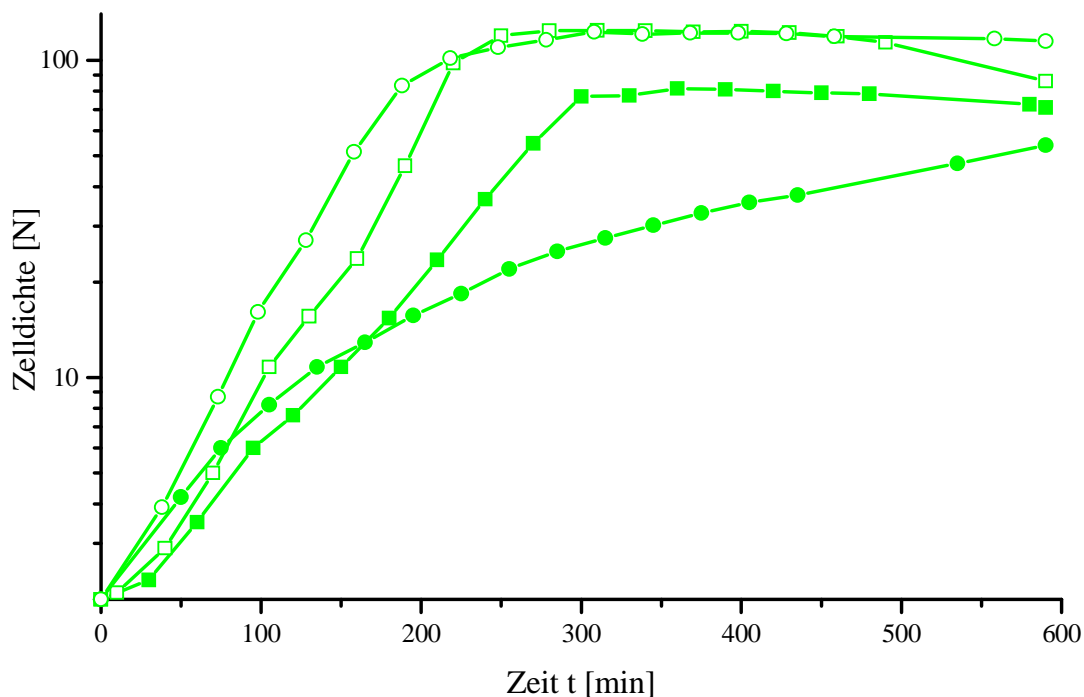


Abbildung 4.13: Einfluß der Mg²⁺-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten auf das Wachstum der Deletionsmutante R6 Δ cpoA. Das Wachstum der Stämme wurde in C-Medium mit zuvor eingestellten pH-Werten und verschiedenen Mg²⁺-Konzentrationen verfolgt (CpH8-Medium, CpH6-Medium). Aufgetragen wurde die Zelldichte in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min], wobei die Wachstumskurven der einzelnen Stämme auf eine Zelldichte von N=2 bei t=0 normalisiert wurden. Die Kurven stellen jeweils ein Beispiel aus zwei unabhängigen Experimenten dar. ■ R6 Δ cpoA bei pH8 [Mg²⁺]=450 µM; ● R6 Δ cpoA bei pH6 [Mg²⁺]=900 µM; □ R6 Δ cpoA bei pH 8 [Mg²⁺]=450 µM; ○ R6 Δ cpoA bei pH 6 [Mg²⁺]=900 µM.

Tabelle 4.4: Generationszeiten von R6 Δ cpoA in Abhängigkeit von pH-Wert und Mg²⁺-Ionenkonzentration

| Stamm/pH-Wert/[Mg ²⁺] | Wachstumsrate μ [min ⁻¹] | Generationszeit g [min] ¹⁾ |
|-----------------------------------|--|---------------------------------------|
| R6 Δ cpoA/pH8/450 μ M | 0,0135 | 50 |
| R6 Δ cpoA/pH8/900 μ M | 0,0230 | 30 |
| R6 Δ cpoA/pH6/450 μ M | 0,0059 | 117 |
| R6 Δ cpoA/pH6/900 μ M | 0,0200 | 34 |

¹⁾ gerundet

Streptococcus pneumoniae enthält aufgrund einer Mutation in *dltA* kein D-Ala in seinen Teichonsäuren (Kovács et al., 2006). In *Staphylococcus aureus* konnte gezeigt werden, daß die Abwesenheit von D-Ala in Teichonsäuren zu einer erhöhten Bindung von Mg²⁺ führte (Lampert et al., 1975). Das Wachstum bei erniedrigtem pH-Wert führte zu einer Erniedrigung des Mg²⁺-Gehalts der Teichonsäuren und vermehrter Veresterung mit D-Ala (Archibald et al., 1973). Das Fehlen von D-Ala in den Teichonsäuren von *Streptococcus pneumoniae* R6 könnte ebenfalls einen erhöhten Bedarf an Mg²⁺ hervorrufen. Ein zusätzlicher Defekt in der Struktur von Teichonsäuren, wie für R6 Δ cpoA vermutet, könnte zu einem reduzierten Bindungsvermögen der Teichonsäuren für Mg²⁺ führen und so den beobachteten Effekt, hervorgerufen durch Erniedrigung des pH-Wertes bedingen.

4.3.3.3 Genetische Kompetenz

In Mutante P106 wurde eine verminderte genetische Kompetenz festgestellt (Grebe et al., 1997; 4.1.2). Dieser Phänotyp wurde mit einer Mutation auf dem Transkript von *cpoA* in Verbindung gebracht (4.3.1) und sollte auch in der Deletionsmutante R6 Δ cpoA zu beobachten sein. R6 Δ cpoA und R6 wurden hierzu in einem wie unter 3.1.7 und 4.1.2 beschriebenen Kompetenz-Test untersucht. In Abbildung 4.14 wurden die so ermittelten Transformationseffizienzen während des Wachstums von R6 und R6 Δ cpoA von einer Zelldichte von N=5 bis in die stationäre Phase (N=120-130) als Funktion der Zelldichte aufgetragen. Die Deletionsmutante R6 Δ cpoA zeigte wie erwartet einen der Mutante P106 vergleichbaren Kompetenzdefekt (grüne Kurve in Abbildung 4.14; vgl. 4.1.2). Somit lag die von Grebe et al. (1997) auf eine Mutation vor *cpoA* zurückgeführte, schlechtere Transformierbarkeit der Mutante P106 eindeutig in einer geringeren Menge oder der Abwesenheit der Funktion von CpoA begründet. Vor dem Hintergrund des beschriebenen Transformationsdefektes einer Mutante mit einem Defekt in der Teichonsäuresynthese (Zhang et al., 1999) war dies ein erneuter Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von CpoA an der Synthese des Lipidankers von Lipoteichonsäuren.

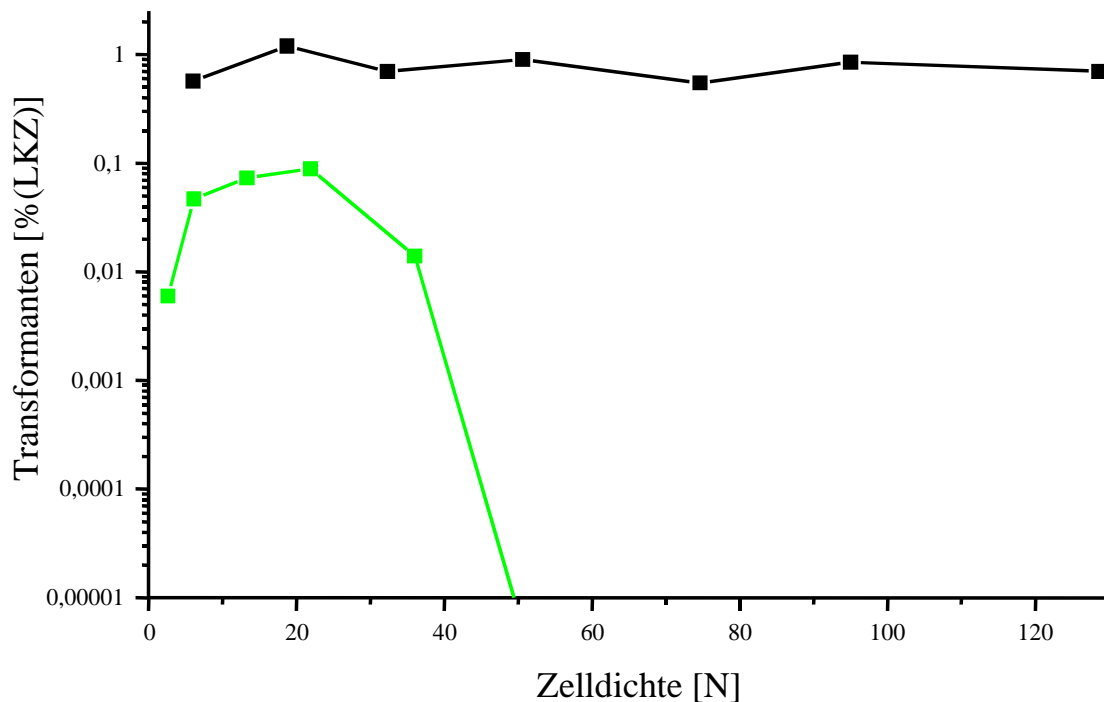


Abbildung 4.14: Genetische Kompetenz der Deletionsmutante R6ΔcpoA im Vergleich zu R6: Dargestellt wurden die Transformationseffizienzen als prozentualer Anteil der Lebendkeimzahl [% (LKZ)] in Abhängigkeit der Zelldichte in Nepheloeinheiten [N]. ■ R6; ■ R6ΔcpoA.

4.3.3.4 MHK von Piperacillin für R6ΔcpoA

Die MHK-Bestimmung der Deletionsmutante R6ΔcpoA für Piperacillin wurde wie unter 3.1.5 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurde die MHK für R6 und Mutante P106 erneut zum direkten Vergleich bestimmt. Für R6ΔcpoA konnte eine vergleichbare Erhöhung der MHK für Piperacillin wie in Mutante P106 festgestellt werden. In Tabelle 4.5 wurden die bestimmten MHK-Werte im Vergleich von R6ΔcpoA, P106 und R6 dargestellt. R6ΔcpoA war in der Lage, geringfügig höhere Konzentration von Piperacillin als die Mutante P106 zu tolerieren.

Tabelle 4.5: MHK von Piperacillin von R6ΔcpoA, R6 und P106

| Stamm/Mutante | MHK [μg/ml] |
|---------------|-------------|
| R6 | 0,015 |
| P106 | 0,04 |
| R6ΔcpoA | 0,045 |

4.3.3.5 Die Penicillin-Bindeproteine von R6ΔcpoA

Markierung mit Bocillin

Neben den bereits in der vorliegenden Arbeit anhand der Deletionsmutante R6ΔcpoA verifizierten und neu identifizierten phänotypischen Effekte eines Ausfalls der CpoA-Funktion wurde von Grebe et al. (1997) eine verringerte Menge des Penicillin-Bindeproteins Pbp1a in Mutante P106 beobachtet (1.6). Pbp1a, eine Transglycosylase-Transpeptidase (Di Guilmi et al., 1998 und Referenzen; Job et al., 2003 und Referenzen) wird eine Rolle bei der Zellwandsynthese in der Septumbildung zugeordnet (Morlot et al., 2003). Sollte die geringere Menge an Pbp1a tatsächlich die Folge von fehlendem CpoA sein, so müsste dies auch in

R6 Δ *cpoA* zu beobachten sein. Zur Abklärung des Sachverhalts wurden Kulturen von R6, der Mutante P106 und von R6 Δ *cpoA* wie unter 3.1.2 beschrieben in CpH8-Medium angezogen und bei einer Zelldichte von $N=40$ geerntet. Die Auftrennung und Markierung der Pbps wurde wie unter 3.19 beschrieben durchgeführt. Von den hergestellten Standardproben wurden hierbei je 2,5 μ l, 5 μ l und 10 μ l aufgetragen. Abbildung 4.15 zeigt das so erhaltene Pbp-Pattern der drei zu vergleichenden Stämme.

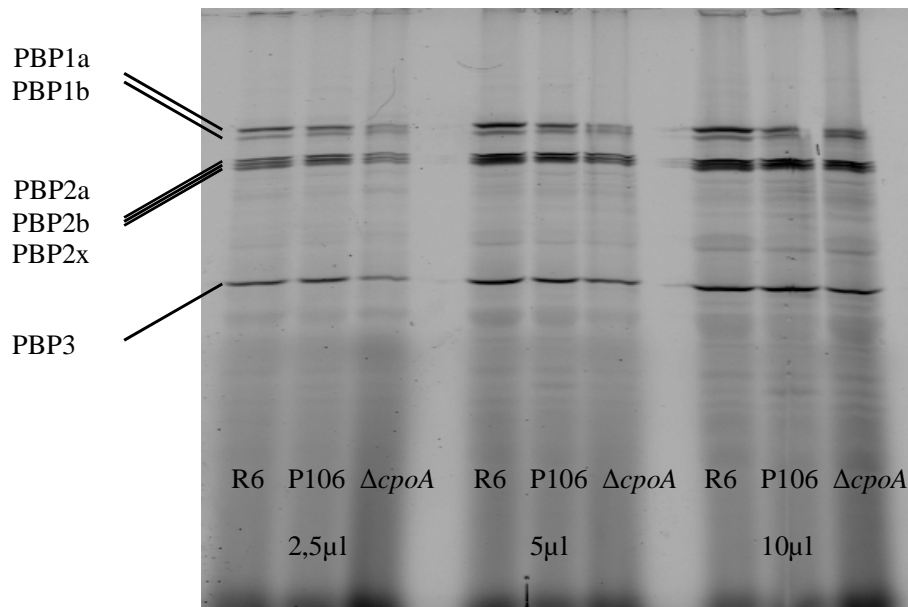


Abbildung 4.15: Bocillin-markierte Pbps aus R6, P106 und R6 Δ *cpoA*. Aufgetragen wurden je 2,5 μ l, 5 μ l und 10 μ l der hergestellten Standardproben (Zellysate aus 1ml Zellen bei $N=20$). Die Auftrennung erfolgte in einem 10% SDS-Gel. Zu erkennen waren 6 Pbps: Pbp1a, 1b, 2a, 2b, 2x, 3.

Die schon von Grebe et al. (1997) beobachtete verringerte Menge an Pbp1a in Mutante P106 konnte in der Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 4.15) und schien hier noch ausgeprägter zu sein. Der Zusammenhang zwischen CpoA und Pbp1a ist jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt.

Transkriptmenge von *pbp1a* in R6 und R6 Δ *cpoA*

Die erniedrigte Menge an Pbp1a in Mutante P106 resultierte möglicherweise aus Effekten auf die Translationseffizienz oder einer posttranslationalen Degradation. Grebe et al. (1997) konnten in Northern-Analysen das *pbp1a*-Transkript in anscheinend äquivalenten Mengen in R6 und P106 nachweisen. Um die Ursache der verringerten Menge an Pbp1a in den Mutanten P106 und R6 Δ *cpoA* einem transkriptionellen oder einem translationellen bzw. posttranslationalen Effekt zuzuweisen, wurde die Transkriptmenge von *pbp1a* in R6 und R6 Δ *cpoA* mittels Real-Time PCR bestimmt. Hierzu wurde wie unter 3.8 beschrieben verfahren. Die hierzu benötigte Gesamt-RNA wurde aus in CpH8-Medium exponentiell wachsenden Kulturen beider Stämme bei einer Zelldichte von $N=40$ isoliert. Zur Durchführung der Real-Time PCR wurden die *pbp1a*-spezifischen Primer *pbp1af* und *pbp1ar* verwendet. Die Real-Time PCR wurde jeweils doppelt mit je zwei separat isolierten Gesamt-RNA-Isolaten beider Stämme durchgeführt. In Tabelle 4.6 wurden die aus den vier durchgeführten Real-Time PCRs erhaltenen Transkriptverhältnisse von R6 Δ *cpoA* zu R6, dargestellt.

Tabelle 4.6: Quantifizierung des *pbp1a*-Transkripts in R6 und R6 Δ *cpoA*

| Real-Time Lauf Nr. / RNA-Isolat-Nr. | <i>pbp1a</i> -Transkriptverhältnis [R6 Δ <i>cpoA</i> /R6] |
|-------------------------------------|--|
| 1 / 1 | 1,28 |
| 2 / 1 | 0,80 |
| 3 / 2 | 1,10 |
| 4 / 2 | 1,00 |

Wie aus Tabelle 4.6 zu ersehen, konnten vergleichbare Transkriptmengen von *pbp1a* in R6 Δ *cpoA* und R6 beobachtet werden. Bei dem Effekt auf die Menge an Pbp1a in der Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* und der Mutante P106 handelte es sich folglich um einen Effekt auf die Translationseffizienz oder eine posttranslationelle Degradation.

4.4 Vergleich der im Verhältnis zu R6 veränderten Transkriptmengen in R6 Δ *cpoA* und P106

Bei der phänotypischen Charakterisierung von R6 Δ *cpoA* konnten alle zuvor beobachteten Merkmale der Mutante P106 in meist stärkerer Ausprägung verifiziert werden (4.3.3). Diese Effekte konnten somit eindeutig mit der Funktion von CpoA in Verbindung gebracht werden. In einer Transkriptomanalyse von R6 Δ *cpoA* konnten die in Mutante P106 beobachteten Effekte auf transkriptioneller Ebene ebenfalls stärker ausgeprägt sein. Somit konnten durch eine Transkriptomanalyse von R6 Δ *cpoA* eventuell weitere, mit CpoA funktionell verbundene Gene identifiziert werden.

Die zur Transkriptomanalyse von R6 Δ *cpoA* eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in CpH8-Medium exponentiell wachsenden Kulturen mit einer Zelldichte von N=40 gewonnen (3.3; 3.16.3). Die Analysen wurden wiederum mit je drei aus getrennt angezogenen Kulturen, isolierten Gesamt-RNA-Präparationen jedes Stammes durchgeführt. Verwendet wurde wiederum das kommerzielle Oligo-Set der Firma MWG (3.16.1). Das Transkriptom von R6 Δ *cpoA* wurde mit dem des Referenzstamms *Streptococcus pneumoniae* R6 verglichen. Hierbei wurden nur solche Gene als signifikant angesehen, deren Transkriptmengenverhältnisse einen Wert von >2 oder <0,5 besaßen und deren Transkriptverhältnisse nach Durchführung der statistischen Analyse einen P-Wert von <0,01 aufwiesen (3.16.5). Eine detaillierte Aufstellung der Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in R6 Δ *cpoA* ist in Tabelle 7.6 im Anhang zu finden. Die Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in R6 Δ *cpoA* wurden mit dem Ergebnis der Transkriptomanalyse von Mutante P106 verglichen. In Abbildung 4.16 wurden die Veränderungen beider Transkriptome im Vergleich zu R6 gegenübergestellt. Hierbei wurden die Transkriptmengenverhältnisse zur besseren Darstellung als Fold Difference zu R6 angegeben.

Generell konnte festgestellt werden, daß es sich bei den Genen mit signifikant veränderten Transkriptmengen in R6 Δ *cpoA* überwiegend um die bereits in Mutante P106 identifizierten Gene und Cluster handelte (grüne Balken und schwarze Balken in Abbildung 4.16). Oftmals war die quantitative Ausprägung der Unterschiede der Transkriptmengen im Vergleich zu R6 im Fall von R6 Δ *cpoA* höher. Zudem zeigten von den unter 4.2.1 und 4.2.2 beschriebenen Clustern, welche in P106 auffällig wurden, in R6 Δ *cpoA* nunmehr ausnahmslos alle Gene dieser Cluster signifikant veränderte Transkriptmengen (Kompetenzregulon, *blp*-Cluster, *ytrA*-Cluster, *spr0276-spr0282*, *spr0388-spr0389*, *spr1546-spr1549*; vgl. Tabellen 7.1-7.6 im Anhang). Zusätzlich zu den bereits in P106 beobachteten Veränderungen zeigte das in der Transkriptomanalyse der Mutanten der Familie P006 in den Mutanten P206 bis P506 auffällige *cyl*-Cluster in R6 Δ *cpoA* erheblich größere Transkriptmengen (lila hinterlegt in Abbildung 4.16). Weitere Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in R6 Δ *cpoA*, welche jedoch nicht in P106 zu beobachten waren, waren mehrere Gene des Purin- und

Pyrimidinstoffwechsels (*dut*, *pyrD*, *pyrDII*, *pyrE*, *pyrF*, *carA*, hellblau markiert in Abb. 4.16). Zusammengenommen mit den in anderen Mitgliedern von Familie P006 auffälligen Genen dieser Stoffwechselwege (*purN*, *purF*, *purA*, *cdd*, *pyrP*), stellte dies eine bemerkenswerte Häufung dar. Weitere Cluster von Genen mit Transkriptmengenverhältnissen von >2 oder $<0,5$ konnten in $R6\Delta cpoA$ zusätzlich identifiziert werden (grau markiert in Abb. 4.16). Die Gene *spr0639-spr0641* (putativer Cu-Transport), *spr1968-spr1973* (Fructose- /Mannose-Stoffwechsel) und *spr1987-spr1991* (*glpFDK*, Glycero- (phospho) lipidstoffwechsel) zeigten eine bis zu 5-fach höhere Transkriptmenge. Die Gene *fatCD* und *fecE* (Fe-Transport) zeigten eine bis zu 3,5-fach geringere Transkriptmenge.

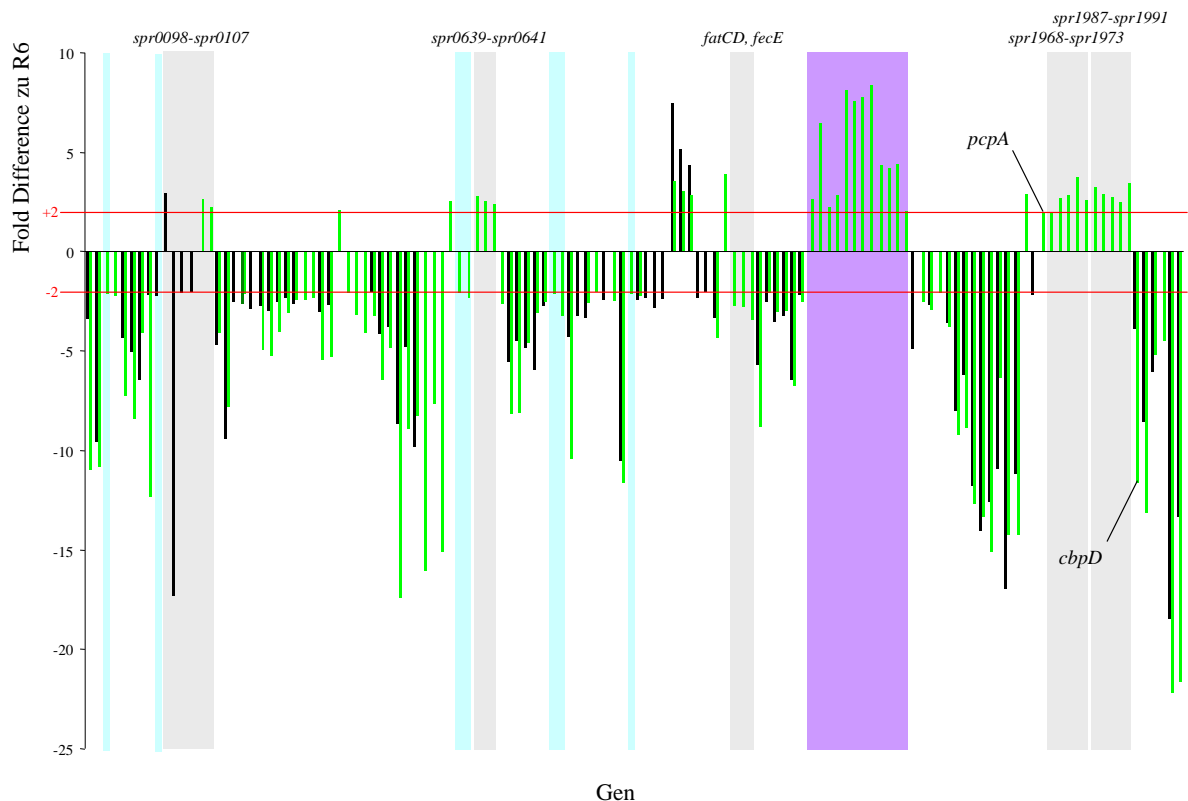


Abbildung 4.16: Vergleich der Unterschiede zu R6 im Transkriptom von P106 und $R6\Delta cpoA$. Dargestellt wurden die Fold Differences zu R6 der Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in P106 (schwarze Säulen) und $R6\Delta cpoA$ (grüne Säulen). Hellblau: Gene des Purin- und Pyrimidinstoffwechsels; Lila: Gene des *cyl*-Clusters; Grau: weitere Gencluster in $R6\Delta cpoA$ mit veränderten Transkriptmengen; *pcpA* und *cbpD*: Gene von Cholinbindeproteinen.

Lediglich die einzelnen Gene des uncharakterisierten Clusters *spr0098-spr0107*, welche in P106 von R6 abweichende Transkriptmengen zeigten, waren nunmehr in $R6\Delta cpoA$ nicht mehr auffällig. Jedoch zeigten in $R6\Delta cpoA$ einige andere Gene dieses Clusters eine von R6 verschiedene Transkriptmenge.

Im Fall der Genprodukte der auffälligen Gene des Fructose- und Mannose- bzw. des Glycero- (phospho)lipid- Stoffwechsels handelt es sich um solche Enzyme dieser Stoffwechselwege, durch deren wie in $R6\Delta cpoA$ veränderte Transkriptmengen es letztendlich zu einer erhöhten Bildung von Glyceronphosphat (Dihydroxyacetonphosphat, DHA-P) und sn-Glycerin-3-Phosphat kommen könnte, welches zur Synthese eines Lipidankers benötigt würde. Neben der geringeren Transkriptmenge des Gens des Cholinbindeproteins CbpD in P106 konnte in $R6\Delta cpoA$ mit PcpA ein weiteres Cholinbindeprotein, dessen Gen eine erniedrigte Transkriptmenge zeigte, identifiziert werden. Dem Cholinbindeprotein PcpA konnte jedoch noch keine physiologischen Funktion zugeordnet werden (Sánchez-Beato et al., 1998).

Die bei der Transkriptomanalyse von Mutante P106 identifizierten, durch eine Mutation in *cpoA* hervorgerufenen Effekte konnten somit in der Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* bestätigt werden. Zudem wurde mit den erhöhten Transkriptmengen der Gene des Mannose-/Fructose- und Glycero-(phospho)lipidstoffwechsels ein weiterer Hinweis für eine eventuelle Beteiligung von CpoA an der Synthese des Lipidankers von Lipoteichonsäuren gefunden.

4.5 Beitrag des *cyl*- und *ytrA*-Clusters zur Piperacillin-Resistenz in P406 und P506

Die bei der globalen Transkriptomanalyse der Mutanten P306, P406 und P506 im Vergleich der Veränderungen auf transkriptioneller Ebene zwischen diesen Mutanten identifizierten Gen-Cluster, stellten potentielle Kandidaten, welche an den unbekanntem Resistenzmechanismen gegen Piperacillin beteiligt sein konnten, dar (4.2.3). Zu ihnen zählten das *cyl*-Cluster, sowie das *ytrA*-Cluster (4.2.4; 4.2.5). Da jeweils starke putative Terminatorstrukturen downstream des letzten Gens identifiziert werden konnten, wurde zur Inaktivierung nach der in 3.11.2 beschriebenen Strategie verfahren. Die Gene des *cyl*-Clusters (*spr1763-spr1774*) wurden in zwei Ansätzen durch die unter 3.11.1 beschriebene *aad9*-Kassette ersetzt. In einem Ansatz wurde das *plcR*-Gen des putativen Regulators und in einem anderen Ansatz die Gene *spr1764-spr1774* ersetzt. Die Deletion des *ytrA*-Clusters erfolgte durch das Ersetzen der Gene *spr1558-spr1560* mit der unter 3.11.1 beschriebenen *tetM*-Kassette. In allen Fällen war die Orientierung der eingefügten Resistenzkassetten gleich der der inaktivierten Gene.

plcR

Zur Inaktivierung von *plcR* wurden die flankierenden Bereiche unter Verwendung der Primer Lpfor/plcrxho und plcrBam/Rp2rev in einer PCR (3.6) aus genomischer DNA von *Streptococcus pneumoniae* R6 amplifiziert und mit *XhoI* bzw. *BamHI* laut 3.10.1 verdaut. Die *aad9*-Kassette wurde aus pCR2.1-spec mit den Primern spPBam/spPXho amplifiziert und mit *BamHI* und *XhoI* verdaut. Nach erfolgter Ligation (3.10.4) wurde der Liagtionsansatz direkt in P406 und P506 laut 3.1.6 transformiert und auf 80 μ g/ml Spectinomycin selektioniert. Von zwei isolierten Transformanten wurde chromosomale DNA isoliert (3.2.1) und die Integration der *aad9*-Kassette unter Verwendung der Primer Rprev/spPXho überprüft und das amplifizierte Fragment sequenziert. Von den so hergestellten *plcR*-Deletionsmutanten P406 Δ *plcR* und P506 Δ *plcR* wurde gemäß 3.1.5 die MHK für Piperacillin bestimmt. Es zeigte sich jedoch, daß eine Deletion von *plcR* keinen Einfluß auf die erhöhte Piperacillin-Resistenz in P406 und P506 hatte.

spr1764-spr1774

Zur Inaktivierung des *cyl*-Clusters wurden die flankierenden Bereiche unter Verwendung der Primer L17xx_for/L17xx_rev und R17xx_for/R17xx_rev in einer PCR (3.6) aus genomischer DNA von *Streptococcus pneumoniae* R6 amplifiziert. Die *aad9*-Kassette wurde mit den Primern 17xxspec_for/17xxspec_rev aus pCR2.1-spec amplifiziert. Alle drei Fragmente wurden in zwei aufeinander folgenden überlappenden PCR-Reaktionen (3.6) aneinandergesetzt. Das entstandene Konstrukt wurde im Anschluß phosphoryliert (3.10.3) und mit *SmaI*-verdautes, dephosphoryliertes pUC19 ligiert. Nach Transformation und Selektion in *E. coli* DH5 α wurden die Mutanten P406 und P506 mit dem so konstruierten Plasmid pdel17 transformiert und auf 80 μ g/ml Spectinomycin selektioniert. Von zwei der Transformanten wurde chromosomale DNA isoliert und unter Verwendung der Primer ctrl17_for und ctrl17_rev die Integration der *aad9*-Kassette überprüft und das amplifizierte Fragment sequenziert. Von den so hergestellten *cyl*-Deletionsmutanten P406 Δ *cyl* und

P506 Δ *cyl* wurde gemäß 3.1.5 die MHK für Piperacillin bestimmt, wobei kein Effekt auf die erhöhte Resistenz in beiden Mutanten beobachtet werden konnte.

ytrA-Cluster

Zur Inaktivierung des *ytrA*-Clusters wurden die flankierenden Bereiche unter Verwendung der Primer L15klon_for/L15klon_rev2 und R15klon_for/R15klon_rev in einer PCR (3.6) aus genomischer DNA von *Streptococcus pneumoniae* R6 amplifiziert und mit *PstI* bzw. *XhoI* laut 3.10.1 verdaut. Die *tetM*-Kassette wurde mit den Primern tetMklon_for2 und tetMklon_rev aus pPP2 amplifiziert und mit *PstI* und *XhoI* verdaut. Nach erfolgter Ligation (3.10.4) wurde der Ligationsansatz direkt in P406 und P506 laut 3.1.6 transformiert und auf 3 μ g/ml Tetracyclin selektiert. Von zwei der Transformanten wurde chromosomale DNA isoliert und die Integration der *tetM*-Kassette unter Verwendung der Primer ctrl15_for und ctrl15_rev überprüft und das amplifizierte Fragment sequenziert. Von den so hergestellten Deletionsmutanten P406 Δ *ytrA* und P506 Δ *ytrA* wurde gemäß 3.1.5 die MHK für Piperacillin bestimmt, wobei kein Effekt auf die erhöhte Resistenz in P406 und P506 zu beobachten war.

Die beiden Cluster *ytrA* und *cyl* mit in den Mutanten P406 und P506 erhöhten Transkriptmengen (4.2.4; 4.2.5) trugen somit nicht zu den unbekanntem Resistenzmechanismen in diesen Mutanten bei.

4.6 Chromosomale Veränderungen in P406 und P506

Das TCS11-Cluster zeichnete sich in der globalen Transkriptomanalyse der Mutante P406 durch eine bis zu 22-fach erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zu Stamm R6 aus (4.2.1; 4.2.3). Eine mögliche Ursache hierfür konnten eventuelle Mutationen im intergenen Bereich upstream des Clusters, welche zur erhöhten Transkription führten, darstellen. Durch eine Sequenzierung des intergenen Bereichs upstream des TCS11-Clusters in den Mutanten P406 und P506 unter Verwendung der Primer L18xx_for, 1818_rev, 18506_for, 18506_for2, 18506_for3 und 18506_rev konnte in beiden Mutanten eine Veränderung dieses intergenen Bereichs festgestellt werden. In der Abbildung 4.20 wurden die Veränderungen schematisch dargestellt. Die genaue Sequenz dieses Bereichs in P406 und P506 wurde im Anhang unter 7.7 in den Abbildungen 7.1 und 7.2 dargestellt.

In Mutante P406 wurde der intergene Bereich zwischen dem tRNA-Cluster (graue offene Pfeile in Abbildung 4.20) und dem TCS11-Cluster, von Position 1788520-1789050 der Sequenz des annotierten Genoms von Stamm R6, welcher das repetitive Element *rupB1* beinhaltet, durch einen in *Streptococcus pneumoniae* R6 eigentlich an Position 1691500-1690845 liegenden Bereich eines tRNA-Clusters ersetzt (gelb hinterlegt in Abbildung 4.20). Auf dem eingefügten Bereich waren 7 komplette tRNA-Gene (*met3*, *met2*, *ser3*, *met1*, *phe1*, *gly1*, *ile1*), nebst dem 5'-Bereich des tRNA-Gens *ser2* kodiert (grüne Pfeile in Abbildung 4.20). In der Folgemutante P506 war zusätzlich zu dem in P406 ersetzten Bereich das *smp11A*-Gen des TCS11-Clusters vollständig und das *smp11B*-Gen bis auf wenige Nukleotide seines 3'-Endes (Position 1788106-1788519 des annotierten Genoms von Stamm R6) durch einen weiteren Teil des Bereichs, von welchem auch das tRNA-Gen-tragende Fragment in P406 stammte, ersetzt (Position 1690844-1690415, hellgrün hinterlegt in Abbildung 4.20). Infolge dieses erneuten Austausches wurde auch das tRNA-Gen *ser2*, welches in P406 nur teilweise eingefügt wurde, komplett in diesen Bereich übertragen. Zusätzlich wurde ein Großteil des 3'-Endes eines veränderten *IS1167*-Insertionselementes übertragen.

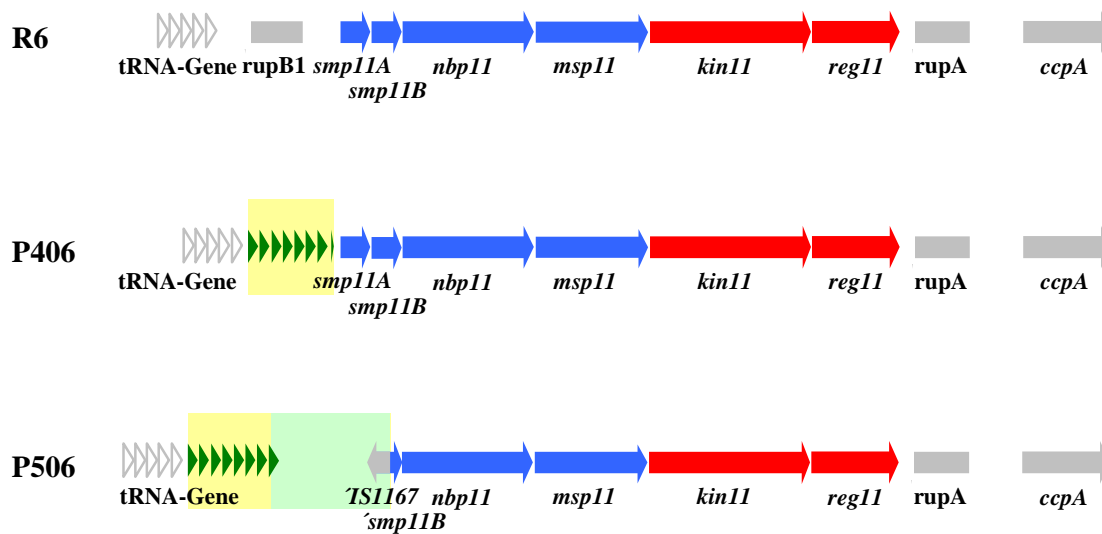


Abbildung 4.20: Veränderungen im intergenen Bereich upstream des TCS11-Cluster in P406 und P506. Dargestellt wurde das TCS11-Cluster in R6, P406 und P506. Gelb hinterlegt wurde der in Mutante P406 veränderte intergene Bereich. Grün hinterlegt wurde der in P506 zusätzlich veränderte Bereich. Dunkelgrüne Pfeile: In Mutante P406 upstream des TCS11-Clusters vorhandene tRNA-Gene (*met3*, *met2*, *ser3*, *met1*, *phe1*, *gly1*, *ile1*, *ser2* in P406 und *ser2* in P506). Graue, offene Pfeile: Gene des tRNA-Clusters upstream des TCS11-Clusters; blaue und rote Pfeile: Gene des TCS11-Clusters; rote Pfeile: Gene des Zweikomponentensystems *kin11/reg11*; graue Blöcke: repetitive Elemente; *smp11A* und *smp11B*: Gene des Small membrane proteins 11A und 11B; *nbp11*: Gen des Nucleotide binding proteins 11; *msp11*: Gen des Membrane spanning proteins 11; *kin11*: Gen der Histidin-Kinase 11; *reg11*: Gen des Response-Regulators 11; *ccpA*: Gen des Catabolite control proteins; *'IS1167*: 3'-Bereich des veränderten Insertionselementes *IS1167*; *'smp11B*: 3'-Bereich von *smp11B*.

In Mutante P406 könnte dies die Ursache für die bei der globalen Transkriptomanalyse beobachteten erhöhten Transkriptmengen der Gene des TCS11-Clusters darstellen. Durch den Austausch des intergenen Bereiches könnte eine erhöhte Transkription des TCS11-Clusters, ausgehend von Promotoren des in Stamm R6 upstream des TCS11-Clusters natürlicherweise liegenden tRNA-Genclusters (offene, graue Pfeile in Abbildung 4.20) und/oder ausgehend von Promotoren der eingefügten tRNA-Gene stattfinden. Durch die Substitution des intergenen Bereichs upstream des TCS11-Clusters wurden zudem putative Terminatorstrukturen entfernt, was zu einer Verlängerung des natürlicherweise vorhandenen Transkriptes des tRNA-Genclusters upstream des TCS11-Clusters führen konnte. In Mutante P506 hatte die Substitution von *smp11A* und einem Großteil von *smp11B* mit dem auf dem Gegenstrang kodierten Teil eines veränderten Insertionselementes vermutlich eine Termination der in P406 aufgetretenen Transkription ausgehend von Promotoren der tRNA-Gene zur Folge. Der Mechanismus, welcher zu diesen beiden aufeinanderfolgenden Substitutionen durch zwei DNA-Abschnitte eines natürlicherweise im Genom von Stamm R6 an anderer Stelle vorkommenden Bereichs führte, verbleibt ungeklärt. Es konnten keine Hinweise auf einen Mechanismus unter Beteiligung intakter, eventueller Insertionselemente (IS-Elemente) gefunden werden.

Da die Art des involvierten Mechanismus unbekannt verblieb und eine eventuelle Veränderung des Bereichs im Genom von Mutante P406, aus welchem die eingefügten Sequenzabschnitte stammten, nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde dieser Bereich näher untersucht. In Abbildung 4.21 wurde die Region im annotierten Genom von Stamm R6, aus welcher die upstream des TCS11-Clusters in Mutante P406 eingefügten Abschnitte stammten, dargestellt. In dem entsprechenden Bereich befindet sich eines der in *Streptococcus pneumoniae* R6 vorhandenen rRNA-tRNA-Gencluster (rRNA- und tRNA-

Gene als grüne Pfeile in Abbildung 4.21), sowie das *birA*-Gen eines am Biotin-Stoffwechsel beteiligten Enzyms, welches für eine Biotin--[acetyl-CoA-carboxylase] ligase kodiert. Daneben befinden sich das *msmR*- und das *aga*-Gen in diesem Bereich. *msmR* kodiert für einen Regulator des *msm*-Operons (multiple sugar metabolism) und *aga* für eine α -Galactosidase. Die Bereiche, welche nunmehr in den Mutanten P406 und P506 den intergenen Bereich upstream von, bzw. die *smp11A*- und *smp11B*-Gene des TCS11-Clusters ersetzten, wurden wie schon in Abbildung 4.20, in Abbildung 4.21 gelb bzw. hellgrün hinterlegt. Eine Überprüfung dieses Bereiches mittels PCR-Analyse wurde durch die große Ausdehnung des zu drei weiteren rRNA-tRNA-Genclustern in Stamm R6 sehr homologen rRNA-tRNA-Genclustern erschwert. Durch eine Southern-Analyse (3.17) der entsprechenden Region in P406 und Stamm R6 mit einer *birA*-spezifischen, DIG-markierten DNA-Sonde sollte überprüft werden, ob und inwiefern es hier zu Veränderungen im Zuge der im intergenen Bereich upstream des TCS11-Clusters erfolgten Substitutionen gekommen war. Möglicherweise konnten solche Veränderungen an den unbekanntenen Resistenzmechanismen in Mutante P406 und P506 beteiligt sein.

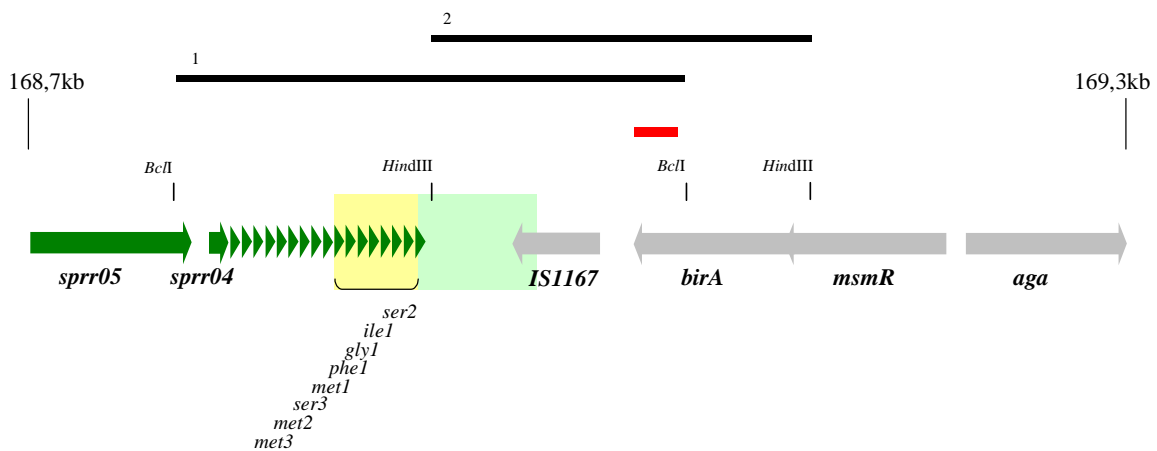


Abbildung 4.21: Genomische Region von Position 168,7kb bis 169,3kb in der Genomsequenz von *Streptococcus pneumoniae* R6. Grüne Pfeile: rRNA- (*sprr05*, *sprr04*) und tRNA-Gene; graue Pfeile: annotierte, kodierende Gene; *birA*: Gen der Biotin--[acetyl-CoA-carboxylase] ligase; *msmR*: Gen des Regulators des *msm*-Operons; *aga*: Gen der α -Galactosidase; *BclI* und *HindIII*: Restriktionsschnittstellen; gelb: In P406 upstream des TCS11-Cluster eingefügter Bereich; hellgrün: In P506 upstream des TCS11-Clusters zusätzlich eingefügter Bereich; roter Balken: Lage der Digoxigenin-markierten, *birA*-spezifischen DNA-Sonde bei der Southern-Analyse. Schwarze Balken 1 und 2: Bei der Restriktion von chromosomaler R6-DNA mit *BclI* oder *HindIII* entstehende DNA-Fragmente.

Die Durchführung der Southern-Analyse erfolgte gemäß 3.17. Eingesetzt wurde chromosomale DNA aus Stamm R6 und der Mutante P406. Die DNA beider Stämme wurde in getrennten Ansätzen mit den Restriktionseendonukleasen *BclI* und *HindIII* verdaut. In Abbildung 4.21 wurden die Positionen der Schnittstellen dieser Restriktionsenzyme, sowie die resultierenden DNA-Fragmente dargestellt. Sollte der entsprechende Bereich in P406 unverändert vorhanden sein, so wurden in der Southern-Analyse die gleichen Fragmente wie in Stamm R6 bei der Detektion erwartet (2858 bp-Fragment im *BclI*-Verdau, 1820 bp im *HindIII*-Verdau). Die Digoxigenin-markierte DNA-Sonde wurde unter Verwendung der Primer 312 und 313 wie unter 3.17 beschrieben hergestellt. Die hergestellte Sonde war zu 220 Nukleotiden des 3'-Endes des *birA*-Gens komplementär (roter Balken in Abbildung 4.21).

Nach Durchführung des wie in 3.17 beschriebenen Southern-Blots konnten die in Abbildung 4.22 dargestellten DNA-Fragmente in R6 und P406 identifiziert werden. In beiden Stämmen konnten die durch einen *BclI*- oder *HindIII*-Verdau erwarteten Banden von 2858 bp und 1820

bp detektiert werden (Abb. 4.22). Somit schien der genomische Bereich, aus dem die in Mutante P406 und P506 upstream des TCS11-Clusters eingefügten Teile stammten, in P406 unverändert. Es handelte sich also um eine Verdopplung von 7 tRNA-Genen in Mutante P406 (*met3*, *met2*, *ser3*, *met1*, *phe1*, *gly1*, *ile1*). Auf eine weitere Untersuchung des betreffenden Bereichs in Mutante P506 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund der Fokussierung auf Mutante P406 (4.7) verzichtet.

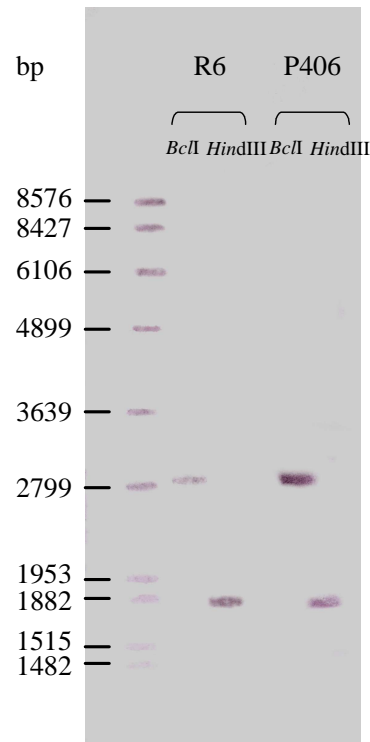


Abbildung 4.22: Genomischer Southern-Blot mit genomischer DNA Stamm R6 und Mutante P406 und einer *birA*-spezifischen. Dargestellt wurden die durch die Southern-Analyse mit *BclI*- und *HindIII*-verdauter chromosomaler DNA aus R6 und P406 detektierten Banden. Belegung der Spuren von links nach rechts: DNA Molecular Weight Marker VII-Digoxigenin labelled (Roche) mit Größen der Banden in bp, *BclI*-verdaute R6-DNA, *HindIII*-verdaute R6-DNA, *BclI*-verdaute P406-DNA, *HindIII*-verdaute P406-DNA.

4.7 Beitrag des TCS11-Clusters zur Piperacillin-Resistenz in P406

Da die Überprüfung mittels Southern-Analyse des genomischen Bereichs in P406, aus welchem der upstream des TCS11-Clusters eingefügte Teil stammte, eine im Vergleich zu R6 unveränderte Anordnung nahelegte, sollte nunmehr die Beteiligung des in der globalen Transkriptomanalyse bis zu 22-fach induzierten TCS11-Clusters (4.2) selbst an der Resistenzhöhung gegen Piperacillin in P406 untersucht werden. Hierzu sollte zunächst das durch die Gene *kin11* und *reg11* kodierte Zweikomponentensystem 11 in Mutante P406 deletiert werden (4.7.1). Im Anschluß sollte im Zuge der phänotypischen Charakterisierung durch die Bestimmung der MHK für Piperacillin der resultierenden Deletionsmutante P406 Δ *kin11reg11* der Effekt auf die Piperacillin-Resistenz untersucht werden (4.7.2).

4.7.1 Deletion der Histidin-Kinase- und Response-Regulator-Gene *kin11* und *reg11* in P406

Zur Deletion der Gene des Zweikomponentensystems 11 (*kin11* und *reg11*) wurde nach der unter 3.11.2 beschriebenen Methode verfahren. Hierbei sollten die im Genom benachbarten Gene *kin11* und *reg11* durch die *ermAM*-Kassette (3.11.1) ersetzt werden. Im resultierenden Stamm P406 Δ *kin11reg11* waren nach erfolgter Integration der *ermAM*-Kassette lediglich noch die Kodons für die ersten 48aa des N-Terminus der Histidin-Kinase und die Kodons der letzten 33aa des Response-Regulators vorhanden (Abbildung 4.23). Die *ermAM*-Kassette sollte hierbei in der gleichen Orientierung im Genom, wie die zu deletierenden Gene *kin11* und *reg11* integriert werden. Unter Verwendung der Primer LTC11_for und dTC11_rev, sowie dTCneu und dR18_rev wurden die flankierenden Bereiche der zu deletierenden Region in einer PCR (3.6) aus genomischer DNA des Stammes R6 amplifiziert. Hierbei wurde durch die Primer dTC11rev und dTCneu eine *EcoRI*- bzw. eine *XhoI*-Schnittstelle angefügt. Die *ermAM*-Kassette wurde unter Verwendung der Primer erm18_f und erm18_r aus genomischer DNA von R6dltA::*ermAM* (Kovács et al., 2006) amplifiziert, wobei durch die verwendeten Primer eine *EcoRI*- und eine *XhoI*-Schnittstelle angefügt wurde. Nach Restriktion der einzelnen Amplifikate und Ligation aller drei Fragmente wurde P406 direkt mit dem Ligationsansatz transformiert (3.1.6) und auf 2 μ g/ml Erythromycin selektioniert. Die Transformationseffizienz betrug 0,16 % der Lebendkeimzahl, was unter diesen Bedingungen für P406 den erreichbaren Werten entsprach (vgl. Abbildung 4.2 unter 4.1.2). Die Inaktivierung der *kin11*- und *reg11*-Gene wurde durch PCR auf genomischer DNA von zwei Transformanten der resultierenden Deletionsmutante P406 Δ *kin11reg11* unter Verwendung der Primer erm18_f und R18_rev2, sowie erm18_r und dTC11_for überprüft. Der so hergestellte Stamm P406 Δ *kin11reg11* wurde im Folgenden phänotypisch auf Wachstumsverhalten und Zellmorphologie, sowie seine MHK für Piperacillin hin untersucht (4.7.2).



Abbildung 4.23: Schematische Darstellung des TCS11-Clusters in P406 Δ *kin11reg11*. Gene des TCS11-Clusters wurden als blaue und rote Pfeile dargestellt. *kin11'*: Verbleibender Rest des 5'-Endes des *kin11*-Gens; *reg11'*: Verbleibender Rest des 3'-Endes des *reg11*-Gens; grüner Pfeil: Lage der integrierten *ermAM*-Kassette. Graue Pfeile und Blöcke: Flankierende Gene und Elemente des TCS11-Clusters in P406 (vergleiche Abbildung 4.20).

4.7.2 Charakterisierung der Deletionsmutante P406 Δ *kin11reg11*

Wachstum und Zellmorphologie

Die wie unter 4.7.1 beschrieben hergestellte Deletionsmutante P406 Δ *kin11reg11* zeigte bei ihrer phänotypischen Charakterisierung im Vergleich zu P406 (4.1) weder einen Unterschied in ihrem Wachstumsverhalten und der Zellmorphologie, noch zeigten sich Unterschiede in der Ausprägung der genetischen Kompetenz.

MHK von Piperacillin in P406 Δ kin11reg11

Zur Überprüfung der Beteiligung des Zweikomponentensystems 11 an der erhöhten MHK für Piperacillin in Mutante P406, wurde die MHK für Piperacillin der Deletionsmutante P406 Δ kin11reg11 im direkten Vergleich zu P306 und P406 wie unter 3.1.5 beschrieben bestimmt. In Tabelle 4.7 wurden die ermittelten MHK-Werte für Piperacillin zusammengestellt. Die Deletion von *kin11* und *reg11* in P406 bewirkte einen Abfall der MHK für Piperacillin in P406 Δ kin11reg11 von 0,19 μ g/ml auf 0,18 μ g/ml, was dem Niveau des Parentalstammes P306 entsprach (4.1.3). Das Zweikomponentensystem 11 in *Streptococcus pneumoniae* war somit ein Teil eines bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntem Resistenzmechanismus gegen das lytische β -Lactam Piperacillin.

Tabelle 4.7: MHK für Piperacillin von P406 Δ kin11reg11 im Vergleich zu P306 und P406

| Stamm | MHK für Piperacillin [μ g/ml] |
|--------------------------|------------------------------------|
| P306 | 0,18 |
| P406 | 0,19 |
| P406 Δ kin11reg11 | 0,18 |

Da es sich bei den MHK-Werten für Piperacillin von P306, P406 und P406 Δ kin11reg11 um vergleichsweise geringe Unterschiede handelte, war von Interesse, ob sich diese MHK-Differenz auch unter anderen physiologischen Bedingungen, wie beispielsweise in einer Flüssigkultur manifestierte. Hierzu wurden Kulturen von P406 und P406 Δ kin11reg11 flüssig in CpH8-Medium angezogen, bei einer Zelldichte von $N=30$ mit Piperacillin zu steigenden Endkonzentrationen versetzt und das Wachstum beider Stämme im direkten Vergleich verfolgt. In Abbildung 4.24 wurde das Wachstumsverhalten von P406 und P406 Δ kin11reg11 bei verschiedenen Piperacillin-Konzentrationen dargestellt.

Wie aus Abbildung 4.24 zu ersehen, war der Effekt der *kin11reg11*-Deletion in P406 Δ kin11reg11 in Flüssigkultur deutlicher erkennbar als bei der MHK-Bestimmung auf D-Blutagarplatten (Tabelle 4.7). Während die MHK von P406 Δ kin11reg11 lediglich um 0,01 μ g/ml auf das Niveau von P306 erniedrigt wurde, zeigte sich bei der Flüssigkultur in CpH8-Medium, daß die Mutante P406 auch bei einer Piperacillin-Konzentration, welche um 0,04 μ g/ml höher war als die Konzentration, bei der P406 Δ kin11reg11 bereits lysierte, noch ohne zu lysieren zu wachsen vermochte. Beide Stämme tolerierten eine Piperacillin-Konzentration von 0,1 μ g/ml ohne nennenswerte Effekte auf ihr Wachstumsverhalten. Ab einer Piperacillin-Konzentration von 0,12 μ g/ml lysierte P406 Δ kin11reg11 ca. 25-40 min nach Zugabe des Antibiotikums (Pfeile in Abbildung 4.24), wohingegen P406 bei allen eingesetzten Konzentration ohne zu lysieren zu wachsen vermochte. Demzufolge rückte das Zweikomponentensystem 11 in *Streptococcus pneumoniae*, kodiert durch *kin11* und *reg11* als Teil eines neuen Mechanismus, welcher an der erhöhten Piperacillin-Resistenz in P406 beteiligt war, in den Mittelpunkt der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit (4.8, 4.9, 4.10).

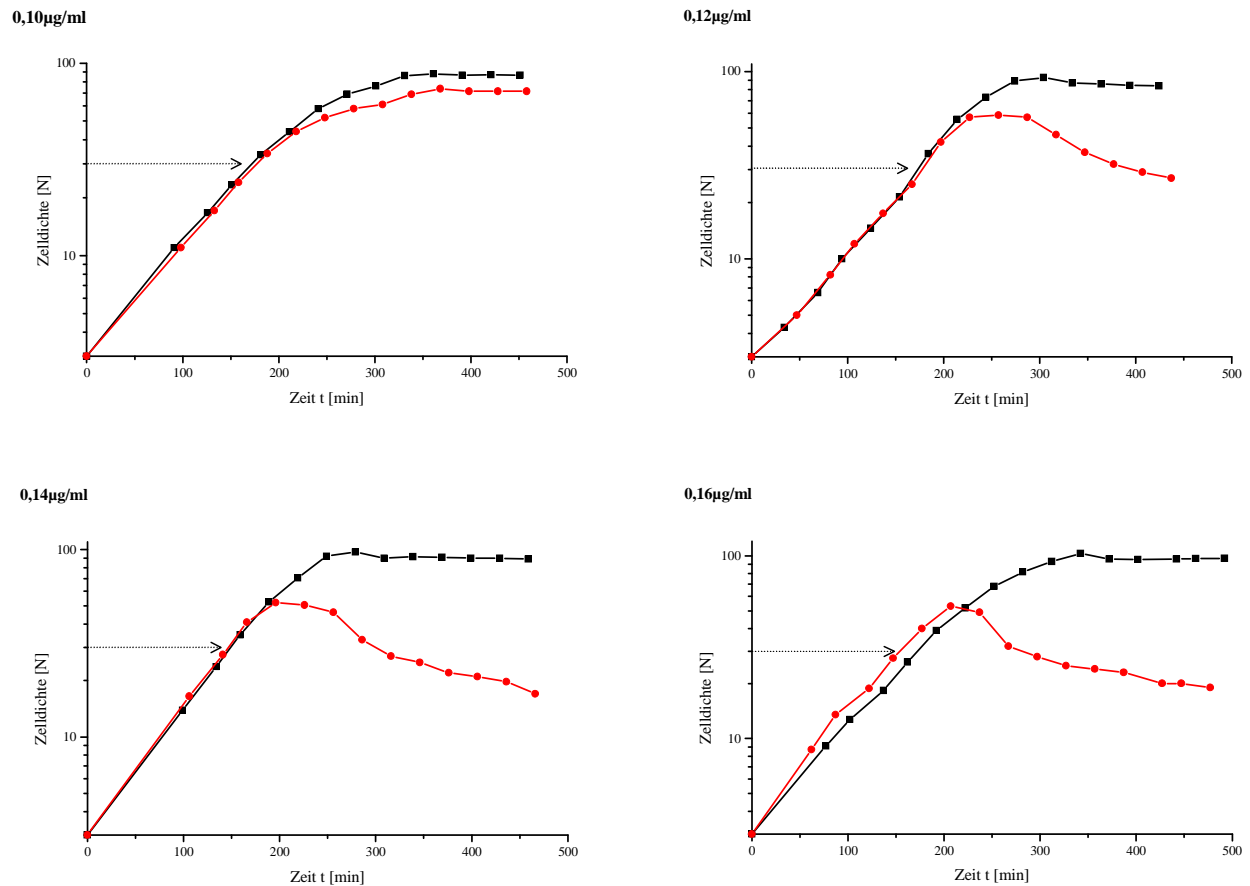


Abbildung 4.24: Wachstumsverhalten von P406 und P406 Δ kin11reg11 bei verschiedenen Piperacillin-Konzentrationen. Dargestellt wurde das Wachstumsverhalten von P406 und P406 Δ kin11reg11 bei Piperacillin-Konzentrationen von 0,1 μ g/ml, 0,12 μ g/ml, 0,14 μ g/ml und 0,16 μ g/ml in C_pH₈-Medium. Die Zugabe von Piperacillin erfolgte bei Erreichen einer Zelldichte von N=30 (Pfeile). Aufgetragen wurde die Zelldichte in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min], wobei die Wachstumskurven der einzelnen Stämme auf eine Zelldichte von N=3 bei t=0 normalisiert wurden. ■ P406; ● P406 Δ kin11reg11

4.8 Vergleich der im Verhältnis zu R6 veränderten Transkriptmengen in P406 Δ kin11reg11 und P406

Durch die Herstellung der Deletionsmutante P406 Δ kin11reg11 konnte die Beteiligung des Zweikomponentensystems 11 an der Resistenzerhöhung in Mutante P406 nachgewiesen werden (4.7). Da es sich bei dem durch *kin11* und *reg11* kodierten Zweikomponentensystem 11 um ein die Transkription verschiedener Gene beeinflussendes regulatorisches System handelte, war nicht anzunehmen, daß Kin11 und Reg11 direkt an der Resistenzerhöhung beteiligt waren. Vielmehr war davon auszugehen, daß durch die erhöhten Transkriptmengen der Gene des Zweikomponentensystems, welche vermutlich durch die in 4.6 beschriebenen genomischen Veränderungen hervorgerufen wurden, es zu einer veränderten Transkription der durch das Zweikomponentensystem 11 regulierten Gene und dadurch zur Erhöhung der Resistenz in P406 gekommen war. Um nun in einem ersten Ansatz solche Gene zu identifizieren, welche durch das Zweikomponentensystem 11 reguliert wurden, wurde eine globale Transkriptomanalyse von P406 Δ kin11reg11 im Vergleich zum Stamm R6 durchgeführt. Durch einen Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen der globalen Transkriptomanalyse von Mutante P406 (4.2) sollte es möglich sein, solche Kandidatengene, welche eventuell unter der Kontrolle des Zweikomponentensystems 11

standen, über ihre veränderten Transkriptmengen zu identifizieren. Zur Transkriptomanalyse wurde wie unter 3.16 beschrieben, Gesamt-RNA aus exponentiell wachsenden Kulturen in CpH8-Medium von R6 und P406 Δ *kin11reg11* bei einer Zelldichte von N=40 isoliert. Die Durchführung der Transkriptomanalyse erfolgte unter Verwendung des MWG Oligo-Sets (3.16). Eine komplette Aufstellung der Gene, welche in P406 Δ *kin11reg11* eine signifikant veränderte Transkriptmenge im Vergleich zu R6 zeigten, ist im Anhang unter Punkt 7.8 (Tabelle 7.7) zu finden. In den Mutanten der Familie P006 und somit auch in Mutante P406 führten einige bereits beschriebene Mutationen (1.6) zu erheblichen Effekten im Transkriptom (4.2). Somit war davon auszugehen, daß bei dem Vergleich der Transkriptomane von P406 und P406 Δ *kin11reg11* eine Vielzahl von differentiell transkribierten Genen auftauchen könnten, welche zwar unterschiedliche Transkriptmengen in P406 und P406 Δ *kin11reg11* aufwiesen, jedoch nicht durch das Zweikomponentensystem 11 direkt reguliert wurden und deren veränderte Transkriptmengen eher auf Sekundäreffekten beruhten. In einem Versuch, solche Gene herauszufiltern, welche unter der Regulation des Zweikomponentensystems 11 standen, wurden bei dem Vergleich der Transkriptomanalysen von P406 und P406 Δ *kin11reg11* zunächst nur solche Gene berücksichtigt, welche im direkten Vergleich beider Stämme eine Fold Difference von mindestens +/- 3 aufwiesen, also eine offensichtliche, erhebliche Induktion oder Repression zeigten. In Abbildung 4.25 wurden die Transkriptmengenverhältnisse P406/R6 und P406 Δ *kin11reg11*/R6 der so ermittelten Gene als Fold Differences zu R6 in beiden Stämmen zusammengestellt. Die Gene wurden hierbei nicht in der Reihenfolge ihrer Abfolge im Genom, sondern nach der Zugehörigkeit zu bereits beschriebenen oder putativen Clustern und Operons geordnet.

Wie in Abbildung 4.25 dargestellt, handelt es sich bei den unter dem Anlegen der oben beschriebenen Filterkriterien identifizierten Genen mit veränderten Transkriptmengen in P406 und P406 Δ *kin11reg11* um Gene des Kompetenzregulons (*com*), *blp*-Clusters, des *lic1*-Operons, des *cyl*-Clusters und des TCS11-Clusters. Die noch uncharakterisierten Cluster *spr0096-spr0109*, sowie *spr0276-spr0282* zeigten ebenfalls eine erhebliche Änderung ihrer Transkriptmenge. Alle Cluster in Abbildung 4.25 mit Ausnahme des *lic1*-Operons und des TCS11-Clusters zeigten bereits in den 3 Parentalstämmen P106, P206 und P306 von Mutante P406 veränderte Transkriptmengen im Vergleich zu Stamm R6 (4.2). Die nun unterschiedlichen Transkriptmengen im direkten Vergleich zwischen P406 und P406 Δ *kin11reg11* könnten sowohl auf eine direkte Regulation durch das Zweikomponentensystem 11, als auch auf Sekundäreffekte hinweisen. Das *lic1*-Operon hingegen zeichnete sich erstmalig in Mutante P406 durch erhöhte Transkriptmengen im Vergleich zu R6 aus. Dieser Effekt konnte durch die Deletion des Zweikomponentensystems 11 in Mutante P406 wieder rückgängig gemacht werden. Für das *lic1*-Operon bestand somit die Möglichkeit einer direkten oder indirekten Regulation durch das Zweikomponentensystem 11. Im Fall der im TCS11-Cluster organisierten Gene konnte diese Schlußfolgerung nicht ohne Weiteres gezogen werden, da deren in Mutante P406 beobachtete erhöhte Transkriptmenge womöglich Folge der in 4.6 beschriebenen, genomischen Veränderung upstream des TCS11-Clusters war. Die direkte Nachbarschaft der Gene des Zweikomponentensystems 11 zu den Genen für einen putativen, upstream liegenden ABC-Transporter (*nbp11* und *msp11*; Abbildung 4.8 unter 4.2.7) konnte jedoch als Hinweis für eine eventuelle funktionelle Kopplung wie im Falle des Zweikomponentensystems BceRS (Ohki et al., 2003) gedeutet werden.

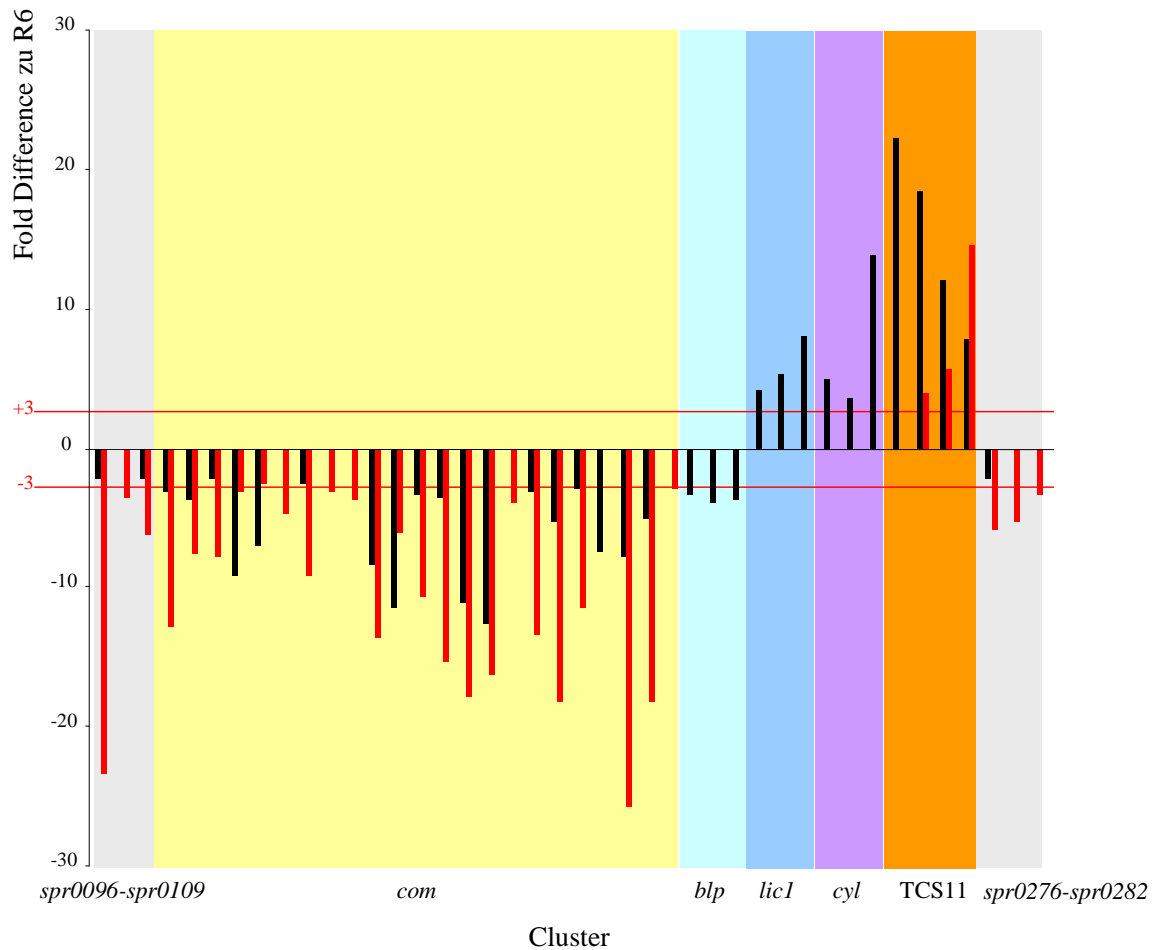


Abbildung 4.25: Vergleich der Transkriptmengen ausgewählter Gene in P406 und P406 Δ kin11reg11. Dargestellt wurde die Fold Difference zu R6 der Transkriptmengen ausgewählter Gene in P406 und P406 Δ kin11reg11. Y-Achse: Fold Difference zu R6; x-Achse: Gen-Cluster; schwarze Säulen: Fold Difference ausgewählter Gene in P406; rote Säulen: Fold Difference ausgewählter Gene in P406 Δ kin11reg11. *com*: Gene des Kompetenzregulons; *blp*: Gene des *blp*-Clusters; *lic1*: Gene des *lic1*-Operons; *cyl*: Gene des *cyl*-Clusters; TCS11: Gene des TCS11-Clusters. Grau hinterlegt wurden Gene putativer, funktionell zusammenhängender Cluster (*spr0096-spr0109*; *spr0276-spr0282*).

Durch die Inaktivierung der ATPase-Funktion des putativen ABC-Transporters, kodiert durch das *nbp11*-Gen im TCS11-Cluster (4.8) sollte zunächst die Beteiligung des ABC-Transporters an der Resistenzerhöhung in Mutante P406 überprüft werden (4.9). Ein vergleichbares Absinken der Resistenz in der herzustellenden Deletionsmutante P406 Δ *nbp11*, wie schon im Fall der Deletionsmutante P406 Δ *kin11reg11* (4.7) wäre ein klarer Hinweis auf eine Regulation durch das Zweikomponentensystem 11, sowie auf die direkte Beteiligung des putativen ABC-Transporters an der erhöhten Resistenz gegen Piperacillin in Mutante P406.

4.9 Beitrag der Gene des putativen ABC-Transporters im TCS11-Cluster zur Piperacillin-Resistenz in P406

Zur Überprüfung der Beteiligung des putativen ABC-Transporters Nbp11/Msp11 des TCS11-Clusters an der erhöhten Piperacillin-Resistenz in Mutante P406 wurde das für eine ATPase kodierende Gen *nbp11* unter Verwendung der Janus-Kassette (3.11) in Mutante P406 deletiert.

4.9.1 Deletion des ATPase-Gens *nbp11* im TCS11-Cluster von P406

Die Deletion von *nbp11* sollte wie in 3.11 beschrieben durch die Herstellung eines Minigens von *nbp11* unter der Verwendung der Janus-Kassette durchgeführt werden. Das Minigen beinhaltete lediglich die ersten 21 Kodons und die 35 letzten Kodons des *nbp11*-Genes als In-frame-Fusion. Als Ausgangsstamm diente hierzu das Streptomycin-resistente P406*rpsL*-Derivat (3.11.1) von Mutante P406. Zur Deletion wurde ein zur Integration der Janus-Kassette in *nbp11* benötigtes Konstrukt 1 und ein zur Einbringung der In-frame Deletion und Excision der Janus-Kassette benötigtes Konstrukt 2 hergestellt (3.11.3). Zur Herstellung von Konstrukt 1 wurden unter Verwendung der Primerpaare L18xx_for und d1817Lrev, sowie d1817Rfor und dTC11_rev die den zu deletierenden Bereich flankierenden Sequenzen mittels PCR aus genomischer DNA der Mutante P406 amplifiziert. Zur Herstellung des Konstruktes 2 wurden die gleichen Abschnitte amplifiziert, wobei für den downstream liegenden Bereich das Primerpaar d18172Rfor und dTC11_rev verwendet wurde.

Die erste Transformation von P406*rpsL* mit Konstrukt 1 zur Integration der Janus-Kassette in *nbp11* lieferte eine Transformationseffizienz von 0,18 % der Lebendkeimzahl, was unter diesen Bedingungen für P406 den erreichbaren Werten entsprach (vgl. Abbildung 4.2 unter 4.1.2). Die zweite Transformation unter Verwendung des Konstruktes 2 zur Excision der Janus-Kassette und Einbringung des *nbp11*-Minigens lieferte jedoch auch nach mehrmaligen Versuchen keine Transformanten. In Stamm R6 hingegen war *nbp11* jedoch problemlos durch die gleiche Strategie zu deletieren (4.10.8.1). Versuche zur Deletion der weiteren Gene upstream der Gene des Zweikomponentensystems 11 im TCS11-Cluster in P406, wie der Gene *smp11A* und *smp11B* scheiterten bereits an der ersten Transformation zur Integration der Janus-Kassette. In Stamm R6 waren jedoch auch diese Deletionen problemlos durchzuführen (4.10.8.1). In P406 hingegen schien die Anwesenheit der Gene *smp11A*, und *smp11B* hingegen essentiell zu sein. Möglicherweise stand dies mit den durch die beschriebene Veränderung des Bereichs upstream des TCS11-Clusters in P406 erhöhten Transkriptmengen der Gene des Clusters in Verbindung. Eventuell konnte die Integration der Janus-Kassette in *nbp11* nur gelingen, weil dies einen Effekt auf die Expression des downstream liegenden Gens *kin11* zur Folge hatte. Zur Überprüfung der Beteiligung des putativen ABC-Transporters im TCS11-Cluster an der Piperacillin-Resistenz in P406 stand demnach nur eine durch Integration der Janus-Kassette in *nbp11* hergestellte Inaktivierung der ATPase Nbp11 in Form des resultierenden Stammes P406 Δ *nbp11*::*janus* zur Verfügung (Abbildung 4.26).

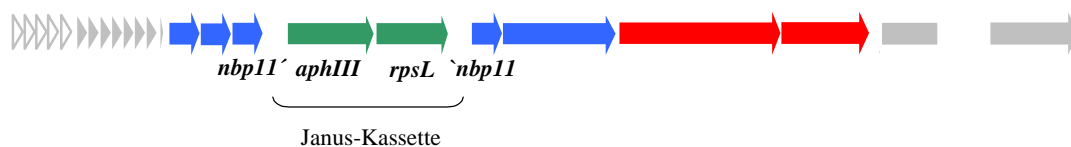


Abbildung 4.26: Schematische Darstellung des TCS11-Clusters in P406 Δ *nbp11*::*janus*. Gene des TCS11-Clusters wurden als blaue und rote Pfeile dargestellt. *nbp11'*: Verbleibender Rest des 5'-Endes des *nbp11*-Genes; *nbp11*: Verbleibender Rest des 3'-Endes des *nbp11*-Genes; grüne Pfeile: Lage der auf der integrierten Janus-Kassette kodierten Gene *aphIII* und *rpsL* (3.11.3). Graue Pfeile und Blöcke: Flankierende Gene und Elemente des TCS11-Clusters in P406 (vergleiche Abbildung 4.20).

Die Integration der Janus-Kassette wurde unter Verwendung der Primer *janus_f* und *rr11_rev*, sowie *janus_r* und *L18xx_for* überprüft. Der so hergestellte Stamm *P406Δnbp11::janus* wurde phänotypisch auf Wachstumsverhalten und MHK für Piperacillin untersucht (4.9.2).

4.9.2 Charakterisierung der *nbp11*-Mutante *P406Δnbp11::janus*

MHK von Piperacillin in *P406Δnbp11::janus*

Zur Überprüfung der Beteiligung der putativen ATPase Nbp11 an der erhöhten MHK für Piperacillin in Mutante P406, wurde die MHK für Piperacillin der *nbp11*-Mutante *P406Δnbp11::janus* im direkten Vergleich zu P406 und *P406Δkin11reg11* wie unter 3.1.5 beschrieben bestimmt. In Tabelle 4.8 wurden die ermittelten MHK-Werte für Piperacillin zusammengestellt.

Tabelle 4.8: MHK für Piperacillin von *P406Δnbp11::janus* im Vergleich zu P406 und *P406Δkin11reg11*

| Stamm | MHK für Piperacillin [µg/ml] |
|--------------------------|------------------------------|
| P406 | 0,19 |
| <i>P406Δnbp11::janus</i> | 0,18 |
| <i>P406Δkin11reg11</i> | 0,18 |

Wie aus Tabelle 4.8 zu ersehen, fiel die Resistenz gegen Piperacillin in der *nbp11*-Mutante *P406Δnbp11::janus* im Vergleich zu P406, wie schon in der Deletionsmutante *P406Δkin11reg11* (4.7.2), von 0,19 auf 0,18 µg/ml. Nbp11 und somit der putative ABC-Transporter im TCS11-Cluster von P406 waren also, nach diesem Ergebnis zu urteilen, an der Resistenzhöhung in P406 beteiligt. Zudem konnte, zusammen mit dem unter 4.7 beschriebenen Effekt der *kin11reg11*-Deletion in P406, eine Regulation des putativen ABC-Transporters durch das Zweikomponentensystem 11 vermutet werden. Jedoch konnte ein Effekt der *janus*-Integration in *nbp11* auf die *kin11reg11*-Expression nicht ausgeschlossen werden. Die Beteiligung des ABC-Transporters an diesem Resistenzmechanismus gegen Piperacillin sollte im Rahmen der Charakterisierung des TCS11-Clusters im Wildtyp R6 verifiziert werden (4.10). Aufgrund des geringen Resistenzunterschiedes wurde analog zur Deletion der *kin11*- und *reg11*-Gene in P406 (4.7), das Wachstumsverhalten von *P406Δnbp11::janus* mit und ohne Piperacillin in CpH8-Medium überprüft. Hierzu wurden Kulturen von P406, *P406Δkin11reg11* und *P406Δnbp11::janus* flüssig in CpH8-Medium angezogen, bei einer Zelldichte von $N=30$ mit Piperacillin zu einer Endkonzentration von 0,16 µg/ml versetzt und das Wachstum der drei Stämme im direkten Vergleich zum Wachstum ohne Piperacillin verfolgt. Abbildung 4.27 zeigt die so aufgezeichneten Wachstumskurven.

Wie in Abbildung 4.27 zu ersehen, lysierte *P406Δnbp11::janus*, wie bereits *P406Δkin11reg11* im Gegensatz zu P406 nach Zugabe von Piperacillin zu einer Endkonzentration von 0,16 µg/ml (Pfeile in Abbildung 4.27) und bestätigte das durch die Bestimmung der MHK erhaltene Ergebnis.

Da somit durch die Herstellung der Deletionsmutante *P406Δkin11reg11* und der *nbp11*-Mutante *P406Δnbp11::janus* gezeigt werden konnte, daß das TCS11-Cluster an der erhöhten Piperacillin-Resistenz in P406 beteiligt war, sollte das TCS11-Cluster in der vorliegenden Arbeit näher molekulargenetisch charakterisiert werden (4.10).

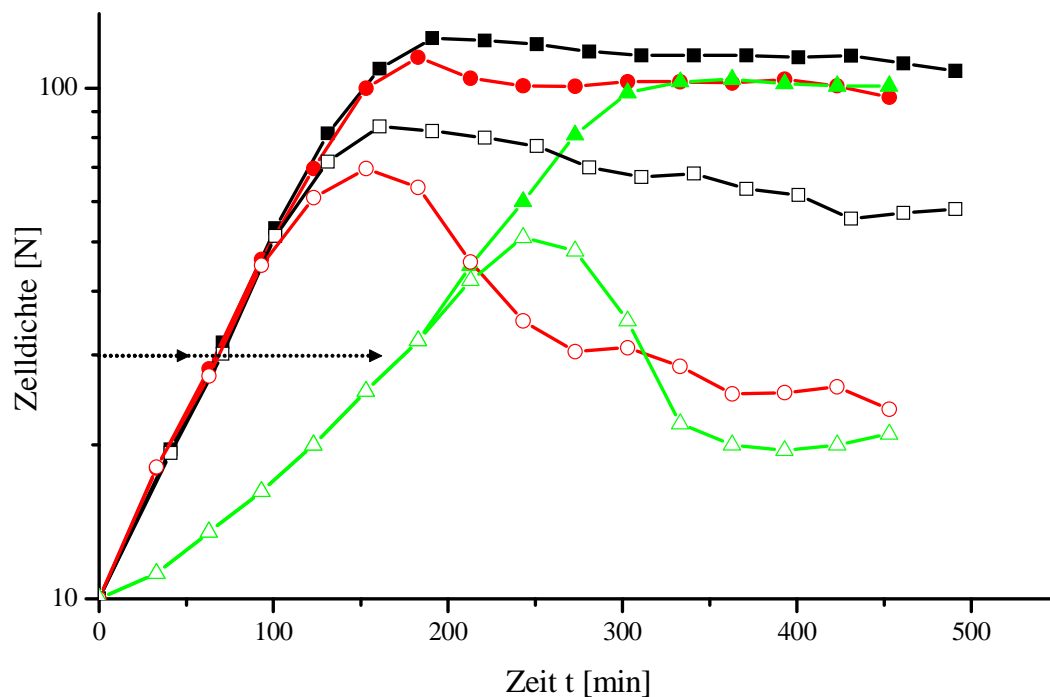


Abbildung 4.27: Wachstumsverhalten von *P406Δnbp11::janus* im Vergleich zu *P406* und *P406Δkin11reg11* ohne Piperacillin und in Anwesenheit von 0,16 $\mu\text{g/ml}$ Piperacillin. Dargestellt wurde das Wachstumsverhalten von *P406Δnbp11::janus*, *P406* und *P406Δkin11reg11* in CpH8-Medium ohne und mit 0,16 $\mu\text{g/ml}$ Piperacillin. Die Zugabe von Piperacillin erfolgte bei Erreichen einer Zelldichte von $N=30$ (Pfeile). Aufgetragen wurde die Zelldichte in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min], wobei die Wachstumskurven der einzelnen Stämme auf eine Zelldichte von $N=10$ bei $t=0$ normalisiert wurden. ■ *P406*; ● *P406Δkin11reg11*; ▲ *P406Δnbp11::janus*; □ *P406* bei 0,16 $\mu\text{g/ml}$ Piperacillin; ○ *P406Δkin11reg11* bei 0,16 $\mu\text{g/ml}$ Piperacillin; △ *P406Δnbp11::janus* bei 0,16 $\mu\text{g/ml}$ Piperacillin.

4.10 Charakterisierung des TCS11-Clusters von *Streptococcus pneumoniae* R6

4.10.1 Genetische Organisation des TCS11-Clusters und Homologe in Gram-positiven Bakterien

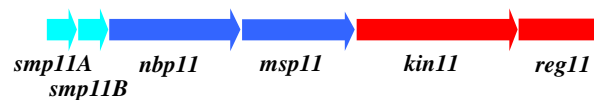
Die in den Abschnitten 4.7, 4.8 und 4.9 beobachteten Effekte der Deletionen der Gene des Zweikomponentensystems 11 (Kin11/Reg11) und der ATPase Nbp11 zeigten die Beteiligung des TCS11-Clusters an einem unbekanntem Mechanismus der Piperacillin-Resistenz. Zudem führte die genetische Organisation des Clusters zu der Vermutung, daß das TCS11-Cluster, ähnlich wie im Fall des Zweikomponentensystems BceRS und des ABC-Transporters BceAB (Ohki et al., 2003), durch das in ihm kodierte Zweikomponentensystem reguliert werden könnte. Die durch die im TCS11-Cluster kodierten Proteine vermittelten Funktionen und deren Regulation wurden deshalb im Folgenden näher charakterisiert. Um zunächst einen Überblick über die Organisation des TCS11-Clusters und die Verbreitung des TCS11-Clusters in anderen Gram-positiven Bakterien zu erhalten, wurden zusätzlich zu den bereits unter 4.2.7 aufgeführten Details zu Struktur- und Domänenorganisation der Proteine des TCS11-Clusters weitere Homologie- und Organisationsvergleiche durchgeführt.

Genetische Organisation des TCS11-Clusters

Die genetische Organisation des Clusters in *Streptococcus pneumoniae* R6 ähnelt einer Gruppe funktionell gekoppelter Zweikomponentensystem-ABC-Transporter-Systeme,

repräsentiert durch das Zweikomponentensystem BceRS und des durch ihn regulierten ABC-Transporters BceAB in *Bacillus subtilis* (Abbildung 4.28; Ohki et al., 2003; Mascher, 2006c; Mascher et al., 2006b) mit dem Unterschied, daß hier im Gegensatz zum TCS11-Cluster die ABC-Transporter-Gene meist downstream der Gene des Zweikomponentensystems lokalisiert sind.

TCS11



BceABRS

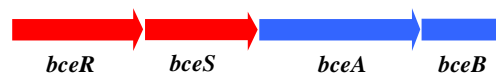


Abbildung 4.28: Organisation des TCS11-Clusters und des BceABRS-Systems. Dargestellt wurde die Anordnung der Gene in beiden Systemen. Blaue Pfeile: Durch *nbp11/msp11* kodierter, putativer ABC-Transporter und durch *bceAB* kodierter ABC-Transporter; rote Pfeile: Gene der Zweikomponentensysteme Kin11/Reg11 und BceRS; hellblaue Pfeile: Gene der putativen Membranproteine Smp11A und Smp11B.

BceAB gehört zu einer Gruppe von ABC-Transportern in Gram-positiven Bakterien, deren Gene sich durch die direkte Nachbarschaft und Regulation durch meist upstream kodierte regulatorische Zweikomponentensysteme auszeichnen (Abbildung 4.28), wobei die zugehörigen Histidin-Kinasen alle der HPK3i-Gruppe (Grebe & Stock, 1999) angehören und die ABC-Transporter aus separat kodierten ATPase- und Permease-Komponenten bestehen (Mascher, 2006b; Mascher et al., 2006c). Von den Transportern dieser Gruppe wurde trotz der eher für eine Import-Funktion sprechenden getrennt kodierten ATPase- und Permease-Komponente (Locher, 2004) angenommen, daß es sich um Exporter handelt, da in keinem Fall ein Substratbindeprotein zugeordnet werden konnte (Quentin & Fichant, 2000). Die beschriebenen Zweikomponentensystem-ABC-Transporter-Systeme der BceABRS-Gruppe stellen effektive Detoxifikationsmechanismen gegen schädliche Substanzen wie z.B. Bacitracin im Fall von BceABRS dar (Mascher et al., 2006c und Referenzen). Im Fall des putativen ABC-Transporters Nbp11/Msp11 des TCS11-Clusters aus *Streptococcus pneumoniae* R6 (Abbildung 4.28) könnte es sich ebenfalls um einen solchen Transporter ohne erkennbares Substratbindeprotein handeln. Von den putativen Membranproteinen Smp11A und Smp11B war aufgrund keines bekannten Substratbindeproteins mit vergleichbar geringer Größe (4.2.7), eine Funktion als Solche fraglich.

Die durch *kin11* kodierte Histidin-Kinase Kin11 des TCS11-Clusters konnte im Gegensatz zu BceS durch Sequenzanalysen der HPK7-Gruppe der Histidin-Kinasen (4.2.7; Grebe & Stock, 1999) zugeordnet werden, zählt jedoch gleichzeitig wie BceS zur Gruppe der intramembranperzipierenden Histidin-Kinasen (4.2.7; Mascher et al., 2006c). Der putative Transporter Nbp11/Msp11 konnte durch zusätzliche Blast-Analysen (www.abcd-biotoul.fr) den Unterfamilien N_7a (für Nbp11) und M_7c (für Msp11) der von Quentin & Fichant (2000) erstellten Klassifizierung zugeordnet werden. Bei diesen Unterfamilien für ATPasen und Permeasen handelt es sich um Unterfamilien der zuvor genannten Exporter ohne

Substratbindeproteine wie im Fall von BceAB. Beschriebene Mitglieder der Unterfamilien N_7a und M_7c exportieren Lipooligosaccharide, Exotoxine, oder antimikrobiell aktive Substanzen wie Subtilin, Nisin oder Daunorubicin. Unter den beschriebenen Transportern dieser Gruppe besitzt der Nbp11/Msp11-Transporter die höchste Homologie zu NodIJ aus *Mesorhizobium loti* und DrrAB aus *Pyrococcus furiosus*. NodIJ ist am Export von Lipochitooligosacchariden (Cárdenas et al., 1996) und DrrAB am Export des Anthracyclins Daunorubicin beteiligt (Guilfoile & Hutchinson, 1991). Im TCS11-Cluster könnte ein durch das Zweikomponentensystem 11 regulierter, putativer Nbp11/Msp11-Transporter vergleichbare Funktionen wahrnehmen und unter Umständen strukturell ähnliche Substrate transportieren.

Homologe Cluster in Gram-positiven Bakterien

Durch Blast-Analysen unter Verwendung der einzelnen im TCS11-Cluster kodierten Proteine (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) wurden genetisch vergleichbar angeordnete, in publizierten Genomen anderer Gram-positiver Bakterien kodierte Homologe identifiziert. Abbildung 4.29 zeigt eine Übersicht der so gefundenen Cluster. Das TCS11-Cluster konnte in vergleichbarer Form sowohl in Gram-Positiven mit niedrigem GC-Gehalt, als auch in Gram-Positiven mit hohem GC-Gehalt gefunden werden. Alle Histidin-Kinasen konnten durch Sequenzanalysen der HPK7-Gruppe, die ATPase- und Permease-Proteine den Gruppen N_7a und M_7c zugeordnet werden. Auffallend war das seltene Vorkommen von Proteinen, ähnlich den Smp11A- und Smp11B-Proteinen in Stamm R6 (hellblaue Pfeile in Abbildung 4.29). Diese konnten lediglich in den drei eng verwandten Pneumokokken-Stämmen R6, D39 und TIGR4 (³ in Abbildung 4.29), sowie in *S. thermophilus* und *S. mutans* identifiziert werden, stellen also eine Besonderheit dieser Stämme dar. In *S. mutans* und *D. geothermalis* kodierte das entsprechende Cluster zudem je ein weiteres, in R6 nicht vorhandenes, hypothetisches Protein (graue Pfeile in Abbildung 4.29). Keinem der entsprechenden Cluster konnte bislang eine Funktion zugesprochen werden.

In *B. subtilis* konnte durch eine Überexpression des Response-Regulators YvfU in einer Histidin-Kinase-Deletionsmutante ($\Delta yvfT$) eine Induktion der für den YvfRS-Transporter kodierenden Gene und des Gens einer Fettsäure-Desaturase (*des*) erreicht werden (Kobayashi et al., 2001). Dies war ein Hinweis für eine Regulation des YvfRS-Transporters durch das Zweikomponentensystem YvfTU. Ähnliches lies sich aufgrund der Homologie der Proteine Nbp11, Msp11, Kin11 und Reg11 zu YvfRSTU, sowie aufgrund ihrer identischen, genetischen Organisation vermuten. Bei dem TCS11-Cluster aus *Streptococcus pneumoniae* könnte es sich um eine in Gram-positiven Bakterien weit verbreitete, womöglich funktionell gekoppelte Zweikomponentensystem-ABC-Transporter-Einheit, ähnlich der Systeme der BceABRS-Gruppe handeln. Um festzustellen, inwiefern der an der Piperacillin-Resistenz in P406 beteiligte ABC-Transporter Nbp11/Msp11 unter der Regulation des Zweikomponentensystems 11 steht, war es zunächst notwendig, sowohl Transkriptionsstartpunkte und auch Transkripte des TCS11-Clusters zu bestimmen (4.10.2; 4.10.3; 4.10.4).

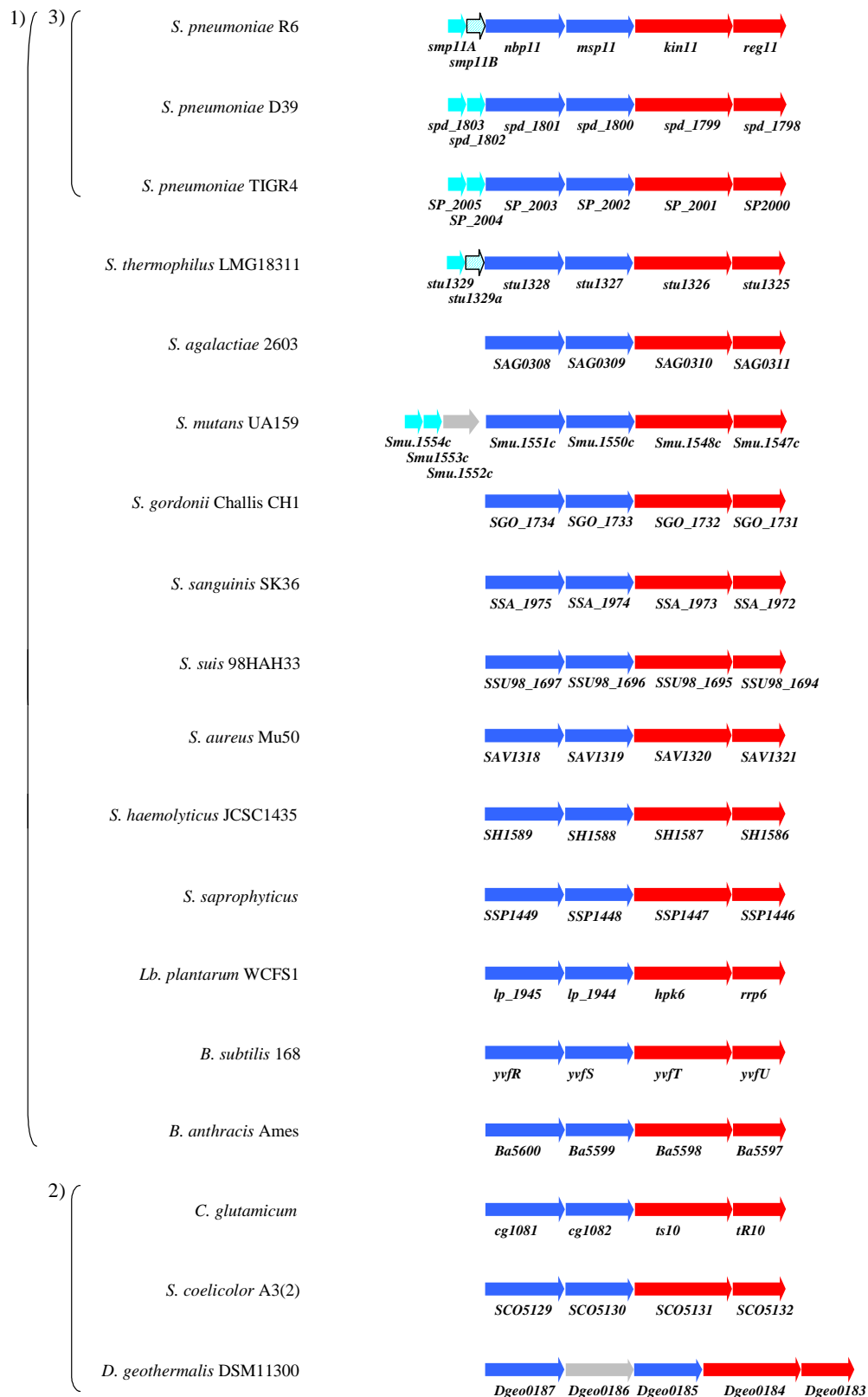


Abbildung 4.29: Gencluster von zu Nbp11, Msp11, Kin11 und Reg11 homologen Proteinen in Gram-positiven Bakterien. Blaue Pfeile: Zum putativen ABC-Transporter Nbp11/Msp11 homologe Proteine. Rote Pfeile: Zu Kin11 und Reg11 des Zweikomponentensystems 11 homologe Proteine. Hellblaue Pfeile: Zu Smp11A und Smp11B homologe Proteine. Graue Pfeile: In R6 nicht vorhandene Proteine. Schwarz umrandete, schraffierte Pfeile: Nicht annotierte, jedoch vorhandene Proteine. 1) Gram-Positive mit niedrigem GC-Gehalt; 2) Gram-Positive mit hohem GC-Gehalt; 3) eng verwandte Pneumokokken.

4.10.2 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte im TCS11-Cluster

Eine eventuelle Regulation des Nbp11/Msp11-Transporters durch das Zweikomponentensystem 11 sollte durch den Vergleich der Aktivitäten der Promotoren des TCS11-Clusters zwischen den *kin11reg11*-Deletionsmutanten P406 Δ *kin11reg11* (4.7) und R6 Δ *kin11reg11* und den jeweiligen Ausgangsstämmen P406 und R6 überprüft werden. Hierzu mussten jedoch zunächst die Transkriptionsstartpunkte im TCS11-Cluster bestimmt werden. Die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte wurde, wie in Abschnitt 3.12 beschrieben, mittels 5'-RACE-Analyse (Rapid Amplification of 5'-cDNA Ends) durchgeführt. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus einer in CpH8-Medium exponentiell wachsenden Kultur der Zelldichte N=40 von *Streptococcus pneumoniae* R6 isoliert. Zur Herstellung von cDNA wurden genspezifische Primer für *smp11A* (L18_revneu), *kin11* (LTC11_rev), *reg11* (rr11_rev) und für das downstream des TCS11-Clusters liegende *ccpA* (rr_r) in getrennten Ansätzen eingesetzt. Die Amplifikation des 5'-Bereichs der Transkripte mit der hergestellten cDNA als Template, wurde unter Verwendung der genspezifischen Primer 1818_rev, hk11_rev, rr11_rev2, cce_r sowie dem Primer RACE_PCR_5' durchgeführt. In Abbildung 4.30 wurden die hierdurch erhaltenen Fragmente nach Auftrennung durch eine Agarosegelelektrophorese in einem 1,5 % Gel (3.4) dargestellt. Für *reg11* konnte kein Fragment amplifiziert werden, was dafür sprach, daß *reg11* keinen eigenen Promotor besaß und *reg11* gemeinsam mit *kin11* transkribiert wurde. Für *smp11A* konnten zwei Fragmente im TAP-behandelten Ansatz beobachtet werden, was für das Vorhandensein von zwei verschiedenen Promotoren sprach (Pfeile in Abbildung 4.30). Für *kin11* und *ccpA* konnte jeweils eine Bande im TAP-behandelten Ansatz beobachtet werden. Durch die Sequenzierung der PCR-Produkte aus den mit TAP behandelten Ansätzen (3.12) unter Verwendung der zuvor zur Amplifikation eingesetzten Primern, konnten drei putative Transkriptionsstartpunkte im Bereich des TCS11-Clusters und ein Transkriptionsstartpunkt des downstream liegenden *ccpA* identifiziert werden (Abbildung 4.31 und 7.3-7.5 in Abschnitt 7.9). In Abbildung 4.31 wurde die Lage der putativen Promotoren in und um das TCS11-Cluster schematisch dargestellt. Als P_{11.1} und P_{11.3} wurden die beiden identifizierten putativen Transkriptionsstartpunkte des *smp11A*-Gens, als P_{11.2} der putative Transkriptionsstart vor *kin11reg11* bezeichnet. Als P_{ccpA} wurde der Transkriptionsstart des downstream des TCS11-Clusters liegenden *ccpA* benannt. Die genomische Sequenz um den Bereich der identifizierten, putativen Transkriptionsstartpunkte wurde in Abschnitt 7.9 in den Abbildungen 7.3-7.5 dargestellt. Die Aktivität der identifizierten, putativen Promotoren musste jedoch zunächst verifiziert werden (4.10.3). Sollte es sich bei den putativen Promotoren P_{11.1}, P_{11.2} und P_{11.3} tatsächlich um Transkriptionsstartpunkte der Gene des TCS11-Clusters handeln, so musste im Falle einer Regulation durch das Zweikomponentensystem 11 eine Änderung der Aktivität in den *kin11reg11*-Deletionsmutanten zu verzeichnen sein.

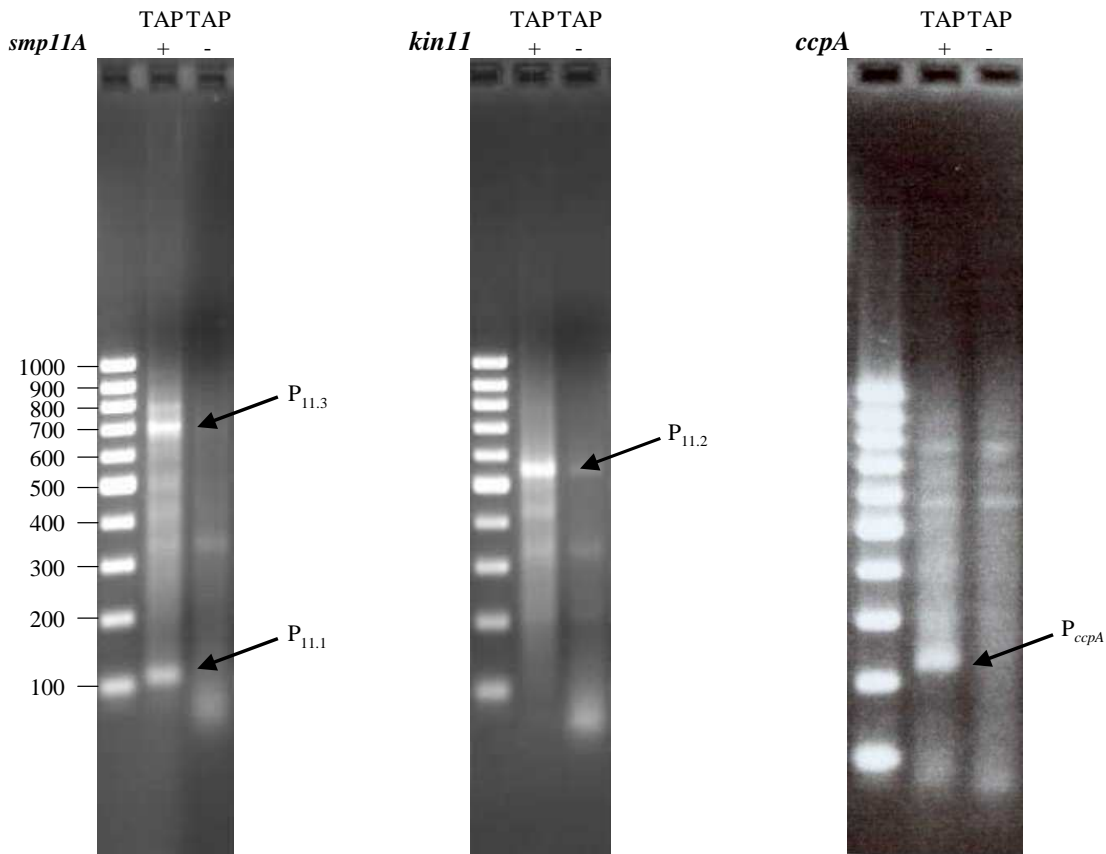


Abbildung 4.30: Ergebnis der 5'-RACE-Analyse zur Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten im TCS11-Cluster. Gezeigt wurden die in einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennte amplifizierte cDNA von möglichen 5'-Enden der Transkripte von *smp11A*, *kin11* und *ccpA* im TCS11-Cluster. *smp11A*: Ansatz mit *smp11A*-spezifischem Primer hergestellter Amplifikate; *kin11*: Ansatz mit *kin11*-spezifischem Primer hergestellter Amplifikate; *ccpA*: Ansatz mit *ccpA*-spezifischem Primer hergestellter Amplifikate; TAP+: Ansatz aus TAP-behandelter mRNA; TAP-: Ansatz aus TAP-unbehandelter mRNA. Mit schwarzen Pfeile markierte Banden aus den TAP-behandelten Ansätzen wurden zur Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte sequenziert. P_{11.1} und P_{11.3}: Putative Promotoren vor *smp11A*; P_{11.2}: putativer Promotor vor *kin11/reg11*; P_{ccpA}: putativer *ccpA*-Promotor; Belegung (von links nach rechts): 100bp ladder „gene ruler“, Fermentas; TAP+-Ansatz; TAP--Ansatz.

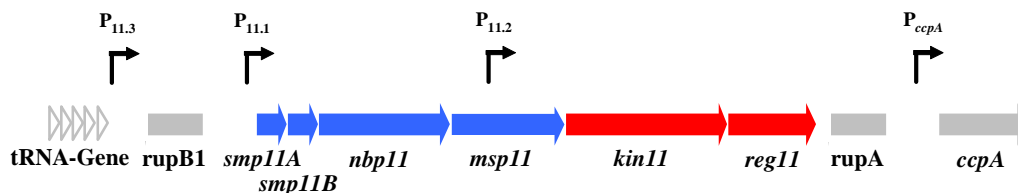


Abbildung 4.31: Lage der putativen Promotoren im Bereich des TCS11-Clusters. Promotoren wurden als geknickte Pfeile dargestellt. P_{11.1} und P_{11.3}: Putative Transkriptionsstartpunkte vor *smp11A*, *smp11B*, *nbp11*, *msp11*, *kin11* und *reg11* (blaue Pfeile). P_{11.2}: Putativer Transkriptionsstartpunkt vor *kin11* und *reg11* (rote Pfeile). P_{ccpA}: Putativer Transkriptionsstart vor *ccpA*.

Bei P_{11.1} und P_{11.3} handelte es sich vermutlich um putative Promotoren für die Gene *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11*. Da im Bereich von *msp11*, *kin11* und *reg11* keine eindeutige Terminatorstruktur erkennbar war, konnte jedoch eine Transkription von *kin11* und *reg11*,

ausgehend von P_{11.1} oder P_{11.3} nicht ausgeschlossen werden. Promotor P_{11.2} stellt vermutlich den Transkriptionsstartpunkt der Gene *kin11* und *reg11* dar. Dies sollte durch die Bestimmung der Transkriptlänge, ausgehend von Promotor P_{11.1} abgeklärt werden (4.10.4). Promotor P_{11.2} liegt mit 441bp ungewöhnlich weit upstream des Translationsstarts von *kin11*. Das resultierende Transkript besäße somit an seinem 5'-Ende eine lange, nicht translatierte Leadersequenz. Solche Leadersequenzen können eine Rolle bei der Translationsregulation oder der mRNA-Stabilität spielen. Das Vorhandensein eines eigenen Promotors von *ccpA* war ein Hinweis darauf, daß es sich bei *ccpA* nicht um ein Gen des TCS11-Clusters handelte. Die Bestimmung der Transkripte im Bereich des TCS11-Clusters sollte auch hierüber Klarheit verschaffen (4.10.4).

4.10.3 Aktivitäten der Promotoren P_{11.1}, P_{11.2} und P_{11.3} in P406, P406Δ*kin11reg11*, sowie in R6 und R6Δ*kin11reg11*

Zur Verifizierung der identifizierten, putativen Promotoren P_{11.1}, P_{11.2} und P_{11.3} des TCS11-Clusters aus R6, sollte deren Aktivität in wie unter 3.13 beschriebenen durchgeführten β-Galactosidase-Assays unter Verwendung der in das integrative Promotor-Probe-Plasmid pPP2 klonierten Promotorfragmente bestimmt werden. Die Aktivitäten der einzelnen Promotoren sollten hierbei zwischen Mutante P406 und der Deletionsmutante P406Δ*kin11reg11*, sowie zwischen Stamm R6 und der noch herzustellenden Deletionsmutante R6Δ*kin11reg11* verglichen werden. Hierdurch sollte eine eventuelle Regulation der Promotoren durch das Zweikomponentensystem 11 aufgedeckt werden.

Herstellung der Deletionsmutante R6Δ*kin11reg11*

Um die Aktivitäten der Promotoren des TCS11-Clusters in P406 und P406Δ*kin11reg11* mit den Aktivitäten in Stamm R6 und einer entsprechenden *kin11reg11*-Deletionsmutante in R6 vergleichen und somit eine Aussage über eine eventuelle Regulation im Wildtyp R6 treffen zu können, musste das Zweikomponentensystem 11 zunächst in Analogie zur Deletion in P406 im Wildtyp R6 deletiert werden. Die Deletion von *kin11* und *reg11* in R6 erfolgte wie in 3.11.3 beschrieben unter Verwendung der *ermAM*-Kassette. Eingesetzt wurden hierbei die gleichen Primer wie schon bei der Herstellung von P406Δ*kin11reg11* (4.7.1). In der resultierenden Mutante verblieben lediglich die ersten 48 N-terminalen Kodons von Kin11, sowie die letzten 33 C-terminalen Kodons von Reg11. Eine phänotypische Charakterisierung der *kin11reg11*-Deletionsmutante R6Δ*kin11reg11* wurde im Rahmen der Charakterisierung weiterer Deletionsmutanten durchgeführt (4.10.8).

Konstruktion der Promotor-*lacZ*-Fusionen in pPP2

Zur Herstellung der in den β-Galactosidase-Assays benötigten pPP2-Promotor-*lacZ*-Fusionen wurden die entsprechenden Promotor-Regionen zunächst unter der Verwendung der Primer P_{11.1}-f-Sph und P_{11.1}-r-Bam (für Promotor P_{11.1}), P_{11.2}-f-Sph und P_{11.2}-r-Bam (für Promotor P_{11.2}), sowie 18182_f und 18182_r (für Promotor P_{11.3}) in einer PCR (3.6) amplifiziert (die Sequenzen der amplifizierten Promotor-Regionen wurden unter 7.10 dargestellt). Die amplifizierten Promotor-Regionen wurden nach einer Restriktion mit *Bam*HI und *Sph*I mit gleichfalls *Bam*HI/*Sph*I-verdaulichem pPP2 ligiert und in *E. coli* DH5α transformiert. Die Selektion erfolgte auf 100μg/ml Ampicillin. Nach der Isolierung der Plasmide aus *E. coli* DH5α (3.2.3), dem Überprüfen der Inserts mittels PCR unter Verwendung der pPP2-spezifischen Primer 274_*lacZ* und *mcs_fwd_Kontr*, sowie anschließender Sequenzierung des so amplifizierten Inserts, wurden die hergestellten Plasmide pPP2 P_{11.1} und pPP2 P_{11.2} in P406, P406Δ*kin11reg11*, R6 und R6Δ*kin11reg11* und das Plasmid pPP2 P_{11.3} in R6 und R6Δ*kin11reg11* transformiert. Die Selektion erfolgte auf

3µg/ml Tetracyclin auf D-Blutagarplatten. Die Integration der Integrationskassetten aus den jeweiligen pPP2-Derivaten im Genom wurde unter Verwendung der Primer EII_fwd_Kontr und tetM_rev_Kontr mittels PCR überprüft. Die so hergestellten Promotor-Probe-Stämme P406P_{11.1}, P406P_{11.2}, P406Δ*kin11reg11*P_{11.1}, P406Δ*kin11reg11*P_{11.2}, R6P_{11.1}, R6P_{11.2}, R6P_{11.3}, R6Δ*kin11reg11*P_{11.1}, R6Δ*kin11reg11*P_{11.2}, und R6Δ*kin11reg11*P_{11.3}, wurden in den folgenden β-Galactosidase-Assays zur Bestimmung der Promotoraktivitäten eingesetzt.

Aktivitäten der Promotoren P_{11.1}, P_{11.2} und P_{11.3}

Die Durchführung der β-Galactosidase-Assays zur Überprüfung der Aktivitäten und einer eventuellen Regulation durch das Zweikomponentensystem 11 der Promotoren P_{11.1}, P_{11.2} und P_{11.3} wurde wie in 3.13.2 beschrieben durchgeführt. Die Kulturen wurden in CpH8-Medium bis zu einer Zelldichte von N=40 angezogen und je 2ml der Kulturen zur Bestimmung der Promotoraktivitäten gemäß 3.13.2 verwendet. In Abbildung 4.32A wurden die so bestimmten Aktivitäten der Promotoren P_{11.1}, P_{11.2} und P_{11.3} in den Stämmen P406, P406Δ*kin11reg11*, R6 und R6Δ*kin11reg11* graphisch dargestellt.

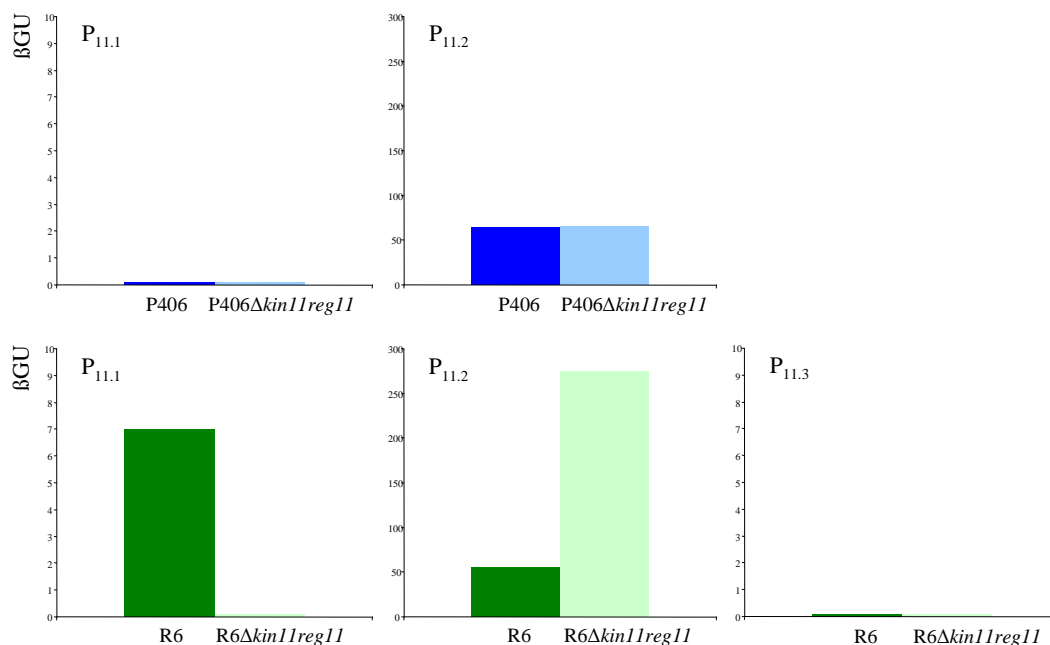


Abbildung 4.32A: Promotoraktivitäten der Promotoren P_{11.1}, P_{11.2} und P_{11.3} in P406, P406Δ*kin11reg11*, R6 und R6Δ*kin11reg11*. Dargestellt wurden die Aktivitäten der Promotoren P_{11.1}, P_{11.2} und P_{11.3} als β-Galactosidase-Units βGU [nmol freigesetztes ONP/(min*mg)] in den untersuchten Stämmen in CpH8-Medium bei einer Zelldichte von N=40.

Für den Promotor P_{11.1} konnte weder in Mutante P406, noch in P406Δ*kin11reg11* eine Aktivität gemessen werden. Dagegen zeigte P_{11.1} im Wildtyp R6 eine Aktivität von 7 Units im Vergleich zu einer Aktivität von 0 Units in der entsprechenden *kin11reg11*-Deletionsmutante R6Δ*kin11reg11*. Der Vergleich zwischen R6 und R6Δ*kin11reg11* zeigte die Notwendigkeit eines intakten Zweikomponentensystems 11 für die Transkription, ausgehend von Promotor P_{11.1}. In P406 wurde gezeigt, daß vermutlich aufgrund der charakterisierten genomischen Veränderung upstream des TCS11-Clusters eine erheblich größere Transkriptmenge der Gene des TCS11-Clusters vorhanden war (4.2; 4.6). P_{11.1} wies im Vergleich zu R6 in P406 keine Aktivität auf. Eine erhöhte Transkriptmenge der Gene des TCS11-Clusters schien folglich zum Verlust der Aktivität von P_{11.1} zu führen. Die Aktivitäten von P_{11.1} in den untersuchten

Stämmen deckten eine Regulation durch das Zweikomponentensystem 11 auf. Durch die Überexpression und Aufreinigung von Reg11 und anschließenden Interaktionsstudien mittels EMSA-Assays unter Verwendung des aufgereinigten Reg11, sowie der klonierten Promotor-Region von $P_{11.1}$ sollte geklärt werden, ob es sich bei der Regulation an $P_{11.1}$ um das Resultat einer direkten Interaktion von Reg11 und $P_{11.1}$ oder um einen indirekten Effekt handelte (4.10.5).

Promotor $P_{11.2}$ zeigte in P406, P406 Δ kin11reg11 und R6 eine vergleichbare Aktivität von 68, 72 bzw. 67 Units (Abbildung 4.32A). In R6 Δ kin11reg11 hingegen stieg die Aktivität von $P_{11.2}$ auf 274 Units. Dieser Effekt konnte entweder als Hinweis auf eine negative Regulation von $P_{11.2}$ durch das Zweikomponentensystem 11 oder aber auf eine positive Regulation durch einen weiteren unbekanntem Regulator infolge der ausbleibenden Transkription, ausgehend von $P_{11.1}$ gedeutet werden. Zur Abklärung dieses Sachverhaltes wurden hier ebenfalls Interaktionsstudien mit aufgereinigtem Reg11 und der klonierten Promotor-Region von $P_{11.2}$ durchgeführt (4.10.5).

Der putative Promotor $P_{11.3}$ zeigte weder eine Aktivität in R6, noch in R6 Δ kin11reg11 in CpH8-Medium bei einer Zelldichte von $N=40$, wodurch eine Funktion als Promotor in Frage gestellt wurde. Zusätzliche β -Galactosidase-Assays mit Promotor $P_{11.3}$ von der frühen exponentiellen- bis hin in die späte stationäre Phase zeigten in keinem Fall eine detektierbare Aktivität (nicht gezeigt). Es musste davon ausgegangen werden, daß $P_{11.3}$ zumindest unter den in der vorliegenden Arbeit herrschenden Wachstumsbedingungen keine Funktion als Promotor wahrnimmt.

Die Aktivitäten der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ wurden in weiteren β -Galactosidase-Assays von der frühen exponentiellen Phase bis in die stationäre Phase bestimmt. Hierdurch sollte überprüft werden, ob und inwiefern beide Promotoren in den verschiedenen Stadien der Wachstumskurve reguliert werden. So konnten eventuell auch erste Hinweise auf die Funktion des TCS11-Clusters gewonnen werden. In der Abbildung 4.32B wurden die wie zuvor bestimmten Promotor-Aktivitäten in CpH8-Medium von $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase von R6 graphisch dargestellt.

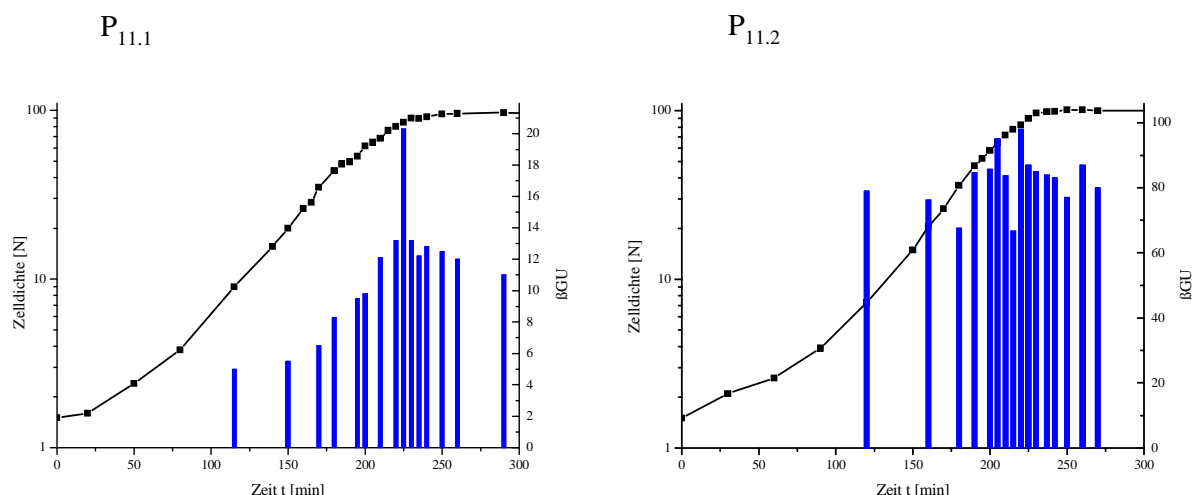


Abbildung 4.32B: Aktivitäten der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ in R6 in Abhängigkeit der Wachstumsphase. Dargestellt wurden die Aktivitäten der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ als β -Galactosidase-Units β GU [nmol freigesetztes ONP/(min*mg)] in R6 bei Wachstum in CpH8-Medium in Abhängigkeit der Zeit t [min], sowie die Zelldichte in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min]. ■ Zelldichte von R6 zur Zeit t ; Blaue Säulen: Promotor-Aktivität von $P_{11.1}$ oder $P_{11.2}$ zur Zeit t . Die Wachstumskurven und Promotor-Aktivitäten stellen Beispiele aus zwei durchgeführten Experimenten dar.

Anhand der Promotor-Aktivitäten in Abbildung 4.32B war zu ersehen, daß zumindest Promotor $P_{11.1}$ in Abhängigkeit der Wachstumsphase reguliert zu werden schien. Beginnend bei einer Zelldichte von $N=10$ mit einer Aktivität von 5 β GU steigerte sich die Aktivität von $P_{11.1}$ langsam im Verlauf der exponentiellen Phase auf 11 β GU. Am Übergang in die stationäre Wachstumsphase erfolgte eine Verdopplung der Aktivität auf 22 β GU. Diese Erhöhung zeigte sich jedoch nur über ein Zeitfenster von ca. 10min. Im Anschluß fiel die Aktivität direkt wieder auf die zuvor in der späten exponentiellen Phase erreichten Werte zwischen 10 und 12 β GU.

Bei Promotor $P_{11.2}$ konnte keine signifikante, wie im Fall von $P_{11.1}$ beobachtete Erhöhung der Aktivität am Übergang zur stationären Phase gemessen werden. $P_{11.2}$ zeigte über den kompletten gemessenen Bereich der Wachstumskurve eine schwankende Aktivität zwischen 98 und 67 β GU.

Für die physiologische Funktion des TCS11-Clusters könnte dies bedeuten, daß eine erhöhte Aktivität von $P_{11.1}$ und somit eine erhöhte Transkription der Gene des TCS11-Clusters bei solchen Bedingungen notwendig war, welche zur Einstellung des Wachstums führten. Solche Bedingungen könnten beispielsweise abnehmende Konzentrationen von Zuckern oder sonstigen Substraten, sowie die Anhäufung von Stoffwechselendprodukten, oder aber auch ein Quorum-Sensing-Mechanismus sein.

4.10.4 Bestimmung der Transkripte im TCS11-Cluster

Zur Detektion des im TCS11-Cluster, ausgehend von Promotor $P_{11.1}$ hergestellten Transkripts, wurde zunächst eine Northern-Analyse (3.15.2) mit isolierter Gesamt-RNA aus Stamm R6 unter Verwendung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden durchgeführt. Hierdurch sollte festgestellt werden, welche Gene des Clusters von Promotor $P_{11.1}$ aus transkribiert wurden. Zusammen mit den bei der Bestimmung der Promotoraktivitäten erlangten Resultaten (4.10.3) und der näheren Charakterisierung dieser Effekte durch die Interaktionsstudien der betreffenden Promotoren mit aufgereinigtem Reg11 (4.10.5), sollte somit eine klare Aussage darüber zu treffen sein, welche der Gene des TCS11-Clusters unter der Kontrolle des Zweikomponentensystems 11 standen.

Detektion des Transkripts von $P_{11.1}$ im TCS11-Cluster mittels Northern-Analyse

Zur Detektion des von $P_{11.1}$ ausgehenden Transkripts mittels Northern-Analyse wurde Gesamt-RNA einerseits aus einer exponentiell wachsenden Kultur von *Streptococcus pneumoniae* R6 bei einer Zelldichte von $N=40$ und andererseits aus einer frühstationären Kultur bei einer Zelldichte von $N=120$ laut 3.3 isoliert. Zum Ausschluß des Vorhandenseins von chromosomaler DNA wurde nach dem wie unter 3.3 beschriebenen DNaseI-Verdau mit den Primern 18506_for und 18506_rev eine PCR mit 10 μ g der isolierten Gesamt-RNA laut 3.6 durchgeführt. Dies entsprach dem 10-fachen Überschuß der zur Northern-Analyse eingesetzten RNA-Menge. Die Northern-Analyse wurde wie in 3.15.2 beschrieben durchgeführt. Zur Detektion des Transkriptes, ausgehend von $P_{11.1}$ wurde die Dig-markierte RNA-Sonde P1S verwendet. P1S war komplementär zu den ersten 47nt ab dem Transkriptionsstartpunkt von $P_{11.1}$ (Abbildung 4.33). Nach der Detektion mittels Chemolumineszenz (3.15.2) konnten auf dem Röntgenfilm die in Abbildung 4.34 dargestellten Signale beobachtet werden. Zur Berechnung der Bandengröße der detektierten Signale wurde zunächst eine Eichgerade erstellt. Hierbei wurden die dekadischen Logarithmen (\log_{10}) der Bandengrößen des Dig-markierten Größenstandards halblogarithmisch gegen deren Lauflänge im Gel aufgetragen. Nach der Bestimmung der Lauflänge der detektierten Signale konnte der zugehörige \log_{10} -Wert anhand der Eichgerade abgelesen und die Größe jedes Signals berechnet werden.

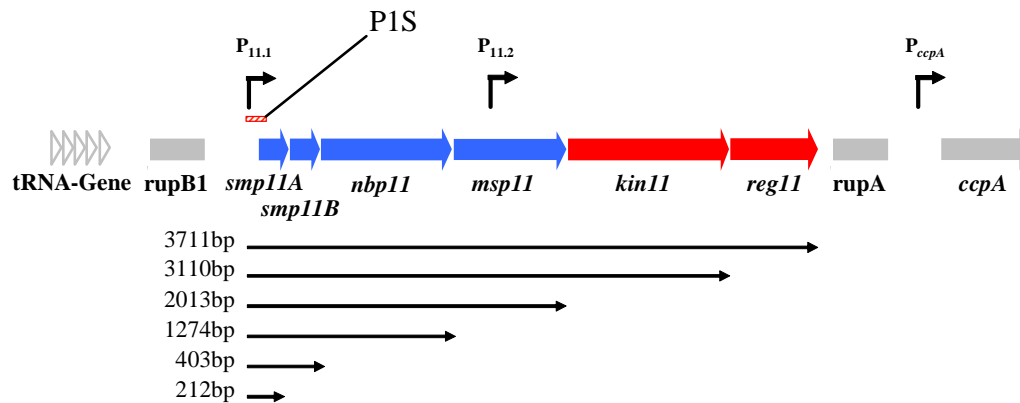


Abbildung 4.33: Position der zur Northern-Analyse des von $P_{11.1}$ ausgehenden Transkripts im TCS11-Cluster eingesetzten Sonde P1S. Graphisch dargestellt wurden die Gene des TCS11-Clusters (blaue und rote Pfeile), sowie die ihn flankierenden Gene und repetitiven Strukturen (graue Pfeile und Blöcke). Rote Pfeile: Gene des Zweikomponentensystems 11. Identifizierte Promotoren wurden als geknickte Pfeile dargestellt. Rot schraffierter Block: Lage der zur Northern-Analyse eingesetzten Dig-markierten RNA-Sonde P1S. Die Distanzen ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt bei Promotor $P_{11.1}$ bis zum jeweiligen 3'-Ende der im TCS11-Cluster enthaltenen Gene wurden zum Längenvergleich mit den bei der Northern-Analyse erhaltenen Banden als schwarze Pfeile gekennzeichnet.

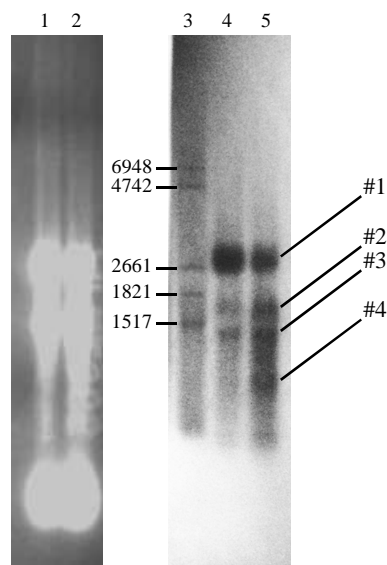


Abbildung 4.34: Northern-Analyse des von $P_{11.1}$ ausgehenden Transkripts mit der Sonde P1S. Dargestellt wurde die aufgetrennte Gesamt-RNA vor Durchführung des Northern-Blots (Spuren 1 und 2; Färbung mit Ethidiumbromid) und die bei der Durchführung der Northern-Analyse detektierten Signale (Spuren 3, 4 und 5). Spur 1: Gesamt-RNA bei einer Zelldichte von $N=40$; Spur 2: Gesamt-RNA bei einer Zelldichte von $N=120$; Spur 3: RNA Molecular Weight Marker I (Roche); Spur 4: Mit Sonde P1S detektierte Signale in Gesamt-RNA bei $N=40$; Spur 5: Mit Sonde P1S detektierte Signale in Gesamt-RNA bei $N=120$; #1-#4: Nummerierung der detektierten Signale.

Sowohl in der Gesamt-RNA aus der exponentiellen Wachstumsphase ($N=40$; mittlere Spur), als auch in der Gesamt-RNA aus der stationären Phase ($N=120$; rechte Spur) konnte ein starkes Signal bei ~ 2800 bp detektiert werden (#1 in Abbildung 4.34). Zusätzlich konnten in beiden Proben 3 weitere, jedoch weitaus schwächere Signale beobachtet werden (#2-4). Die Bandengrößen dieser Signale wurden zu 1600 bp, 1200 bp und 800 bp berechnet. Das bei der

Northern-Analyse detektierte Signal bei ~2800 bp (Abbildung 4.34) entsprach einem Transkript, ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt von Promotor P_{11.1}, welches die Gene *smp11A*, *smp11B*, *nbp11*, *msp11* und ungefähr die ersten 560 nt von *kin11* beinhaltete. Das zweitgrößte, jedoch weitaus schwächere Signal bei 1600 bp entsprach einem Transkript, welches schon vor dem 3'-Ende von *msp11* endete. Das Signal bei 1200 bp fiel in etwa mit dem 3'-Ende von *nbp11* zusammen. Das Signal bei 800 bp entsprach einem Transkript, welches vor dem 3'-Ende von *nbp11* endete. Hier konnte jedoch in keinem Fall eine putative Terminatorstruktur im entsprechenden DNA-Bereich gefunden werden. Wahrscheinlich handelte es sich bei dem starken Signal bei 2800 bp um das Haupttranskript, ausgehend von P_{11.1}. Dennoch bestand die Möglichkeit, daß es sich bei diesem Signal um ein Abbauprodukt eines Transkriptes handelte, welches ursprünglich alle Gene des TCS11-Clusters beinhaltete. Die schwächeren Signale kleinerer Bandengröße stellten vermutlich vorzeitig terminierte oder teilweise abgebaute Fragmente dar. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, sollte die zur Northern-Analyse isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben werden und verschieden lange Fragmente des TCS11-Clusters mittels PCR amplifiziert werden.

Bestimmung der Transkripte mittels PCR-Analyse auf cDNA

Durch die Amplifikation verschiedener Fragmente im Bereich des TCS11-Clusters auf zuvor hergestellter cDNA (3.15.1) von Gesamt-RNA aus Stamm R6 sollte untersucht werden, ob das in der Northern-Analyse detektierte 2800 bp-Signal dem kompletten Transkript, ausgehend von Promotor P_{11.1} entsprach oder ob auch ein Transkript, welches das gesamte TCS11-Cluster umfasste, existierte. In Tabelle 4.9 wurden die zur Amplifikation verschiedener Fragmente des TCS11-Cluster eingesetzten Primerkombinationen, sowie die Bezeichnung der resultierenden Fragmente aufgelistet.

Tabelle 4.9: Primerkombinationen zur PCR-Analyse der Transkripte des TCS11-Clusters

| Fragment-Nr. | Forward-Primer | Reverse-Primer |
|--------------|----------------|----------------|
| 1 | 18506_for | 1817_rev |
| 2 | 18506_for | RTP2r |
| 3 | 18506_for | dTC11_rev |
| 4 | 18506_for | rr11_rev |
| 5 | 18506_for | norupa |
| 6 | LTC11_for | rr11_rev |
| 7 | LTC11_for | RTP2r |
| 8 | LTC11_for | dTC11_rev |
| 9 | No_f | rr11_rev |
| 10 | rr_f | rr11_rev |
| 11 | l_for | norupa |
| 12 | dTCneu | rup1 |
| 13 | dR18_for | rr_r |

Die PCR-Analyse wurde wie unter 3.15.1 durchgeführt. In Abbildung 4.35 wurden die erfolgreich amplifizierten oder ausgebliebenen Fragmente im Bereich des TCS11-Clusters schematisch dargestellt (grüne bzw. rote Balken in Abbildung 4.35). Wie aus Abbildung 4.35 zu ersehen, konnten die Fragmente 1, 2, 3, 7 und 8 erfolgreich auf cDNA amplifiziert werden. Das längste dieser Fragmente reichte hierbei vom Transkriptionsstartpunkt bei P_{11.1} bis zur Position des Primers dTC11_rev in *kin11* und war mit einer Größe von 2160bp klar größer als die drei schwächeren Signale in der Northern-Analyse. Somit war gesichert, daß *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11* ausgehend von P_{11.1} polycistronisch transkribiert werden. Fragmente, welche vom Bereich upstream des Promotors P_{11.2} bis in *reg11* reichten, konnten nicht amplifiziert werden (Fragmente 4, 5 und 6 in Abbildung 4.35). Fragmente, welche jedoch downstream des Promotors P_{11.2} bis in oder bis downstream von *reg11* reichten konnten wieder amplifiziert werden (Fragmente 9, 10, 11 und 12 in Abbildung 4.35). Das 3'-

Ende des Transkriptes ausgehend von $P_{11.1}$ musste folglich zwischen den durch die gestrichelten Linien eingegrenzten Bereich I in Abbildung 4.35 lokalisiert sein. In diesen Bereich fiel auch die Bandengröße des stärksten Signals bei der Northern-Analyse (schwarzer Pfeil in Abbildung 4.35). Hieraus konnte die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die Gene *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *mSP11*, ein von Promotor $P_{11.1}$ aus transkribiertes Operon darstellten und daß die Gene des Zweikomponentensystem 11 (*kin11* und *reg11*) in einem von Promotor $P_{11.2}$ aus transkribierten Operon organisiert waren. Jedoch bestand aufgrund von fehlenden, eindeutigen Terminatorstrukturen im Bereich der Gene *mSP11*, *kin11* und *reg11* immer noch die Möglichkeit, das es unter anderen Bedingungen auch ein von $P_{11.1}$ ausgehendes Transkript gab, welches alle sechs Gene des TCS11-Clusters umfasste. Das 3'-Ende des Transkriptes ausgehend von $P_{11.2}$ konnte auf den intergenen Bereich downstream des *rupA*-Elements und upstream von *ccpA* eingegrenzt werden, da Fragment 12 amplifizierbar war, jedoch Fragment 13 nicht erhalten wurde (Bereich II in Abbildung 4.35). *RupA* lag folglich auf dem *kin11reg11*-Transkript. Für *rupA* in *Streptococcus pneumoniae* war dies der erste Hinweis einer Kotranskription eines *rup*-Elements. Dem *rup*-Element sehr ähnliche Elemente in *Neisseria* (NEMIS-Elemente) und *Yersinia* (ERIC-Elemente) werden oftmals mit benachbarten Genen kotranskribiert und liegen meist in der 3'-untranslatierten Region dieser Transkripte. In *Neisseria* und *Yersinia* konnte beiden Elementen eine Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation der mRNA zugeordnet werden (Mazzone et al., 2001; deGregorio et al., 2002; deGregorio et al., 2003; deGregorio et al., 2005; deGregorio et al., 2006).

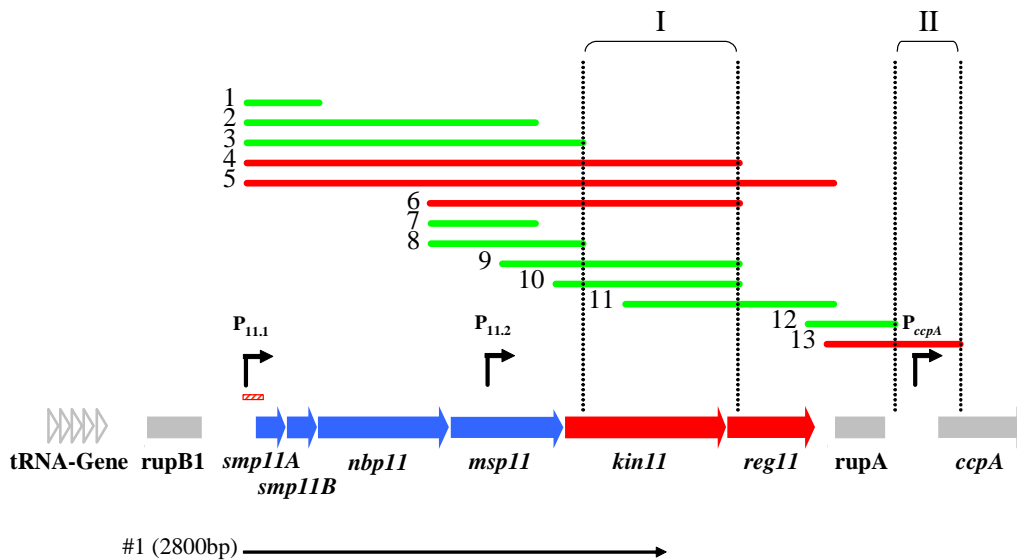


Abbildung 4.35: Schematische Darstellung der zur Abklärung der Transkripte im TCS11-Cluster amplifizierten Fragmente von cDNA. Dargestellt wurden die Gene des TCS11-Clusters (blaue und rote Pfeile) nebst den flankierenden Genen und repetitiven Elementen (graue Pfeile und Blöcke). Abgeknickte Pfeile kennzeichnen die identifizierten Promotoren. Das durch die Northern-Analyse identifizierte 2800 bp-Transkript #1 wurde als schwarzer Pfeil angedeutet. Die bei der Analyse der Transkripte von cDNA amplifizierten Fragmente wurden als grüne und rote Balken angedeutet (Nr. 1-13): Grüne Balken: Amplifizierte Fragmente (=existierendes Transkript); rote Balken: Nicht amplifizierbare Fragmente (=nicht existierendes Transkript). Rot schraffierter Block: Lage der zur Northern-Analyse eingesetzten Dig-markierten DNA-Sonde PIS. I: Bereich des 3'-Endes des Transkripts ausgehend von $P_{11.1}$. II: Bereich des 3'-Endes des Transkripts ausgehend von $P_{11.2}$.

Im Fall des TCS11-Clusters handelte es sich folglich um zwei getrennt transkribierte Operons, wobei der Transkriptionsstartpunkt des *kin11reg11*-Operons (11-2-Operon) von Promotor $P_{11.2}$ 441bp upstream des 3'-Endes von *mSP11*, dem letzten annotierten Gen des *smp11AB-nbp11-mSP11*-Operons (11-1-Operon) liegt (4.10.2). Beide Operons überlappen

somit in einem großen Bereich. Die genaue Position der 3'-Enden bedarf jedoch noch einer genaueren Bestimmung. Promotor $P_{11.1}$ wird womöglich positiv vom durch *kin11* und *reg11* kodierten Zweikomponentensystem 11 reguliert (4.10.3). Promotor $P_{11.2}$ könnte eventuell einer negativen Regulation durch das Zweikomponentensystem unterliegen (4.10.3). Eine mögliche Interaktion von aufgereinigtem Response-Regulator 11 (Reg11) mit den Promotor-Regionen $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ sollte in EMSA-Assays (3.14) überprüft werden (4.10.5).

4.10.5 Interaktion des Response-Regulator 11 (Reg11) mit den Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$

Die bisherigen Ergebnisse der Charakterisierung der Promotoren und Transkripte des TCS11-Clusters legen eine Regulation der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ nahe (4.10.2; 4.10.3; 4.10.4). Um die Art der Regulation der beiden Promotoren durch das Zweikomponentensystem 11 zu bestimmen, sollten Bindungsstudien des Response-Regulators 11 (Reg11) mit $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ durchgeführt werden. Die Überexpression und Aufreinigung des für die Interaktionsstudien benötigten Reg11 als His₆-Reg11-Fusionsprotein (3.21), sowie die Interaktionsstudien mit den Promotor-Regionen von $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ (3.14) wurden von Magdalena Marciszewski im Rahmen ihrer Diplomarbeit (2007) durchgeführt.

Hierbei konnte gezeigt werden, daß durch Acetylphosphat phosphoryliertes His₆-Reg11 an die Promotor-Region von $P_{11.1}$ (amplifiziert mit den Primern Ptc11-1_f-Sph und Ptc11-1_r-Bam; Sequenz des Fragments unter 7.10) bindet (Abbildung 4.36).

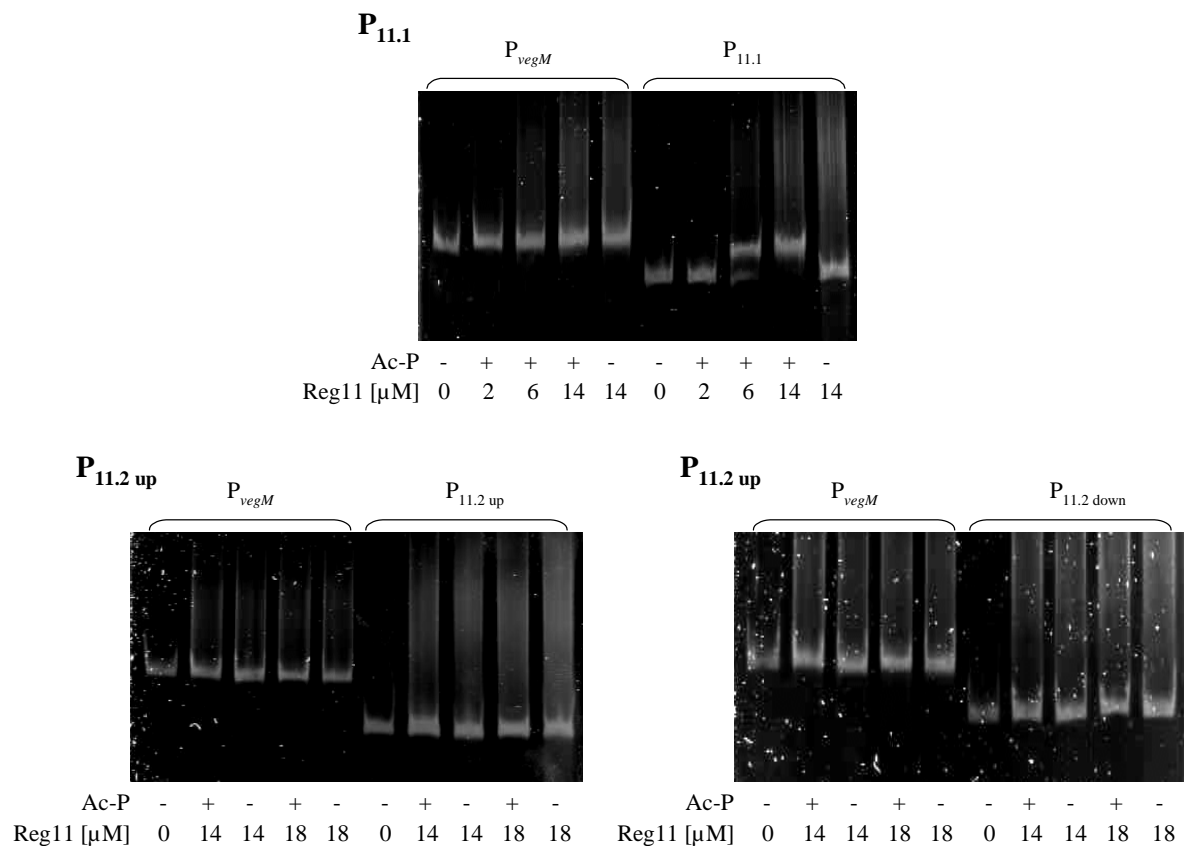


Abbildung 4.36: EMSA-Assay mit gereinigtem His₆-Reg11 und den Promotor-tragenden DNA-Fragmenten $P_{11.1}$, $P_{11.2}$ up und $P_{11.2}$ down. Dargestellt wurden die mit SYBR-Green gefärbten PAA-Gele (8%). P_{vegM}: Als Negativ-Kontrolle wurde in allen drei Assays ein DNA-Fragment mit einem veränderten Promotor (P_{vegM}) des *vegII*-Gens aus *B. subtilis* verwendet (Halfmann et al., 2007a). Zu den EMSA-Assays wurde sowohl phosphoryliertes- (Ac-P+), als auch unphosphoryliertes (Ac-P-) His₆-Reg11 eingesetzt. Die Konzentration von His₆-Reg11 wurde in μM angegeben. Aus: Marciszewski, Diplomarbeit 2007.

Bei der Aktivierung oder Inaktivierung eines Zweikomponentensystems durch den entsprechenden Stimulus kommt es letztendlich zur Übertragung einer Phosphatgruppe von der Kinase auf den Response-Regulator (1.3). Zusammen mit der Beobachtung, daß die Aktivität von Promotor $P_{11.1}$ in *kin11reg11*-Deletionsmutanten (P406 Δ *kin11reg11* und R6 Δ *kin11reg11*; 4.10.3) keine Aktivität aufwies, konnte aus der Bindung der phosphorylierten Form des Regulators His₆-Reg11 geschlossen werden, daß $P_{11.1}$ einer positiven Regulation durch das Zweikomponentensystem 11 unterlag. Die ausbleibende Aktivität von $P_{11.1}$ bei stark erhöhten Transkriptmengen der Gene des TCS11-Clusters in P406 (4.10.3) sprach in diesem Zusammenhang ebenfalls für diese Art der Regulation. Bei ausreichend hoher Menge des durch *nbp11* und *mcp11* kodierten ABC-Transporters und/oder ausreichenden Mengen der Proteine Smp11A und Smp11B, würde im Fall einer positiven Regulation der unbekannte Stimulus für die Aktivierung der Histidin-Kinase entfallen und die Aktivität von $P_{11.1}$ infolgedessen abnehmen.

Für den Promotor $P_{11.2}$ wurden aufgrund einer eventuellen negativen Regulation durch das Zweikomponentensystem 11 (4.10.3) zwei verschiedene Sequenzabschnitte der Promotor-Region zu den Interaktionsstudien eingesetzt. Einerseits das unter 4.10.3 zur Bestimmung der Aktivität klonierte Fragment ($P_{11.2}$ up in Abbildung 4.36; vgl. Abschnitt 7.10) und andererseits ein Fragment, welches weitere 106bp des von $P_{11.2}$ ausgehenden Transkriptes enthielt ($P_{11.2}$ down in Abbildung 4.36). Eine negative Regulation wird oftmals durch eine Bindung eines transkriptionellen Regulators direkt über oder downstream der -10-Region des Promotors vermittelt. Durch den Einsatz des zweiten Promotor-tragenden Fragments $P_{11.2}$ down, auf welchem auch ein genügend großer Teil der DNA-Region downstream der -10-Region vorhanden war, sollte somit im Fall einer Regulation durch das Zweikomponentensystem 11 zwischen einer positiven oder negativen Regulation unterschieden werden können. Für $P_{11.2}$ konnte jedoch in beiden Fällen keine Interaktion von His₆-Reg11 in phosphoryliertem-, noch in unphosphoryliertem Zustand beobachtet werden (Abbildung 4.36). Folglich unterlag $P_{11.2}$ keiner direkten Regulation durch das Zweikomponentensystem 11. Die beobachtete Erhöhung der Aktivität von $P_{11.2}$ in der *kin11reg11*-Deletionsmutante R6 Δ *kin11reg11* (4.10.3) wurde folglich durch einen anderen unbekanntem regulatorischen Mechanismus, infolge der Inaktivierung des Zweikomponentensystems 11 verursacht.

Durch die sowohl in der vorliegenden Arbeit (4.10.1-4.10.4) als auch von Magdalena Marciszewski im Rahmen ihrer Diplomarbeit (2007) erhaltenen Ergebnisse konnte nunmehr davon ausgegangen werden, daß die im 11-1-Operon organisierten Gene *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *mcp11* einer positiven Regulation durch das Zweikomponentensystem unterliegen. Zur Identifizierung von weiteren, durch das Zweikomponentensystem 11 direkt regulierten Genen im Genom von *Streptococcus pneumoniae* R6 sollte in dieser Arbeit die DNA-Bindestelle des Response-Regulators Reg11 in der Promotor-Region des Promotors $P_{11.1}$ charakterisiert werden (4.10.6). Die Beteiligung des durch *nbp11* und *mcp11* kodierten ABC-Transporters konnte bereits in 4.9.2 gezeigt werden. Die Identifizierung weiterer direkt regulierter Gene, sowie der Effekt entsprechender Deletionen auf die Piperacillin-Resistenz konnte klären, ob außer den Genen des putativen ABC-Transporters im 11-1-Operon noch weitere Gene an diesem Mechanismus beteiligt waren.

4.10.6 Identifizierung der DNA-Bindestelle des Response-Regulators Reg11

4.10.6.1 Sequenzanalyse der Promotorregion um P_{11.1}

Zur Auffindung weiterer, durch das Zweikomponentensystem 11 direkt regulierter Gene in *Streptococcus pneumoniae* R6, sollte die DNA-Bindestelle des Response-Regulators Reg11 in der Promotorregion von P_{11.1} identifiziert werden. DNA-Bindestellen von transkriptionellen Regulatoren wie Reg11 müssen nicht zwangsläufig aufgrund einer hohen Konserviertheit auf den ersten Blick anhand einer DNA-Sequenz erkennbar sein. Die Kenntnis über mehrere direkt regulierte Promotoren ist bei der Suche einer solchen DNA-Bindestelle äußerst hilfreich. So können durch Sequenzvergleiche der regulierten Promotoren auch weniger konservierte Bindestellen identifiziert werden. Da bislang erst ein direkt regulierter Promotor (P_{11.1}) identifiziert werden konnte (4.10.1-4.10.5), wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, durch Sequenzvergleiche der DNA-Region upstream der zu TCS11 in *Streptococcus pneumoniae* R6 homologen Cluster in anderen Gram-positiven Bakterien (4.10.1) eventuell konservierte Bereiche zu identifizieren. Zu diesem Vergleich wurden zunächst näher verwandte Arten aus der Familie der *Streptococcaceae*, sowie *B. subtilis* herangezogen. Unter Verwendung des Multalign-Programmes auf www.bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/ wurde die 150bp lange Sequenz upstream des Startkodons des jeweils ersten in den entsprechenden Clustern annotierten Leserasters verglichen. Abbildung 4.37 zeigt das hierdurch erzeugte Alignment.

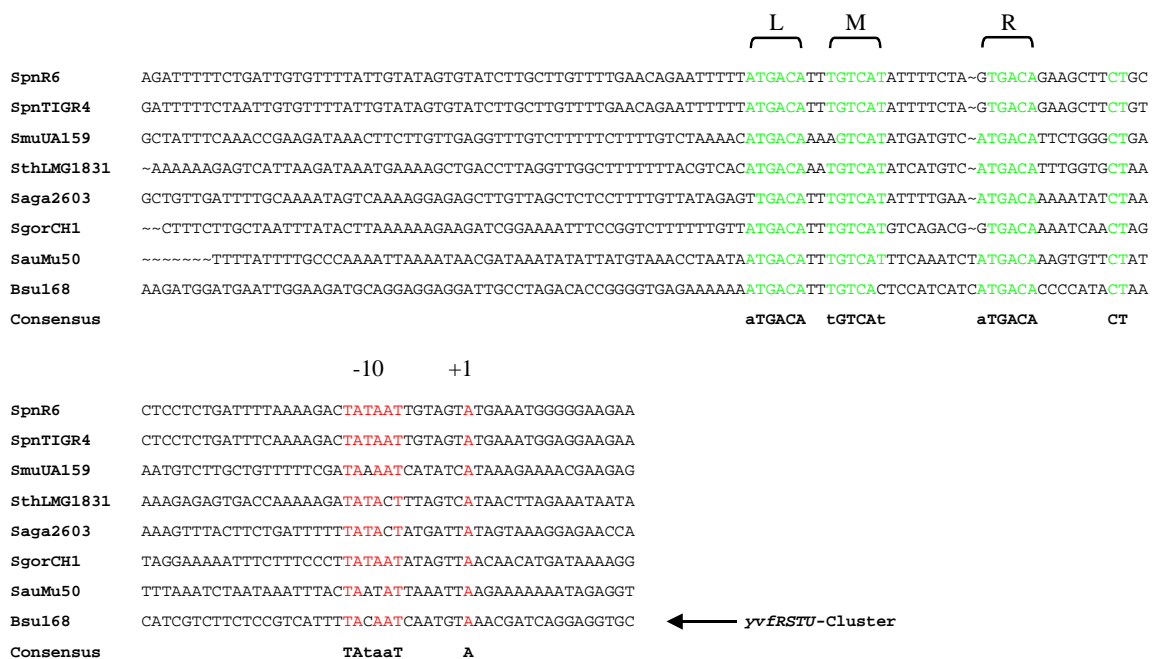


Abbildung 4.37: Alignment der DNA-Sequenzen upstream der zum TCS11-Cluster homologen Cluster in anderen Milchsäurebakterien und *B. subtilis*. Dargestellt wurden jeweils ca. 150bp aus jedem der zum Vergleich herangezogenen Organismen. Grün: Konservierte Nukleotide upstream der -10-Region. Rot: Konservierte Nukleotide der (putativen) -10-Region und der (putativen) Transkriptionsstarts (+1). Klammern: Konservierte Sequenzen L (links), M (mitte), R (rechts), welche Teile eines Inverted- (L, M) bzw. Directed Repeats (L, R) darstellen. ~: Lücke; *SpnR6*: *Streptococcus pneumoniae* R6; *SpnTIGR4*: *Streptococcus pneumoniae* TIGR4; *SmuUA159*: *Streptococcus mutans* UA159; *SthLMG1831*: *Streptococcus thermophilus* LMG1831; *Saga2603*: *Streptococcus agalactiae* 2603; *SgorCH1*: *Streptococcus gordonii* Challis CH1; *SauMu50*: *Staphylococcus aureus* Mu50; *Bsu168*: *Bacillus subtilis* 168; Consensus: Konsensussequenz der konservierten Nukleotide upstream der -10-Region und des Transkriptionsstarts +1 (zu 100 % konservierte Nukleotide in Großbuchstaben, zu mehr als 60 % konservierte Nukleotide in Kleinbuchstaben). Schwarzer Pfeil: Sequenz upstream des TCS11-ähnlichen *yvFRSTU*-Clusters aus *B. subtilis*.

Wie in Abbildung 4.37 zu ersehen, konnten upstream des in Stamm R6 identifizierten Transkriptionsstarts (+1; 4.10.2 und 4.10.3) in den zum Vergleich herangezogenen Sequenzen aus Abschnitt 4.10.1 mehrere, in ihrem Abstand zum Transkriptionsstart und der Nukleotidsequenz konservierte Abschnitte identifiziert werden (grün, bzw. rot dargestellt in Abbildung 4.37). Das in Stamm R6 als Transkriptionsstart bestimmte Adenin kam an dieser Position in allen Stämmen vor. In allen Stämmen befand sich an Position -7 eine gut konservierte -10-Region (TATAaT). An Position -35 und -36 lagen zwei zu 100 % konservierte Nukleotide (CT, grün). Bei -44 bis -49 befand sich die erste der als R, M und L bezeichneten drei konservierten Sequenzen (aTGACA, R, grün), wobei die Sequenzen R und L ein Directed Repeat und die Sequenzen L und M ein Inverted Repeat darstellten. Die Sequenzen M (tGTCA_t, grün) und L (aTGACA, grün) folgten weiter upstream bei -58 bis -63 und -66 bis -71. In *B. subtilis* und *S. aureus* konnte zwischen Sequenz R und M ein um 1 Nukleotid vergrößertes Spacing beobachtet werden. Die Sequenzen M und L lagen folglich bei -59 bis -64 und -67 bis -72. Das *yvfRSTU*-Cluster in *B. subtilis* besaß diese konservierten Sequenzabschnitte ebenfalls (schwarzer Pfeil in Abbildung 4.37). In *B. subtilis* wurde eine Regulation des zum TCS11-Cluster homologen *yvfRSTU*-Clusters durch das Zweikomponentensystem YvfTU vermutet (4.10.1; Kobayashi et al., 2001). Zudem fanden sich Hinweise zur YvfTU-abhängigen Transkriptionsregulation einer durch das *des*-Gen kodierten Membranlipid-Desaturase. Durch einen wie zuvor durchgeführten Sequenzvergleich zwischen dem Upstream-Bereich des *yvfRSTU*-Clusters, des TCS11-Clusters und des Bereichs des *des*-Promotors aus *Bacillus*, konnten die vor den zum TCS11-Cluster homologen Clustern konservierten Sequenzabschnitte auch im Promotorbereich des *P_{des}*-Promotors des *des*-Gens (Aguilar et al., 1999) gefunden werden (Abbildung 4.38).

| | | | | | | | |
|------------------|-------------------------|--|--------|--------|----------|--------------|--------------------|
| | | | | L | M | R | |
| SpnR6 | P_{11.1} | AGATTTTCTGATTGTGTTTTATTGTATAGTGTATCTTGCTTGTGTTTTGAACAGAAATTTTT | | aTGACA | tGTCA | TATTTTCTA- | -GTGACAGAAGCTTCTGC |
| Bsu168 | P_{yvf} | AAGATGGATGAATTGGAAGATGCAGGAGGAGGATTGCCTAGACACCGGGGTGAGAAAAAA | | aTGACA | tGTCA | CTCCATCATCAT | aTGACACCCCATACTAA |
| Bsu168 | P_{des} | AGCTTGTAATTTTTTTTACAAGCTTTTTTAGCGCAATCGGCTATGCATGCCGCACGAGAC | | aTGACA | AAATGTCA | TATAGGAGGCAT | GTGTGTGCTACTAC |
| Consensus | | | -10 | +1 | | | |
| SpnR6 | P_{11.1} | CTCC~TCTGATTTTAAAAGACTATAAT | T | G | T | A | T |
| Bsu168 | P_{yvf} | CATCGTCTTCTC~CGTCATTTTACAATCAATGTAACGATCAGGAGGTG | T | A | C | A | T |
| Bsu168 | P_{des} | AAAAGACTTCTCTCATTAGCGTATACTGAACCGAGACACACAATGAGAG | T | A | T | A | T |
| Consensus | | | TAtAaT | A | | | |

Abbildung 4.38: Alignment der Promotorbereiche P_{11.1} (*S. pneumoniae* R6), P_{des} (*B. subtilis* 168) und des putativen Promotors P_{yvf} (*B. subtilis* 168). Dargestellt wurden jeweils die Promotor-Regionen der Promotoren P_{11.1} und P_{des}, sowie die Region des putativen Promotors des *yvfRSTU*-Clusters P_{yvf}. Grün: Konservierte Nukleotide upstream der -10-Region. Rot: Konservierte Nukleotide der (putativen) -10-Region und der (putativen) Transkriptionsstarts (+1). Klammern: Konservierte Sequenzen L, M, R, welche Teile eines Inverted- bzw. Directed Repeats darstellen. ~: Lücke; SpnR6 P_{11.1}: Promotorregion P_{11.1} aus *Streptococcus pneumoniae* R6; Bsu168 P_{yvf}: Region des putativen Promotors P_{yvf} upstream des *yvfRSTU*-Clusters in *Bacillus subtilis* 168; Bsu168 P_{des}: Promotorregion P_{des} aus *Bacillus subtilis* 168; Consensus: Konsensussequenz der konservierten Nukleotide upstream der -10-Region und des Transkriptionsstarts +1 (zu 100 % konservierte Nukleotide in Großbuchstaben, zu mehr als 60 % konservierte Nukleotide in Kleinbuchstaben). C: Transkriptionsstart des *des*-Gens (Aguilar et al., 1999).

Da sich die in Abbildung 4.37 und 4.38 grün markierten Sequenzen in allen zum Sequenzvergleich herangezogenen Stämmen nahezu unverändert vor den zum TCS11-Cluster in Stamm R6 homologen Clustern wiederfanden, wurde vermutet, daß es sich hierbei eventuell um an der Interaktion mit dem Response-Regulators Reg11 beteiligte DNA-Abschnitte handeln konnte. Die zusätzlichen Hinweise für eine Regulation von P_{des}, sowie des

putativen Promotors P_{yvf} aus *B. subtilis* durch das dem Zweikomponentensystem 11 homologe YvfTU-System stützten diese Vermutung. Im Fall der Promotoren P_{yvf} und P_{des} aus *B. subtilis* handelte es sich um die einzigen bisher bekannten Promotoren aus allen untersuchten Gram-positiven Bakterien, welche ein TCS11-ähnliches Cluster besaßen, von denen zumindest Hinweise auf eine Regulation durch das entsprechende Zweikomponentensystem vorhanden waren (Kobayashi et al., 2001). Die Möglichkeit einer Interaktion von His₆-Reg11 mit diesen Promotoren schien im Vergleich zu den Promotorregionen der anderen TCS11-ähnlichen Cluster am wahrscheinlichsten zu sein. Durch Protein-DNA-Interaktionsstudien mit aufgereinigtem His₆-Reg11 (4.10.5) und den amplifizierten Promotor-Regionen P_{des} und P_{yvf} aus *B. subtilis* sollte die Fähigkeit des Response-Regulators Reg11 zur Bindung an diese beiden Promotoren im Vergleich zur Bindung an $P_{11.1}$ überprüft werden (4.10.6.2). Sollte Reg11 auch an diese beiden Promotorfragmente binden können, so wäre dies ein klarer Hinweis auf die Beteiligung der beobachteten konservierten Sequenzabschnitte bei der Bindung von Reg11.

4.10.6.2 Interaktion von His₆-Reg11 mit den Promotor-Regionen von P_{des} und P_{yvf} aus *B. subtilis* 168

Zur Überprüfung einer Interaktion des Response-Regulators Reg11 mit aus *B. subtilis* 168 amplifizierten, die Promotoren P_{des} - und P_{yvf} -tragenden Fragmenten, wurde chromosomale DNA aus Stamm 168 wie unter 3.2.2 beschrieben isoliert. Die Promotor-Regionen von P_{des} und P_{yvf} wurden unter Verwendung der Primer des_for und des_rev, sowie yvf_for und yvf_rev in einer PCR amplifiziert. Die Interaktion von Reg11 mit den Promotoren sollte in EMSA-Assays unter Verwendung von aufgereinigtem His₆-Reg11 in phosphorylierter- und unphosphorylierter Form, wie unter 3.14 beschrieben, überprüft werden. Als Negativ-Kontrolle wurde hierbei ein DNA-Fragment eingesetzt, welches einen aus *B. subtilis* stammenden, modifizierten Promotor P_{vegM} des *vegII*-Gens trug (Halfmann et al., 2007a) und mit den Primern veg5 und vegM aus dem Plasmid pPP2vegM (Halfmann et al., 2007a) amplifiziert wurde. Als Positiv-Kontrolle zur Überprüfung der Aktivität des His₆-Reg11 wurde das $P_{11.1}$ -tragende DNA-Fragment aus 4.10.5 verwendet. Die Ergebnisse der EMSA-Assays wurden in Abbildung 4.39 dargestellt.

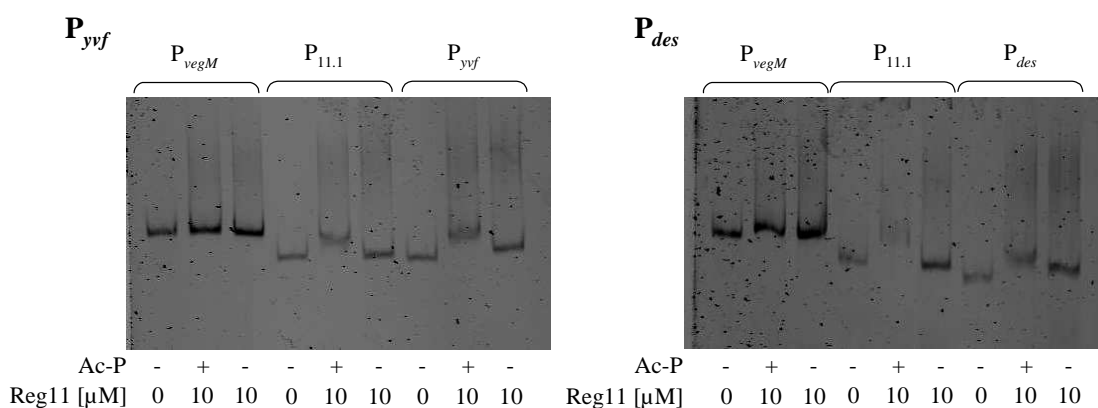


Abbildung 4.39: EMSA-Assay mit gereinigtem His₆-Reg11 und den Promotor-tragenden DNA-Fragmenten P_{yvf} und P_{des} . Dargestellt wurden die mit SYBR-Green gefärbten und gescannten PAA-Gele (8 %). $P_{11.1}$: Als Positiv-Kontrolle diente das $P_{11.1}$ -tragende DNA-Fragment aus 4.10.5. Als Negativ-Kontrolle wurde ein DNA-Fragment mit einem veränderten Promotor (P_{vegM}) des *vegII*-Gens aus *B. subtilis* verwendet (Halfmann et al., 2007a). Zu den EMSA-Assays wurde sowohl phosphoryliertes- (Ac-P+), als auch unphosphoryliertes (Ac-P-) His₆-Reg11 eingesetzt. Die Konzentration von His₆-Reg11 wurde in μM angegeben.

Wie in Abbildung 4.39 zu erkennen, war His₆-Reg11 wie schon im Fall des Promotors P_{11.1} des TCS11-Clusters in der Lage, an die Promotor-Regionen P_{des} und P_{yvf} aus *B. subtilis* in phosphorylierter Form zu binden. In beiden Fällen konnte eine Retardierung der Promotor-tragenden DNA-Fragmente bei einer Konzentration von phosphoryliertem His₆-Reg11 von 10 μM im Gellauf beobachtet werden (Abbildung 4.39). Außer der konservierten -10-Region und der Position des als Transkriptionsstart von P_{11.1} bestimmten Adenins, bestand die einzige Übereinstimmung in der Sequenz der Promotor-tragenden DNA-Fragmente P_{des} und P_{yvf} mit dem Promotor-tragenden DNA-Fragment von P_{11.1}, in den in den Abbildungen 4.37 und 4.38 grün gekennzeichneten Abschnitten L, M, R, sowie in den beiden Nukleotiden C und T zwischen R und der -10-Region. Da nun His₆-Reg11 gleichermaßen mit allen drei Promotor-tragenden DNA-Fragmenten eine Bindung, welche zur Retardierung im Gellauf bei den EMSA-Assays führte, eingehen konnte, mußte davon ausgegangen werden, daß diese Sequenzen ganz oder teilweise für die Bindung mit phosphoryliertem Response-Regulator Reg11 verantwortlich waren. Zur Überprüfung dieses Sachverhalts sollten die als L, M und R bezeichneten Bereiche in der Promotorregion von P_{11.1} einzeln durch eine gezielte Mutagenese der Nukleotidsequenz verändert werden (4.10.6.3). Mit DNA-Fragmenten, welche die mutagenisierten Varianten von P_{11.1} trugen, sollte im Anschluß in weiteren EMSA-Assays unter Verwendung von His₆-Reg11 festgestellt werden, inwiefern eine Interaktion zwischen Regulator und DNA noch möglich war (4.10.6.3).

4.10.6.3 Mutagenese der putativen DNA-Bindestelle von Reg11 in Promotor P_{11.1}

Zur Überprüfung der Beteiligung der in der Promotorregion von P_{11.1} konservierten DNA-Sequenzen L, M und R an der Interaktion von His₆-Reg11 mit Promotor P_{11.1}, mussten solche Promotor P_{11.1}-tragende Fragmente hergestellt werden, in denen die Sequenzen einzeln gezielt verändert waren (Abbildung 4.40). Diese Promotor-tragenden Fragmente sollten im Anschluß in EMSA-Assays mit aufgereinigtem His₆-Reg11 eingesetzt werden. Im Fall der Sequenzen L und M wurden jeweils alle sechs Nukleotide ausgetauscht (kursiv in Abbildung 4.40). Sequenz L wurde von ATGACA zu CACTGT und Sequenz M von TGTCAT zu TTAACG verändert. Das resultierende, P_{11.1}-tragende Fragment mit veränderter Sequenz L wurde als LP_{11.1}, das resultierende, P_{11.1}-tragende Fragment mit veränderter Sequenz M wurde als MP_{11.1} bezeichnet. Von Sequenz R wurden alle sechs Nukleotide deletiert. Das P_{11.1}-tragende Fragment mit deletierter Sequenz R wurde als RP_{11.1} bezeichnet.

Zur Herstellung von LP_{11.1} wurden zunächst zwei Fragmente der P_{11.1}-Region unter Verwendung der Primerpaare P_{tcs11-1_f-Sph} und dLR2R, sowie P_{tcs11-1_r-Bam} und dLR2F in einer PCR aus chromosomaler DNA des Stammes R6 amplifiziert. Durch die Verwendung der zueinander komplementären Primer dLR2R und dLR2F, welche beide die veränderte Sequenz L trugen, entstanden an beiden Amplifikaten Enden, welche in 42 Nukleotiden zueinander komplementär waren. In einer anschließenden überlappenden PCR (3.6) unter Verwendung der Primer P_{tcs11-1_f-Sph} und P_{tcs11-1_r-Bam} wurden beide Amplifikate miteinander verknüpft, wobei das DNA-Fragment LP_{11.1} entstand, welches, mit Ausnahme der veränderten Sequenz L, dem zur Überprüfung der Interaktion von His₆-Reg11 mit Promotor P_{11.1}-eingesetzten P_{11.1}-tragenden Fragment (4.10.5; 7.10, Abbildung 7.6) entsprach. Auf die gleiche Art wurde das DNA-Fragment MP_{11.1} hergestellt. Hierbei wurden zur Amplifikation mittels PCR aus chromosomaler DNA des Stammes R6 die Primerpaare P_{tcs11-1_f-Sph} und dMRrev, sowie P_{tcs11-1_r-Bam} und dMRfor eingesetzt. dMRrev und dMRfor trugen in diesem Fall die veränderte Sequenz M und waren in 41 Nukleotiden zueinander komplementär. In einer anschließend durchgeführten überlappenden PCR (3.6) wurden beide amplifizierte Fragmente unter Verwendung der Primer P_{tcs11-1_f-Sph} und P_{tcs11-1_r-Bam} miteinander verknüpft, wobei das DNA-Fragment MP_{11.1} entstand, welches,

mit Ausnahme der veränderten Sequenz M, dem zur Überprüfung der Interaktion von His₆-Reg11 mit Promotor P_{11.1}-eingesetzten P_{11.1}-tragenden Fragment (4.10.5; 7.10, Abbildung 7.6) entsprach. Zur Herstellung von RP_{11.1} wurde der Bereich von Promotor P_{11.1} aus chromosomaler DNA des Stammes R6 unter Verwendung der Primer Pcs11-1_f-Sph und dRR amplifiziert. Primer dRR trug die vorgesehene Deletion der Sequenz R.

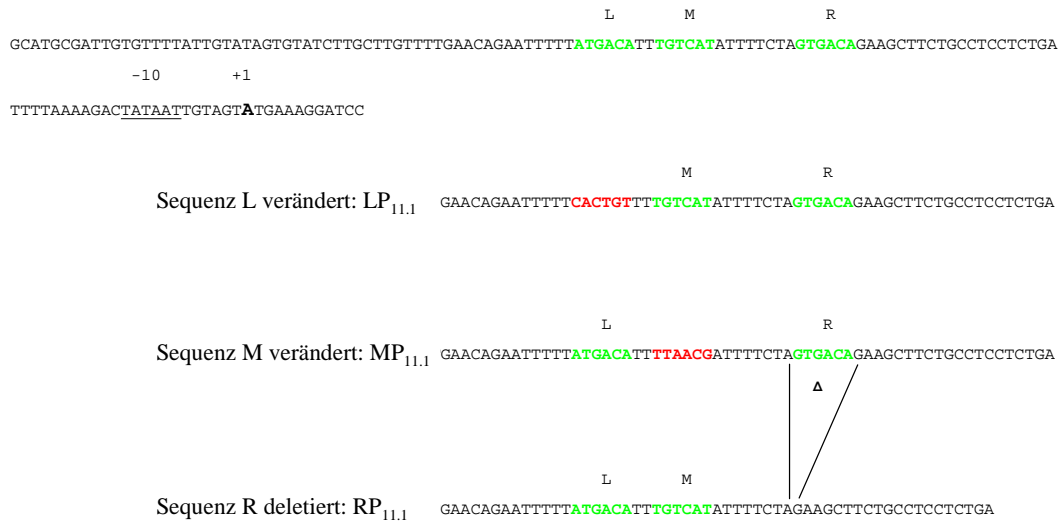


Abbildung 4.40: Sequenzen der veränderten, den Promotor P_{11.1}-tragenden DNA-Fragmente. Gezeigt wurden relevante Ausschnitte der durch eine gezielte Mutagenese, bzw. Deletion der Sequenzen L, M und R hergestellten, resultierenden P_{11.1}-tragenden, veränderten DNA-Fragmente LP_{11.1}-, MP_{11.1}- und RP_{11.1}. Zum Vergleich wurde das unveränderte, P_{11.1}-tragende DNA-Fragment aus 4.10.5 in voller Länge ebenfalls gezeigt (oben). Grüne Nukleotide: Unveränderte Sequenzen L, M und R. Rote Nukleotide: Durch gezielte Mutagenese veränderte Bereiche. Zur Herstellung von RP_{11.1} wurde Sequenz R deletiert (durch schwarze Linien eingegrenzter Bereich Δ). -10: -10-Region des Promotors P_{11.1}. +1: Transkriptionsstart von *smp11A* in Promotor P_{11.1}.

Die so hergestellten, P_{11.1}-tragenden, veränderten DNA-Fragmente LP_{11.1}, MP_{11.1} und RP_{11.1} wurden in EMSA-Assays zur Überprüfung der Interaktion mit aufgereinigtem, phosphoryliertem- und unphosphoryliertem His₆-Reg11 eingesetzt. Die Durchführung der EMSA-Assays erfolgte wie unter 3.14 beschrieben, wobei eine Konzentration von His₆-Reg11 von 10 μM gewählt wurde. In Abbildung 4.41 wurden die mit SYBR Green gefärbten und mit Hilfe eines FluorImager 595 (Molecular Dynamics) eingescannten PAA-Gele der EMSA-Assays dargestellt (4.41A).

Wie aus Abbildung 4.41A (links) zu ersehen, konnte im Fall des EMSA-Assays des LP_{11.1}-Fragments keine Retardierung im Gellauf bei einer Konzentration von 10 μM des phosphorylierten His₆-Reg11 im Vergleich zum P_{11.1}-tragenden DNA-Fragment mehr beobachtet werden. Folglich war die Nukleotidsequenz ATGACA der Sequenz L notwendig zur Interaktion von phosphoryliertem His₆-Reg11 mit Promotor P_{11.1}. Eine Veränderung der Nukleotidsequenz TGTCAT von Sequenz M zeigte, wie aus Abbildung 4.41A (mitte) zu ersehen, einen vergleichbaren Effekt. Hier konnte jedoch noch eine leichte Retardierung des DNA-Fragments MP_{11.1} beobachtet werden. Folglich war die Nukleotidsequenz TGTCAT ebenfalls notwendig für eine Interaktion von phosphoryliertem His₆-Reg11 mit Promotor P_{11.1}. Die Deletion der Nukleotide GTGACA von Sequenz R zeigte das in Abbildung 4.41 rechts gezeigte Bild. Mit phosphoryliertem His₆-Reg11 konnte zwar noch eine Retardierung des DNA-Fragments RP_{11.1} festgestellt werden, jedoch war diese im Vergleich zum unveränderten P_{11.1}-tragenden DNA-Fragment nicht vollständig. Folglich schien die Nukleotidsequenz GTGACA von Sequenz R zwar an einer Bindung von His₆-Reg11 an P_{11.1} beteiligt, jedoch nicht unbedingt notwendig zur Interaktion zu sein.

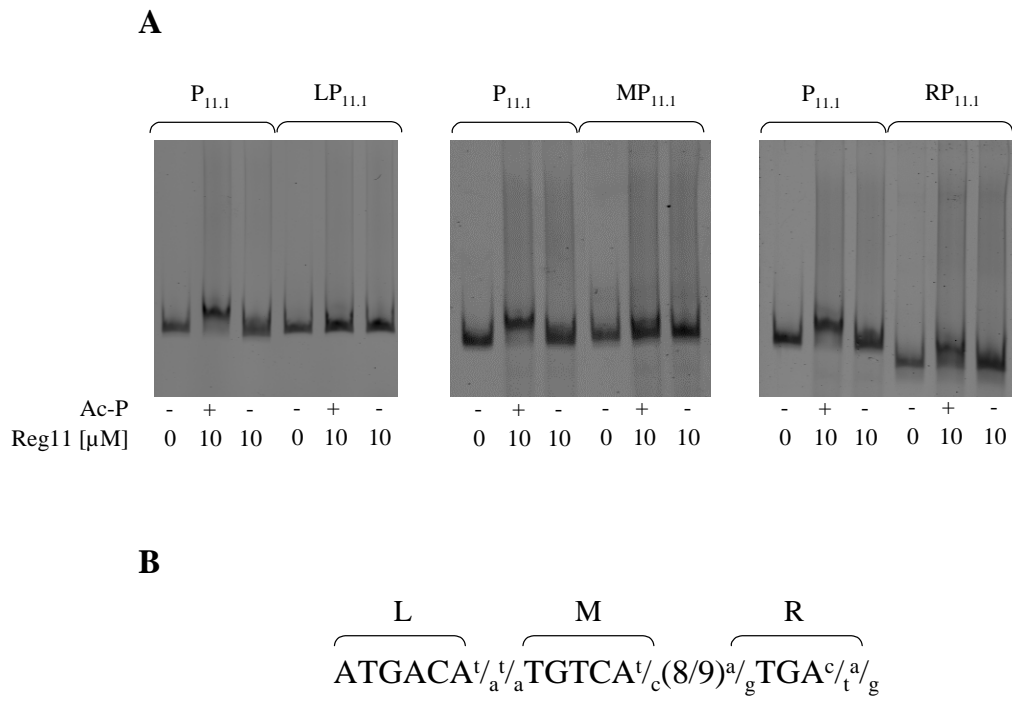


Abbildung 4.41: EMSA-Assay mit gereinigtem His₆-Reg11 und den veränderten, Promotor-tragenden DNA-Fragmenten LP_{11.1}, MP_{11.1} und RP_{11.1} (A) und Darstellung der zur Bindung von Reg11 an Promotor P_{11.1} essentiellen Sequenzen (B). A: Dargestellt wurden die mit SYBR-Green gefärbten und gescannten PAA-Gele (8%). LP_{11.1}: Als Positiv-Kontrolle diente das P_{11.1}-tragende DNA-Fragment aus 4.10.5. Zu den EMSA-Assays wurde sowohl phosphoryliertes- (Ac-P+), als auch unphosphoryliertes (Ac-P-) His₆-Reg11 eingesetzt. Die Konzentration von His₆-Reg11 wurde in μM angegeben. B: Zur Bindung des Response-Regulators Reg11 essentielle Repeats in *Streptococcus pneumoniae* R6. Zu 100% konservierte Nukleotide (im Vergleich der Promotoren P_{11.1}, P_{yvf} und P_{des}) wurden in Großbuchstaben dargestellt. Variable Nukleotide (im Vergleich der Promotoren P_{11.1}, P_{yvf} und P_{des}) wurden in Kleinbuchstaben dargestellt. Ziffern geben die Anzahl der Nukleotide zwischen Sequenz M und R an. Zur Bindung von phosphoryliertem His₆-Reg11 notwendige Nukleotide der Sequenzen wurden unterstrichen.

Da die DNA-Fragmente, welche die Promotoren P_{des} und P_{yvf} aus *B. subtilis* trugen, alle mit phosphoryliertem His₆-Reg11 binden konnten (4.10.6.2) und unter Berücksichtigung der Sequenzhomologien der Sequenzen L, M und R der drei Promotoren P_{11.1}, P_{des} und P_{yvf}, konnte zusammen mit den nun erhaltenen Ergebnissen die in Abbildung 4.41B dargestellte Konsensus-Sequenz der DNA-Bindestelle für den Response-Regulator Reg11 abgeleitet werden. Die Sequenzen L und M stellen als Inverted Repeat den Bereich der untersuchten Promotoren P_{11.1}, P_{des} und P_{yvf} dar, welcher für die Interaktion von Reg11 maßgeblich zu sein scheint. Beide Sequenzen sind entweder durch zwei Thymidinreste (TT) oder zwei Adenosinreste (AA) voneinander getrennt. Die Sequenz R scheint zwar auch an der Interaktion mit Reg11 beteiligt zu sein, jedoch zeigt die Deletion dieses Bereichs auf die Interaktion mit Reg11 den weitaus geringsten Effekt (Abbildung 4.41A rechts). Sequenz R folgt mit einem Spacing von 8 bzw. 9 unkonservierten Nukleotiden downstream von Sequenz M. Sequenz R scheint hierbei im direkten Vergleich zu den Sequenzen L und M den geringsten Grad der Konservierung zu besitzen. Lediglich die zentralen Nukleotide TGA waren zu 100 % konserviert. Womöglich spiegelt diese geringe Konservierung den eher geringen Effekt der Deletion auf die Interaktion mit Reg11 wieder. Generell ließ sich feststellen, daß im Fall der mit Reg11 interagierenden Region der Promotoren P_{11.1}, P_{des} und P_{yvf} jeweils nur eine der drei Sequenzen L, M und R eine Veränderung im Vergleich zu einem Motiv der Art ATGACA(2)TGTCAT(8/9)ATGACA aufwies (Abbildungen 4.37 und 4.38).

Da nunmehr gezeigt werden konnte, daß zumindest die Sequenzen L und M für die Bindung des phosphorylierten Response-Regulators Reg11 essentiell waren und die Sequenz R zumindest einen Einfluß auf die Bindungsaffinität hatte, sollte mit ihrer Hilfe nach weiteren, durch das Zweikomponentensystem 11 regulierten Genen im Genom von *Streptococcus pneumoniae* R6 gesucht werden.

4.10.6.4 Suche nach weiteren regulierten Promotoren

Durch den Nachweis der Notwendigkeit der Sequenzen L und M für die Bindung des phosphorylierten Response-Regulators Reg11 in der Promotor-Region von P_{11.1} bot sich die Möglichkeit, nach weiteren, durch das Zweikomponentensystem 11 regulierten Promotoren im Genom von *Streptococcus pneumoniae* zu suchen. Eventuelle Promotoren könnten durch EMSA-Assays unter Verwendung von His₆-Reg11 auf eine Bindung des Regulators hin untersucht werden. Zur Identifizierung solcher eventuell regulierter Promotoren, wurde das Genom von *Streptococcus pneumoniae* R6 unter Verwendung der Funktion Search Pattern des StreptoPneumoList-Servers zunächst nach zur Reg11-Bindestelle vor Promotor P_{11.1} 100 %-ig identischen DNA-Motiven (die Sequenzen L, M und R betreffend, sowie deren Abstände zueinander; Abb. 4.40, oben) durchsucht (www.genolist.pasteur.fr/StreptoPneumoList/index.html). Es konnten jedoch keine weiteren 100 %-ig konservierten Motive dieser Anordnung im Genom von Stamm R6 gefunden werden. Auch die Suche nach einem der Konsensus-Sequenz der Reg11-DNA-Bindestelle aus Abbildung 4.41B identischen Motiv erbrachte keine weiteren Treffer. Bei der Suche wurden schließlich weitere Abweichungen zur Konsensus-Sequenz der Reg11-DNA-Bindestelle zugelassen. Für jede der drei aus je sechs Nukleotiden bestehenden Sequenzen L, M und R wurden maximal zwei Abweichungen zugelassen. Zudem wurde nach Motiven gesucht, welche nur die Sequenzen L und M beinhalteten und auch hier nur 2 Abweichungen zugelassen. Die Abstände der Sequenzen wurden entsprechend der Konsensus-Sequenz aus Abbildung 4.41B auf zwei Nukleotide zwischen Sequenz L und M, sowie 8 bis 9 Nukleotide zwischen den Sequenzen M und R festgesetzt. Von den so gefundenen 794 Treffern besaßen 60 eine gut konservierte -10-Region (2 Abweichungen in der TATAAT-Konsensus-Sequenz) im Abstand von 30 bis 50 Nukleotiden downstream von Sequenz R, bzw. von Sequenz M und waren nicht weiter als 500 Nukleotide upstream des nächstgelegenen annotierten Startkodons gelegen. Von den so gefundenen, potentiellen Promotoren mit eventueller Reg11-Bindestelle wurden 21 Regionen amplifiziert und in wie unter 3.14 beschriebenen EMSA-Assays auf eine Interaktion mit aufgereinigtem His₆-Reg11 hin untersucht. In keinem der Fälle konnte eine Retardierung der DNA-Fragmente im Gellauf beobachtet werden. Folglich unterlagen diese putativen Promotoren wahrscheinlich auch keiner Kontrolle durch das Zweikomponentensystem 11. Da es sich bei diesen 21 Kandidaten bereits um solche eventuelle Bindestellen handelte, welche vier und mehr, im Vergleich zur Konsensus-Sequenz veränderte Nukleotide aufwiesen, wurde auf eine weitere Testung der meist noch stärker veränderten putativen Bindestellen verzichtet. Es mußte davon ausgegangen werden, daß in *Streptococcus pneumoniae* R6 lediglich der Promotor P_{11.1} direkt durch das Zweikomponentensystem 11 reguliert wurde. Upstream der in Abbildung 4.29 (4.10.1) dargestellten, zum TCS11-Cluster homologen Cluster anderer Gram-positiver Bakterien konnte die für Reg11 identifizierte DNA-Bindestelle mit der in Abbildung 4.41 gezeigten Konsensussequenz ebenfalls identifiziert werden (Abbildung 4.37). Auch in den Genomen dieser Bakterien konnten, mit Ausnahme von *Streptococcus mutans* UA159, keine weiteren, konservierten Motive dieser Art identifiziert werden. Eventuell stehen auch in diesen Bakterien jeweils nur die TCS-Cluster unter der Kontrolle des Zweikomponentensystems. In *Streptococcus mutans* UA159 befinden sich diese drei

Sequenzen noch in einem Promotor-Bereich eines für eine Fructanase kodierenden Gens (*fruA*), welches jedoch im Genom von *Streptococcus pneumoniae* nicht vorhanden ist.

4.10.7 Übersicht über Promotoren und Transkripte des TCS11-Clusters

Die in den Abschnitten 4.10.1 bis 4.10.6 beschriebenen, Untersuchungen zur Charakterisierung des TCS11-Clusters in *Streptococcus pneumoniae* R6 lassen sich in einem in Abbildung 4.42 gezeigten Modell zusammenfassen. Die Gene des TCS11-Clusters (*spr1818* bis *spr1814*) wurden in der vorliegenden Arbeit im Zuge der Charakterisierung des TCS11-Clusters zur besseren Übersicht entsprechend der putativen funktionellen Domänen der durch sie kodierten Proteine und entsprechend ihrer Regulation durch das Zweikomponentensystem 11 umbenannt (siehe 4.2.7).

Promotoren und Operonstruktur

Im TCS11-Cluster existieren die beiden identifizierten Transkriptionsstartpunkte P_{11.1} und P_{11.2} (4.10.2; 4.10.3).

Gene, welche ausgehend von P_{11.1} transkribiert werden, bilden eine Transkriptionseinheit, welche als 11-1-Operon bezeichnet wurde (Abbildung 4.42; siehe auch 4.10.4). Zum 11-1-Operon zählen zumindest die Gene *smpl1A*, *smpl1B*, *nbp11* und *msp11*. Unter den in der vorliegenden Arbeit herrschenden Wachstumsbedingungen konnte in Northern-Analysen (4.10.4) kein von P_{11.1} ausgehendes Transkript, welches auch die Gene *kin11* und *reg11* umfasste, detektiert werden. Die exakte Position des 3'-Endes des Transkriptes des 11-1-Operons bedarf zwar noch einer genaueren Bestimmung, die Transkription, ausgehend von P_{11.1} scheint jedoch unter den in der vorliegenden Arbeit angewandten Wachstumsbedingungen im Bereich von *kin11* terminiert oder das resultierende Transkript degradiert zu werden. Es konnten jedoch im entsprechenden Bereich keine eindeutigen Terminatorstrukturen identifiziert werden, welche auf eine Termination deuteten.

Die Gene *kin11* und *reg11* werden als eigene Transkriptionseinheit, ausgehend von P_{11.2} transkribiert (Abbildung 4.42; 4.10.4). Diese als 11-2-Operon bezeichnete Transkriptionseinheit umfasst vor dem auf ihr kodierten *kin11*-Gen einen 441 Nukleotide umfassenden, transkribierten, jedoch vermutlich untranslatierten Bereich. Auf diesem Teil der von P_{11.2} aus transkribierten mRNA konnte kein mit entsprechenden Translationssignalen ausgestattetes offenes Leseraster identifiziert werden (4.10.2-4.10.4). Diese untranslatierte Leadersequenz könnte eine Rolle bei der Translationsregulation von *kin11* oder bei der mRNA-Stabilität des *kin11reg11*-Transkriptes spielen.

Auf dem Transkript des 11-2-Operons befindet sich zudem eine downstream von *reg11* liegende Kopie des repetitiven Elements *rupA* (Oggioni & Claverys, 1999). Die 3'-Ende des Transkriptes konnte auf den intergenen Bereich zwischen dieser Kopie des *rupA*-Elements und dem folgenden Gen *ccpA*, welches für ein Katabolit-Kontroll-Protein kodiert, eingegrenzt werden (Abbildung 4.42; siehe auch 4.10.4). Direkt downstream des *rupA*-Elements konnte eine putative Terminatorstruktur identifiziert werden (Abbildung 4.42).

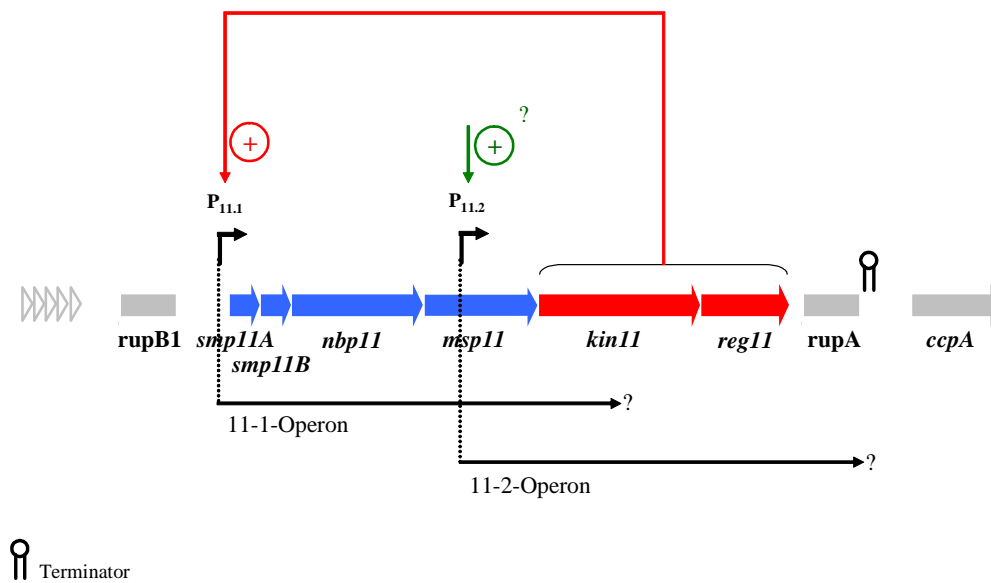


Abbildung 4.42: Transkriptionseinheiten und Modell zur Regulation der Promotoren des TCS11-Cluster. Gene des TCS11-Clusters wurden als blaue und rote Blockpfeile dargestellt. Blaue Blockpfeile: Gene des 11-1-Operons; rote Blockpfeile: Gene des 11-2-Operons. Die Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ wurden als genickte, schwarze Pfeile dargestellt. Schwarze Pfeile zeigen die Transkriptlänge des 11-1- und 11-2-Operons (? : Genau 3'-Enden bedürfen der Identifizierung). + : $P_{11.1}$ unterliegt einer positiven Regulation durch das Zwei-Komponentensystem 11. + : $P_{11.2}$ unterliegt einer noch unbekanntem Regulation, welche unabhängig vom Zwei-Komponentensystem 11 erfolgt. *rupA* und *rupB1*: Kopien eines repetitiven Elements aus *Streptococcus pneumoniae*; *ccpA*: Gen des Katabolit-Kontroll-Proteins.

Regulation der Promotoren

Beide Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ unterliegen einer transkriptionellen Regulation (Abbildung 4.42; vgl. 4.10.3). Für $P_{11.1}$ konnte eine direkte Regulation durch den Response-Regulator Reg11 des Zwei-Komponentensystems 11 gezeigt (4.10.5), sowie die DNA-Bindestelle des Regulators in $P_{11.1}$ identifiziert werden (4.10.6). Die Gene des 11-1-Operon unterliegen somit einer Regulation durch das Zwei-Komponentensystem 11. Im Fall des TCS11-Clusters handelt es sich folglich um eine funktionell gekoppelte ABC-Transporter-Zwei-Komponentensystem-Einheit, ähnlich derer repräsentiert durch das Zwei-Komponentensystem BceRS und des durch ihn regulierten ABC-Transporters BceAB in *Bacillus subtilis* (Abbildung 4.28; Ohki et al., 2003; Mascher, 2006b; Mascher et al, 2006c).

Promotor $P_{11.2}$ unterliegt ebenfalls einer transkriptionellen Regulation (4.10.3), wobei diese jedoch nicht durch eine Bindung des Response-Regulators Reg11 in der Promotor-Region $P_{11.2}$ vermittelt wird (4.10.5). Die Regulation von $P_{11.2}$ erfolgt vermutlich über einen noch unbekanntem transkriptionellen Regulator, welcher infolge der ausbleibenden Transkription des 11-1-Operons in einer *kin11reg11*-Deletionsmutante zur erhöhten Aktivität des Promotors $P_{11.2}$ führen könnte (4.10.3).

Es konnten in *Streptococcus pneumoniae* keine weiteren, direkt durch das Zwei-Komponentensystem 11 regulierte Promotoren identifiziert werden (4.10.6.4). Da das Zwei-Komponentensystem 11 nunmehr einzig den durch *nbp11* und *msp11* kodierten ABC-Transporter, die beiden Gene der putativen Membranproteine Smp11A und Smp11B und eventuell auch die Gene *kin11* und *reg11* zu regulieren schien, war von Interesse, inwiefern sich die Deletion der einzelnen, regulierten Gene auf die Aktivität des Zwei-Komponentensystems 11, gemessenen an der Aktivität des regulierten Promotors $P_{11.1}$, auswirkt (4.10.8). Im Fall des Zwei-Komponentensystems BceRS führt beispielsweise eine

Deletion der *bceAB*-Gene des ABC-Transporters zum kompletten Verlust der Aktivität des durch BceR regulierten Promotors von *bceAB* (Bernard et al., 2007). Das Substrat des ABC-Transporters BceAB scheint hier direkt den Stimulus für die Histidin-Kinase BceS darzustellen. Sollte der durch das Zweikomponentensystem 11 regulierte Promotor P_{11.1} in ähnlicher Weise auf Deletionen der von ihm aus transkribierten Gene reagieren, so könnte auch im Fall des Zweikomponentensystems 11 von einer Beteiligung des Substrats des ABC-Transporters Nbp11/Msp11, oder des ABC-Transporter-Komplexes selbst an der Stimulus-Perzeption der Histidin-Kinase Kin11 ausgegangen werden (4.10.8).

4.10.8 Effekte von Deletionen einzelner Gene und Bereiche des TCS11-Clusters

Die transkriptionelle Regulation der Gene des 11-1-Operons *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11* durch das Zweikomponentensystem 11 konnte im Zuge der genetischen Charakterisierung des TCS11-Clusters gezeigt werden (4.10.1 bis 4.10.7). Die physiologische Funktion des durch *nbp11* und *msp11* kodierten ABC-Transporters, sowie der beiden putativen Membranproteine Smp11A und Smp11B war jedoch weiterhin unbekannt. Durch die Deletion der einzelnen Gene im Wildtyp-Stamm R6 und der anschließenden phänotypischen Charakterisierung der resultierenden Deletionsmutanten sollten weitere Hinweise auf die Funktion des TCS11-Clusters erhalten werden. Die Erhöhung der Resistenz gegen Piperacillin in P406 infolge erhöhter Transkriptmengen des TCS11-Clusters konnte diesbezüglich auch als Hinweis auf eine Beteiligung des TCS11-Clusters am Aufbau oder der Instandhaltung von Strukturen der Zellhülle gewertet werden (4.6 bis 4.9).

Eine mögliche Beteiligung des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 oder von Smp11A und Smp11B an der Stimulus-Perzeption der Histidin-Kinase Kin11 sollte durch die Messung der Promotoraktivität von P_{11.1} in den entsprechenden Deletionsmutanten überprüft werden.

4.10.8.1 Herstellung der Deletionsmutanten

Die Deletion der Gene des TCS11-Clusters erfolgte, mit Ausnahme der Gene *reg11* und der bereits in 4.10.3 erwähnten *kin11reg11*-Deletion, durch die Herstellung von Minigenen unter der Verwendung der Janus-Kassette (3.11.3). Hierdurch sollten Effekte auf die Translation von downstream des jeweiligen zu deletierenden Gens liegenden Genen minimiert werden. Da downstream von *kin11* und *reg11* auf dem Transkript des 11-2-Operons keine Gene mehr kodiert waren, wurde *reg11* durch die Insertion einer Resistenzkassette gemäß 3.11.2 inaktiviert. Ebenso wurde im Fall der Doppeldeletion von *kin11* und *reg11* verfahren. In Abbildung 4.43 wurden alle hergestellten Deletionen im Bereich des TCS11-Clusters schematisch dargestellt. Zur Herstellung der entsprechenden Deletionen unter der Verwendung der Janus-Kassette wurden, wie unter 3.11.3 beschrieben, jeweils zwei Konstrukte (Konstrukt 1 und Konstrukt 2) hergestellt. Hierzu wurden die den zu deletierenden Bereich flankierenden up- bzw. downstream liegenden Abschnitte im Genom von Stamm R6 unter Verwendung der in Tabelle 4.10 aufgelisteten Primerpaare in einer PCR (iProof-Polymerase, 3.6) amplifiziert. Zusätzlich wurde die für Konstrukt 1 benötigte Janus-Kassette unter Verwendung der Primer *janus_f* und *janus_r* aus chromosomaler DNA des Stammes R6 Δ *spr0282* (McKessar et al., 2007) amplifiziert. Nach einer Restriktion mit *Bam*HI, bzw. *Apa*I wurden die zur Herstellung von Konstrukt 1 oder Konstrukt 2 benötigten, amplifizierten DNA-Fragmente ligiert, wobei das entsprechende Konstrukt entstand. Die beiden zur Einführung der entsprechenden Minigene in das Genom von Stamm R6 aufeinander folgenden Transformationen wurden wie unter 3.11.3 beschrieben durchgeführt. Als Ausgangsstamm zur ersten Transformation mit Konstrukt 1 diente jeweils der Streptomycin-

resistente Stamm R6*rpsL* (3.11.3). Von allen durchgeführten Transformationen wurde die Transformationseffizienz bestimmt (3.11). Alle hergestellten Deletionen wurden im Anschluß durch Kontroll-PCRs und Sequenzierung des betreffenden Bereichs überprüft. Die verifizierten Deletionsmutanten wurden danach mit den zur Messung der Aktivitäten der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} hergestellten Promotor-Probe-Plasmide pPP2 P_{11.1} und pPP2 P_{11.2} (4.10.3) transformiert und wie bereits unter 4.10.3 beschrieben selektioniert und überprüft. In den resultierenden Stämmen wurden schließlich die Aktivitäten der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} bestimmt (4.10.8.2.3).

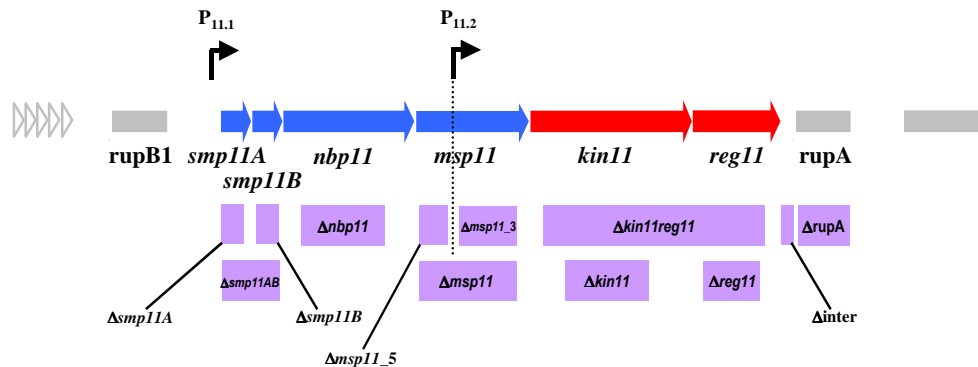


Abbildung 4.43: Schematische Übersicht hergestellter Deletionen im Bereich des TCS11-Clusters. Dargestellt wurden die Gene des TCS11-Clusters (blaue und rote Blockpfeile), nebst den deletierten Bereichen in den einzelnen, hergestellten Deletionsmutanten in Stamm R6 (Boxen mit Bezeichnung der Deletion).

Tabelle 4.10: Zur Herstellung der Konstrukte 1 und 2 bei der Herstellung von Minigenen unter Verwendung der Janus-Kassette eingesetzte Primerpaare und durch sie angehängte Schnittstellen.

| Deletion (Stamm-bezeichnung) | verwendete Primerpaare für Konstrukt 1 | angefügte Schnittstelle | verwendete Primerpaare für Konstrukt 2 | angefügte Schnittstelle ²⁾ |
|------------------------------|---|-------------------------|--|---------------------------------------|
| $\Delta smp11A$ | L18xx_for/dL18182Lrev ^{rs)} d1818Rfor ^{rs)} /d1818Rrev | BamHI ApaI | L18xx_for/dL18182Lrev ^{rs)} d18182Rfor ^{rs)} /d1818Rrev | BamHI BamHI |
| $\Delta smp11B$ | L18xx_for/308 ^{rs)} 309 ^{rs)} /RTP2r | BamHI ApaI | L18xx_for/308 ^{rs)} 310 ^{rs)} /RTP2r | BamHI BamHI |
| $\Delta smp11AB$ | L18xx_for/dL18182Lrev ^{rs)} d1818Rfor ^{rs)} /d1818Rrev | BamHI ApaI | L18xx_for/dL18182Lrev ^{rs)} 310 ^{rs)} /RTP2r | BamHI BamHI |
| $\Delta nbp11$ | L18forneu/d1817Lrev ^{rs)} d1817Rfor ^{rs)} /dTC11_rev | BamHI ApaI | L18for_neu/d1817Lrev ^{rs)} d18172Rfor ^{rs)} /dTC11_rev | BamHI BamHI |
| $\Delta msp11$ | 18506_for/305 ^{rs)} 306 ^{rs)} /rr11_rev | BamHI ApaI | 18506_for/305 ^{rs)} RNA3 ^{rs)} /rr11_rev | BamHI BamHI |
| $\Delta msp11_5$ | 18506_for/305 ^{rs)} 306 ^{rs)} /rr11_rev | BamHI ApaI | 18506_for/305 ^{rs)} 307 ^{rs)} /rr11_rev | BamHI BamHI |
| $\Delta msp11_3$ | 18506_for3/RNA1 ^{rs)} RNA2 ^{rs)} /rr11_rev | BamHI ApaI | 18506_for3/RNA1 ^{rs)} RNA3 ^{rs)} /rr11_rev | BamHI BamHI |
| $\Delta kin11$ | LTC11_for/dHKLrev ^{rs)} dHKR_for ^{rs)} /norupa | BamHI ApaI | LTC11_for/dHKLrev ^{rs)} dHK2Rfor ^{rs)} /norupa | BamHI BamHI |
| $\Delta inter$ | 1_for/303 ^{rs)} 302 ^{rs)} /R18_rev2 | BamHI ApaI | 1_for/303 ^{rs)} 304 ^{rs)} /R18_rev2 | BamHI BamHI |
| Δrup | 1_for/ma1 ^{rs)} ma2 ^{rs)} /R18xx_rev | BamHI ApaI | 1_for/ma1 ^{rs)} ma3 ^{rs)} /R18xx_rev | BamHI BamHI |

^{rs)} Primer, durch welche die entsprechenden Schnittstellen angefügt wurden.

Deletion von *smp11A*

Beide aufeinander folgenden Transformationen mit den Konstrukten 1 und 2 erbrachten eine Transformationseffizienz von 0,41 % bzw. 0,39 % der Lebendkeimzahl. Dies entsprach den für den Stamm R6 unter diesen Bedingungen zu erreichenden Werten (vgl. 4.1.2, Abbildung 4.2). Der so erhaltene Stamm wurde als $R6\Delta smp11A$ bezeichnet (Abbildung 4.43). Die Kodons in *smp11A* für die aa 16 bis 49 in Smp11A wurden hierdurch deletiert. Das resultierende Minigen umfasste die verbleibenden 15 Kodons für den N-Terminus von Smp11A, sowie die letzten 13 Kodons für den C-Terminus von Smp11A, nebst zwei durch die *Bam*HI-Schnittstelle eingefügten Kodons als In-frame-Fusion. Im resultierenden Fusionsprotein waren beide vorhergesagten Transmembrandomänen (4.2.7) deletiert. Durch eine Transformation mit pPP2 P_{11.1} bzw. pPP2 P_{11.2} (4.10.3) entstanden die zur Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} und P_{11.2} benötigten Stämme $R6\Delta smp11A$ P_{11.1} und $R6\Delta smp11A$ P_{11.2}.

Deletion von *smp11B*

Die In-frame-Deletion von *smp11B* unter Verwendung der Janus-Kassette wurde von Verena Keipert 2007 im Rahmen ihres Forschungspraktikums durchgeführt. Die Transformationseffizienzen beider Transformationen lagen bei ca. 0,3 %. Der hergestellte Stamm wurde als $R6\Delta smp11B$ bezeichnet (Abbildung 4.43). Das resultierende *smp11B*-Minigen beinhaltete lediglich die Kodons für die ersten 8 N-terminalen aa und die letzten 11 C-terminalen aa von Smp11B, nebst zwei durch die *Bam*HI-Schnittstelle eingefügte Kodons als In-frame-Deletion. Die Kodons für die aa 9 bis 52 wurden somit deletiert, womit auch beide vorhergesagten Transmembrandomänen (4.2.7) nicht mehr vorhanden waren. Durch eine Transformation mit pPP2 P_{11.1} bzw. pPP2 P_{11.2} (4.10.3) entstanden die zur Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} und P_{11.2} benötigten Stämme $R6\Delta smp11B$ P_{11.1} und $R6\Delta smp11B$ P_{11.2}.

Doppeldeletion von *smp11A* und *smp11B*

Die Gene *smp11A* und *smp11B* wurden 2007 von Verena Keipert im Rahmen ihres Forschungspraktikums gemeinsam unter Verwendung der Janus-Kassette deletiert. Die Transformationseffizienzen beider Transformationen lagen bei ca. 0,25 %. Der resultierende Stamm wurde $R6\Delta smp11AB$ genannt (Abbildung 4.43). In ihm waren lediglich die ersten 15 Kodons von *smp11A* und die letzten 11 Kodons von *smp11B*, nebst zwei durch die *Bam*HI-Schnittstelle eingefügte Kodons als Fusionsprotein noch vorhanden. Durch eine Transformation mit pPP2 P_{11.1} bzw. pPP2 P_{11.2} (4.10.3) entstanden die zur Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} und P_{11.2} benötigten Stämme $R6\Delta smp11AB$ P_{11.1} und $R6\Delta smp11AB$ P_{11.2}.

Deletion von *nbp11*

Beide aufeinander folgenden Transformationen mit den entsprechenden Konstrukten 1 und 2 erbrachten eine Transformationseffizienz von 0,35 % bzw. 0,51 % der Lebendkeimzahl. Dies entsprach den für den Stamm R6 unter diesen Bedingungen zu erreichenden Werten (vgl. 4.1.2, Abbildung 4.2). Die resultierende *nbp11*-Deletionsmutante wurde als $R6\Delta nbp11$ bezeichnet (Abbildung 4.43). Das hergestellte *nbp11*-Minigen beinhaltete lediglich die Kodons für die ersten 21 N-terminalen aa und die letzten 35 C-terminalen aa von Nbp11, nebst zwei durch die *Bam*HI-Schnittstelle eingefügte Kodons als In-frame-Deletion. Durch eine Transformation mit pPP2 P_{11.1} bzw. pPP2 P_{11.2} (4.10.3) entstanden die zur Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} und P_{11.2} benötigten Stämme $R6\Delta nbp11$ P_{11.1} und $R6\Delta nbp11$ P_{11.2}.

Deletion von *msp11*

Innerhalb des für Msp11 kodierenden Bereichs befindet sich der in den Abschnitten 4.10.2 und 4.10.3 beschriebene Transkriptionsstart des 11-2-Operons (P_{11.2}, 4.10.4; 4.10.7). Im Fall der durch *msp11* kodierten, putativen Permease wurden daher drei verschiedene Deletionsmutanten hergestellt, welche als R6Δ*msp11*, R6Δ*msp11_5* und R6Δ*msp11_3* bezeichnet wurden (Abbildung 4.43). In allen drei Fällen erbrachten beide aufeinander folgenden Transformationen mit den Konstrukten 1 und 2 eine dem für den Stamm R6 unter diesen Bedingungen zu erreichende Transformationseffizienz von 0,32 bis 0,52 % der Lebendkeimzahl (vgl. 4.1.2, Abbildung 4.2). In R6Δ*msp11* wurden die Kodons der aa 6 bis 229 aus Msp11 deletiert. Das hier konstruierte Minigen umfasste lediglich die Kodons der ersten 5 N-terminalen aa und der letzten 17 C-terminalen aa von Msp11 (Abbildung 4.43). Hierdurch wurde P_{11.2} ebenfalls deletiert. In R6Δ*msp11_5* wurden die Kodons 6 bis 69 der N-terminalen aa von Msp11, welche den größten Teil des 5'-Bereichs von *msp11* upstream von P_{11.2} ausmachen, deletiert. Der Transkriptionsstartpunkt des 11-2-Operons blieb somit unbeeinflusst (Abbildung 4.43). In R6Δ*msp11_3* wurden die Kodons der aa 148 bis 229 von Msp11 deletiert. Dies entsprach einem Großteil des untranslatierten 5'-Endes der von P_{11.2} ausgehenden mRNA. Der Transkriptionsstartpunkt des 11-2-Operons blieb auch hier erhalten (Abbildung 4.43). Durch diese drei unterschiedlichen Deletionen sollte die Ursache auftretender Effekte entweder der Inaktivierung von *msp11* (im Fall der Deletionsmutante R6Δ*msp11_5*), der Deletion der vermutlich untranslatierten 5'-Region der mRNA des 11-2-Operons (im Fall der Deletionsmutante R6Δ*msp11_3*; vgl. 4.10.4; 4.10.7) oder dem Verlust der Transkription, ausgehend von P_{11.2} (im Fall der Deletionsmutante R6Δ*msp11*) zugeordnet werden können. Durch eine Transformation mit pPP2 P_{11.1} bzw. pPP2 P_{11.2} (4.10.3) aller drei Deletionsmutanten entstanden die zur Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} und P_{11.2} benötigten Stämme R6Δ*msp11* P_{11.1}, R6Δ*msp11_5* P_{11.1}, und R6Δ*msp11_3* P_{11.1}, sowie die Stämme R6Δ*msp11* P_{11.2}, R6Δ*msp11_5* P_{11.2}, und R6Δ*msp11_3* P_{11.2}.

Deletion von *kin11*

Zur Deletion des *kin11*-Gens unter Verwendung der Janus-Kassette wurden zwei Konstrukte 1 und 2 laut 3.11.3 hergestellt. Beide aufeinander folgenden Transformationen mit den Konstrukten 1 und 2 erbrachten eine Transformationseffizienz von 0,47 % bzw. 0,31 % der Lebendkeimzahl. Die resultierende *kin11*-Deletionsmutante wurde als R6Δ*kin11* bezeichnet (Abbildung 4.43). Das *kin11*-Minigen beinhaltete die Kodons für die ersten 26 N-terminalen aa und die letzten 17 C-terminalen aa von Nbp11, nebst zwei durch die *Bam*HI-Schnittstelle eingefügte Kodons als In-frame-Deletion. Durch eine Transformation mit pPP2 P_{11.1} bzw. pPP2 P_{11.2} (4.10.3) entstanden die zur Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} und P_{11.2} benötigten Stämme R6Δ*kin11* P_{11.1} und R6Δ*kin11* P_{11.2}.

Deletion von *reg11*

Das für den Response-Regulator 11 kodierende Gen *reg11* wurde durch einen Austausch mit der *ermAM*-Kassette (3.11) deletiert. Hierzu wurde unter Verwendung der Primer dTC11_for und dR18_rev von chromosomaler DNA aus der von Throup et al., 2000 hergestellten *reg11*-Mutante *Streptococcus pneumoniae* R6-479rr ein 3921 bp Fragment, welches die *reg11*-Deletion trug, amplifiziert. Das Amplifikat wurde zur Transformation des Stamms R6 verwendet und entsprechende Transformanten auf D-Blutagarplatten mit 2 µg/ml Erythromycin selektioniert. Die Transformation erbrachte eine Transformationseffizienz von 0,71 % der Lebendkeimzahl. In der so hergestellten Mutante R6Δ*reg11* waren die Kodons für die aa 1 bis 183 durch die *ermAM*-Kassette ersetzt. Durch eine Transformation mit pPP2 P_{11.1} bzw. pPP2 P_{11.2} (4.10.3) entstanden die zur Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} und P_{11.2} benötigten Stämme R6Δ*reg11* P_{11.1} und R6Δ*reg11* P_{11.2}.

Doppeldeletion von *kin11* und *reg11*

Die gleichzeitige Deletion der Gene *kin11* und *reg11* in Stamm R6 wurde bereits unter 4.10.3 beschrieben. Die Herstellung der zur Bestimmung der Promotor-Aktivität von P_{11.1} und P_{11.2} benötigten Stämme R6Δ*kin11reg11* P_{11.1} und R6Δ*kin11reg11* P_{11.2} wurde ebenfalls bereits unter 4.10.3 beschrieben.

Deletion verschiedener Abschnitte des 3'-untranslatierten Bereichs der mRNA des 11-2-Operons

1. Deletion des *rupA*-Elements

In der vorliegenden Arbeit konnte die Kotranskription der downstream des *reg11*-Gens auf der mRNA des 11-2-Operons liegenden Kopie des in *Streptococcus pneumoniae* beschriebenen, repetitiven Elements *rupA* (Oggioni & Claverys, 1999) mit den Genen *kin11* und *reg11* gezeigt werden (4.10.4). Das *rupA*-Element zeigt, insbesondere zum aus *Neisseria* bekannten und dort oft mit Genen kotranskribierten NEMIS-Element (Mazzone et al., 2001) eine hohe Homologie. Für das NEMIS-Element konnte eine Beteiligung an der posttranskriptionellen Regulation durch die Ausbildung von Hairpin-Strukturen im 3'-untranslatierten Bereich entsprechender mRNAs gezeigt werden (Mazzone et al., 2001; deGregorio et al., 2002; deGregorio et al., 2003). Aufgrund der schon von Mazzone et al. (2001) festgestellten Homologie beider Elemente und aufgrund der Kotranskription von *rupA* mit *kin11* und *reg11* (4.10.4), sollte in der vorliegenden Arbeit durch eine Deletion dieser im 3'-untranslatierten Bereich des Transkriptes des 11-2-Operons liegenden Kopie von *rupA* (und anschließende Charakterisierung der resultierenden Mutante) festgestellt werden, inwiefern eine vergleichbare Aussage für das *rupA*-Element getroffen werden könnte. Die Deletion des *rupA*-Elements wurde von Markus Andre 2007 im Rahmen seines Forschungspraktikums durchgeführt. Zur Deletion von *rupA* wurde ein zur Integration der Janus-Kassette benötigtes Konstrukt 1 und ein zur Einbringung der Deletion und Excision der Janus-Kassette benötigtes Konstrukt 2 hergestellt (vgl. 3.11.3). Hierbei wurden die in Tabelle 4.10 aufgelisteten Primer eingesetzt. Beide aufeinander folgenden Transformationen mit den Konstrukten 1 und 2 erbrachten eine Transformationseffizienz von 0,6 % bzw. 0,55 % der Lebendkeimzahl. Die resultierende Deletionsmutante wurde mit R6Δ*rupA* bezeichnet (Abbildung 4.43). In ihr waren die ersten 100 Nukleotide des 107 Nukleotide umfassenden *rupA*-Elements deletiert (genomische Sequenz von Position 1784784 bis 1784883 in *Streptococcus pneumoniae* R6). Durch eine Transformation mit pPP2 P_{11.1} bzw. pPP2 P_{11.2} (4.10.3) entstanden die zur Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} und P_{11.2} benötigten Stämme R6Δ*rupA* P_{11.1} und R6Δ*rupA* P_{11.2}.

2. Deletion von 39nt downstream von *reg11*

Im Zuge eines Sequenzvergleichs der 3'-untranslatierten Region des 11-2-Operons mit der entsprechenden Region in verwandten Streptococcen konnte festgestellt werden, daß der auf dem Transkript des 11-2-Operons im 3'-untranslatierten Bereich direkt auf *reg11* folgende, 40 bp-lange Abschnitt der mRNA ähnlich gut konserviert war, wie die auf diesem Transkript vorhandenen Gene *kin11* und *reg11*. Um Festzustellen, ob diesem Abschnitt des Transkriptes des 11-2-Operons eine Funktion zukommt, wurden die direkt auf das *reg11*-Gen folgenden, 39nt unter Verwendung der Janus-Kassette deletiert (3.11.3). Beide aufeinander folgenden Transformationen mit den Konstrukten 1 und 2 erbrachten eine Transformationseffizienz von 0,38 % bzw. 0,49 % der Lebendkeimzahl. Die resultierende Deletionsmutante wurde als R6Δ*inter* bezeichnet (Abbildung 4.43). Die 39 deletierten Nukleotide entsprachen den Positionen 1784723 bis 1784761 der genomischen Sequenz von *Streptococcus pneumoniae* R6. Durch eine Transformation mit pPP2 P_{11.1} bzw. pPP2 P_{11.2} (4.10.3) entstanden die zur

Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ benötigten Stämme $R6\Delta_{inter} P_{11.1}$ und $R6\Delta_{inter} P_{11.2}$.

4.10.8.2 Charakterisierung der Deletionsmutanten des TCS11-Clusters

Die wie in 4.10.8.1 beschrieben, hergestellten Deletionsmutanten wurden im Folgenden phänotypisch charakterisiert. Hierdurch sollten Hinweise auf die physiologische Funktion des durch *nbp11* und *mcp11* kodierten ABC-Transporters, der durch *smp11A* und *smp11B* kodierten putativen Membranproteine, sowie des regulierenden Zweikomponentensystems 11 erhalten werden. Zusätzlich zur Charakterisierung des Wachstums- und Lyseverhaltens, sollten auch die Aktivitäten der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ in den einzelnen Deletionsmutanten bestimmt werden. Dies sollte dazu beitragen, mehr über die Interaktionen, sowie die funktionellen Zusammenhänge zwischen Zweikomponentensystem 11 und den durch dieses direkt regulierten Genen des 11-1-Operons *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *mcp11* in Erfahrung zu bringen. Zudem sollte hierdurch der vom Zweikomponentensystem 11 nicht direkt abhängige, regulatorische Mechanismus an Promotor $P_{11.2}$ näher charakterisiert werden.

4.10.8.2.1 Wachstumsverhalten und Zellmorphologie

Kulturen der wie unter 4.10.8.1 beschrieben hergestellten Deletionsmutanten wurden zusammen mit Kulturen des Referenzstammes R6 wie unter 3.1.2 beschrieben in CpH8-Medium angezogen und deren Wachstum gemäß 3.1.1 dokumentiert. Die Wachstumsexperimente wurden dreifach durchgeführt.

Wachstumsverhalten von $R6\Delta_{smp11A}$, $R6\Delta_{smp11B}$ und $R6\Delta_{smp11AB}$

In Abbildung 4.44 wurden die Wachstumskurven von R6, $R6\Delta_{smp11A}$, $R6\Delta_{smp11B}$ und $R6\Delta_{smp11AB}$ dargestellt.

Sowohl die Deletion von *smp11B*, als auch die Doppeldeletion von *smp11A* und *smp11B* zeigte keinen Effekt auf die Generationszeit. Dahingegen zeigte die Deletion von *smp11A* generell einen dramatischen Effekt. In Tabelle 4.11 wurden die laut 3.1.1 berechneten Generationszeiten g und Wachstumsraten μ für diese drei Deletionsmutanten im Vergleich zu Stamm R6 aufgelistet.

Beim Vergleich der Generationszeiten wurde deutlich, daß die Generationszeit von $R6\Delta_{smp11A}$ mit 56min weitaus länger war, als im Fall von R6 oder den Deletionsmutanten $R6\Delta_{smp11B}$ und $R6\Delta_{smp11AB}$, welche Generationszeiten von 36 min, bzw. 38 min aufwiesen.

Anscheinend stand dieser Wachstumsdefekt im Fall von $R6\Delta_{smp11A}$ mit einem normalerweise vorherrschenden quantitativen Gleichgewicht der putativen Membranproteine Smp11A und Smp11B in Zusammenhang, denn im Fall der Doppeldeletion $R6\Delta_{smp11AB}$ wurde dieser Effekt wieder aufgehoben. Da der Effekt nur im Fall einer Deletion von *smp11A* auftrat, wurde zudem vermutet, daß die Funktionen von Smp11A und Smp11B nicht identisch sein konnten. Dies zeigte sich zudem in der wie in Abbildung 4.44 dargestellten, geringeren, maximal erreichbaren Zelldichte in der stationären Phase der Deletionsmutante $R6\Delta_{smp11A}$. Ein Unterschied aller drei Deletionsmutanten im Vergleich zum Parentalstamm R6 war eine veränderte Lyse im Anschluß an die stationäre Phase (Abbildung 4.44). Alle drei Deletionsmutanten zeigten eine verlangsamte Lyse. Lysephänotypen dieser Art könnten theoretisch zwar in vielen verschiedenen, unter anderem am Aufbau der Zellhülle beteiligten Prozessen und Funktionen begründet sein, jedoch waren das Wachstums- und Lyseverhalten der drei Deletionsmutanten derer der Deletionsmutante $R6\Delta_{cpoA}$ oder der Mutante P106 (Abbildung 4.10 in 4.3.3.1) sehr ähnlich. Dies war ein erster Hinweis auf die unter 4.10.9 und

4.10.10 beschriebenen Gemeinsamkeiten von Effekten, welche sowohl durch eine Deletion von *cpoA* (4.3.3), als auch durch eine Deletion einzelner Gene und Bereiche des TCS11-Clusters hervorgerufen wurden. Durch die Bestimmung der Aktivitäten der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ in den Deletionsmutanten $R6\Delta smp11A$, $R6\Delta smp11B$ und $R6\Delta smp11AB$ (4.10.8.2.3) sollte überprüft werden, inwiefern sich diese Deletionen auf die Aktivität des Zweikomponentensystems 11 einerseits, und den unbekanntem regulatorischen Mechanismus an $P_{11.2}$ andererseits, auswirken. Auf diese Weise sollte eine eventuelle Beteiligung von *Smp11A* oder *Smp11B* an der Stimulus-Perzeption der Histidin-Kinase Kin11, ähnlich wie im Fall des BceABRS-Systems (Bernard et al., 2007; 4.10.7) überprüft werden.

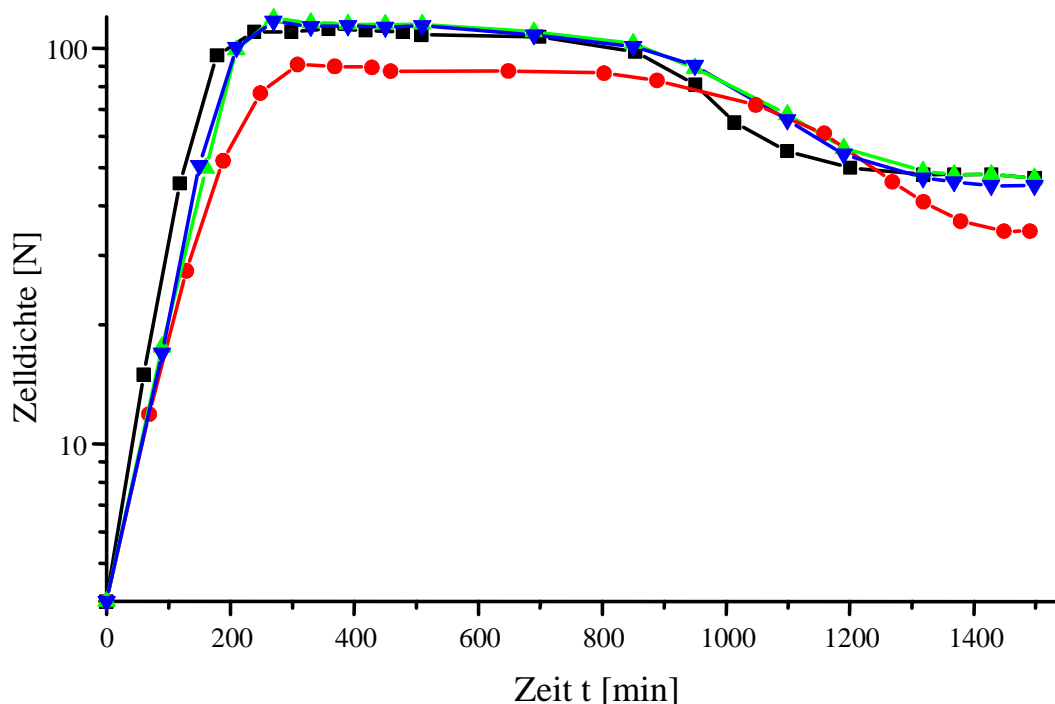


Abbildung 4.44: Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten $R6\Delta smp11A$, $R6\Delta smp11B$ und $R6\Delta smp11AB$ im Vergleich zu Stamm R6: Aufgetragen wurde die Zelldichte in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min], wobei die Wachstumskurven der einzelnen Stämme auf eine Zelldichte von $N=4$ bei $t=0$ normalisiert wurden. Das Wachstum wurde bis zur Lyse in CpH8-Medium verfolgt. Die Kurven stellen ein Beispiel aus drei Experimenten dar. ■ R6; ● $R6\Delta smp11A$; ▲ $R6\Delta smp11B$; ▼ $R6\Delta smp11AB$.

Tabelle 4.11: Generationszeiten und Wachstumsraten von $R6\Delta smp11A$, $R6\Delta smp11B$ und $R6\Delta smp11AB$

| Stamm | Wachstumsrate μ [min^{-1}] | Generationszeit g [min] ¹⁾ |
|--------------------|---|---|
| R6 | 0,0191 | 36 |
| $R6\Delta smp11A$ | 0,0122 | 56 |
| $R6\Delta smp11B$ | 0,0180 | 38 |
| $R6\Delta smp11AB$ | 0,0181 | 38 |

¹⁾ gerundet

Wachstumsverhalten von $R6\Delta nbp11$, $R6\Delta msp11$, $R6\Delta msp11_5$ und $R6\Delta msp11_3$

Wie in Abbildung 4.45 zu ersehen, hatte sowohl die Deletion des für eine ATPase kodierenden Gens *nbp11*, als auch die Deletion verschiedener Bereiche des für eine Permease kodierenden Gens *msp11* eine wie schon im Fall der Deletionsmutante $R6\Delta smp11A$ beobachtete Erhöhung der Generationszeit g zur Folge. In Tabelle 4.12 wurden die laut 3.1.1 berechneten Generationszeiten g und Wachstumsraten μ für diese Deletionsmutanten im Vergleich zu Stamm R6 aufgelistet.

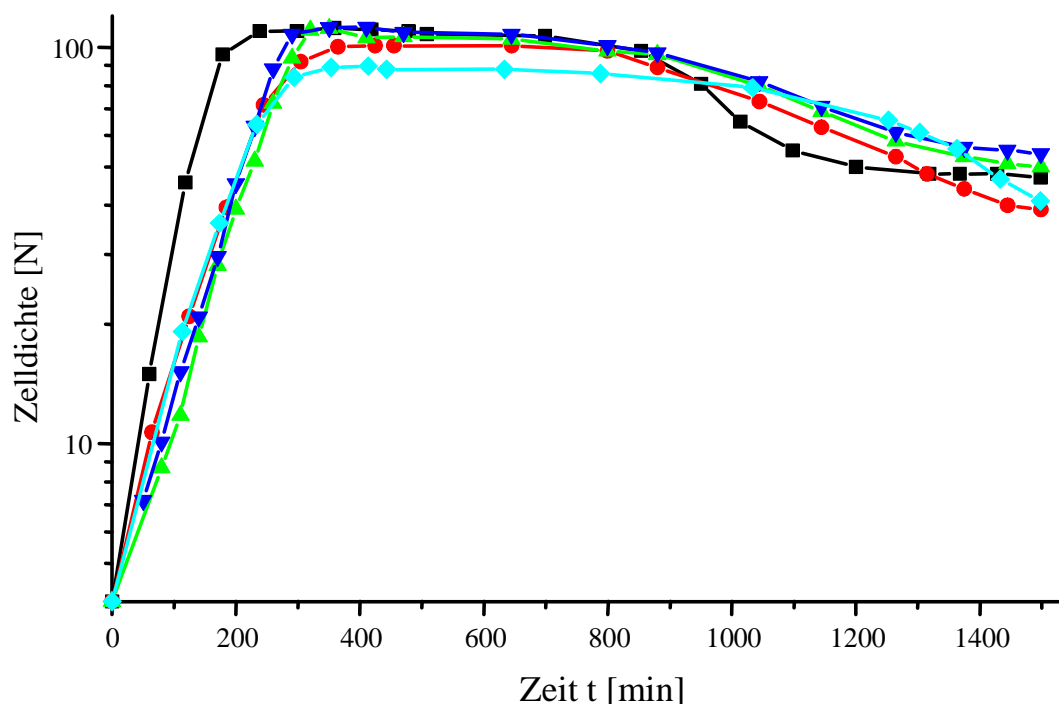


Abbildung 4.45: Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten $R6\Delta nbp11$, $R6\Delta msp11$, $R6\Delta msp11_5$ und $R6\Delta msp11_3$ im Vergleich zu Stamm R6: Aufgetragen wurde die Zelldichte in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min], wobei die Wachstumskurven der einzelnen Stämme auf eine Zelldichte von $N=4$ bei $t=0$ normalisiert wurden. Das Wachstum wurde bis zur Lyse in CpH8-Medium verfolgt. Die Kurven stellen ein Beispiel aus drei Experimenten dar. ■ R6; ● $R6\Delta nbp11$; ▲ $R6\Delta msp11$; ▼ $R6\Delta msp11_5$; ◆ $R6\Delta msp11_3$.

Tabelle 4.12: Generationszeiten und Wachstumsraten von $R6\Delta nbp11$, $R6\Delta msp11$, $R6\Delta msp11_5$ und $R6\Delta msp11_3$

| Stamm | Wachstumsrate μ [min^{-1}] | Generationszeit g [min] ¹⁾ |
|--------------------|---|---|
| R6 | 0,0191 | 36 |
| $R6\Delta nbp11$ | 0,0120 | 58 |
| $R6\Delta msp11$ | 0,0120 | 58 |
| $R6\Delta msp11_5$ | 0,0120 | 58 |
| $R6\Delta msp11_3$ | 0,0121 | 58 |

¹⁾ gerundet

Alle vier Deletionsmutanten zeigen, mit Generationszeiten von ca. 58 min im Vergleich zu Stamm R6 mit 36min einen erheblichen Wachstumsdefekt.

$R6\Delta msp11_3$, in welchem der Bereich von *msp11* deletiert wurde, welcher zugleich dem untranslatierten, 441 Nukleotide umfassenden Leader des Transkripts des 11-2-Operons entsprach (4.10.4; 4.10.7), zeichnete sich zudem, ähnlich wie bereits $R6\Delta smp11A$ durch eine geringere, maximal erreichbare Zelldichte in der stationären Phase aus ($N=90$ in Abbildung 4.45). Dieser Effekt im Fall von $R6\Delta msp11_3$ schien nicht auf eine Inaktivierung von *msp11* zurückzuführen zu sein. Vielmehr schien dieser Effekt mit der Deletion der untranslatierten Leadersequenz des Transkripts des 11-2-Operons in Zusammenhang zu stehen, da eine Inaktivierung von *msp11*, wie im Fall der Deletionsmutante $R6\Delta msp11_5$ keinen vergleichbaren Effekt auf die maximale Zelldichte zu haben schien. Zwar war in Deletionsmutante $R6\Delta msp11$ ebenfalls diese Leadersequenz deletiert, jedoch auch der innerhalb von *msp11* liegende Promotor $P_{11.2}$ (Abbildung 4.43 in 4.10.8.1), von welchem aus das 11-2-Operon transkribiert wurde. Der 441nt langen Leadersequenz des Transkripts des

11-2-Operons schien folglich, wie vermutet, eine noch unbekannte regulatorische Funktion zuzukommen. Eine Analyse der Aktivitäten der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ in diesen Deletionsmutanten sollte auch hierzu nähere Hinweise geben (4.10.8.2.3). Alle vier Deletionsmutanten zeigten die bereits im Fall der Deletion der Gene *smp11A* und *smp11B* (Abbildung 4.44) beobachtete, verlangsamte Lyse am Ende der stationären Phase (Abbildung 4.45). Anscheinend führten alle Deletionen der durch das Zweikomponentensystem 11 regulierten Gene des 11-1-Operons (*smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11*) zu diesem Phänotyp. Wiederum drängte sich hier der Vergleich mit dem Wachstumsverhalten der Deletionsmutante $R6\Delta cpoA$ auf (4.3.3). Eventuell waren CpoA und das TCS11-Cluster an eng miteinander verknüpften Funktionen, oder gar dem gleichen Biosyntheseweg beteiligt.

Für CpoA wurde eine Beteiligung an der Synthese der Lipoteichonsäuren vermutet (vgl. 1.2; 1.4; 4.3.3 und 4.3.4). Die am Ende der stationären Phase auftretende Autolyse in *Streptococcus pneumoniae* wird hauptsächlich durch die Amidase LytA vermittelt (1.1), wobei intakte Teichonsäuren hierbei für die Aktivierung des Cholinbindepoteins LytA eine entscheidende Rolle spielen (1.4; Tomasz & Westphal, 1971; Höltje & Tomasz, 1975; Giudicelli & Tomasz, 1984; Briese & Hakenbeck, 1985; Garcia et al., 1986). β -Lactame wie Penicillin oder Piperacillin, sowie Detergenzien triggern in *S. pneumoniae* den Mechanismus der Autolyse (1.1). Defekte der Autolyse führen in *S. pneumoniae* zum Phänomen der Penicillin-Toleranz und im Zusammenspiel mit einer noch unbekanntenen Funktion zur Resistenz gegen Penicillin (Cid-Phänotyp; 1.2). Das im Vergleich zu $R6\Delta cpoA$ ähnliche Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten des 11-1-Operons (Generationszeit und Lyse), sowie die vom TCS11-Cluster abhängigen Effekte auf die Piperacillin-Resistenz und die erhöhten Transkriptmengen des an der Teichonsäurebiosynthese beteiligten *lic1*-Operons in Mutante P406 (4.2.3; 4.8), könnten auf einen durch das TCS11-Cluster vermittelten Resistenzmechanismus, ähnlich wie im Fall des bislang ungeklärten Cid-Phänotyps hinweisen.

Um festzustellen, inwiefern die Fähigkeit zur Autolyse in den Deletionsmutanten der Gene des 11-1-Operons beeinträchtigt war, wurde die Autolyse in diesen Mutanten durch eine Induktion mittels Triton-X-100 (1.1) im Vergleich zum Parentalstamm R6 genauer untersucht (4.10.8.2.2).

Wachstumsverhalten von $R6\Delta kin11$, $R6\Delta reg11$, $R6\Delta kin11reg11$, $R6\Delta inter$ und $R6\Delta rupA$

In Abbildung 4.46 wurden die Wachstumskurven der Deletionsmutanten $R6\Delta kin11$, $R6\Delta reg11$, $R6\Delta kin11reg11$, $R6\Delta inter$ und $R6\Delta rupA$ dargestellt. Die Wachstumsraten und Generationszeiten g der Deletionsmutanten wurden in Tabelle 4.13 zusammengestellt. Im Fall von $R6\Delta kin11$ konnte, wie schon im Fall der Deletionen der Gene des 11-1-Operons, eine erhebliche Verlängerung der Generationszeit beobachtet werden (rote Kurve in Abbildung 4.46).

$R6\Delta kin11$ besaß eine Generationszeit von 78min, was einer mehr als zweifach größeren Zeitspanne zur Verdopplung der Population im Vergleich zum Parentalstamm R6 entsprach. Wie im Fall von $R6\Delta smp11A$ und $R6\Delta msp11_3$, zeichnete sich $R6\Delta kin11$ durch eine reduzierte, maximal erreichbare Zelldichte in der stationären Phase aus ($N=75$ in Abbildung 4.46) und zeigte, wie bereits die Deletionsmutanten der Gene des 11-1-Operons, eine verlangsamte Lyse am Ende der stationären Phase. Sowohl die Deletion beider Gene des Zweikomponentensystems 11 ($R6\Delta kin11reg11$), als auch von *reg11* alleine hatten jedoch keinen Einfluß auf die Generationszeiten (Abbildung 4.4.6 und Tabelle 4.13). Beide Deletionsmutanten zeigten im Vergleich zu R6 unwesentlich veränderte Generationszeiten.

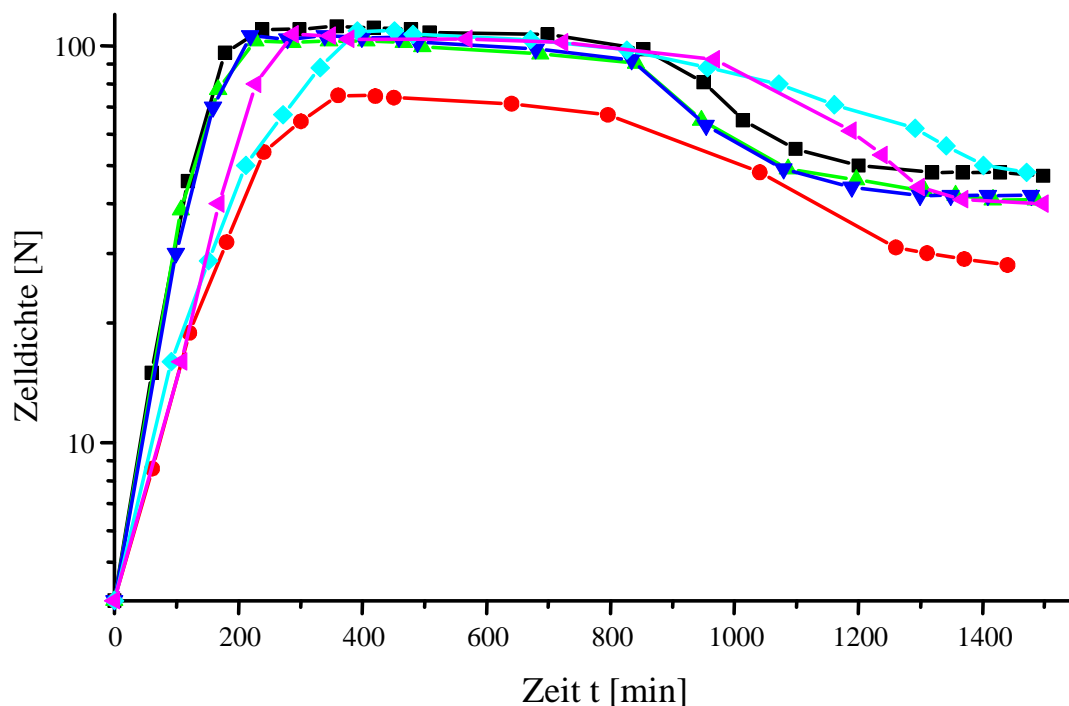


Abbildung 4.46: Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten *R6Δkin11*, *R6Δreg11*, *R6Δkin11reg11*, *R6Δinter* und *R6Δrup* im Vergleich zu Stamm R6: Aufgetragen wurde die Zellichte in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min], wobei die Wachstumskurven der einzelnen Stämme auf eine Zellichte von $N=4$ bei $t=0$ normalisiert wurden. Das Wachstum wurde bis zur Lyse in CpH8-Medium verfolgt. Die Kurven stellen ein Beispiel aus drei Experimenten dar. ■ R6; ● *R6Δkin11*; ▲ *R6Δreg11*; ▼ *R6Δkin11reg11*; ■ *R6Δinter*; ► *R6Δrup*.

Die Lyse war derer von R6 vergleichbar, schien zudem etwas früher einzusetzen. Für die Doppeldeletion der Gene *kin11* und *reg11*, sowie für deren Einzeldelationen war jedoch ein ähnlicher Phänotyp erwartet worden. Aufgrund der nachgewiesenen, positiven, direkten Regulation der Gene des 11-1-Operons durch das Zweikomponentensystem 11 (4.10.5 bis 4.10.7) sollte, vorausgesetzt das 11-1-Operon war (wie gefolgert) das einzige, direkt regulierte Operon und vorausgesetzt, es fand auch kein Cross-Talk von Kin11 mit anderen Response-Regulatoren statt und Kin11 hat keine weitere Funktion, so sollte kein Unterschied zwischen einer Doppeldeletion oder der separaten Deletion von *kin11* und *reg11* zu beobachten sein. In allen drei Fällen sollte die entsprechende Deletion zu einem Verlust der Aktivität des durch das Zweikomponentensystem 11 regulierten Promotors $P_{11.1}$ führen und die Transkription der Gene des 11-1-Operons ausbleiben. Nun zeigte jedoch *R6Δkin11* einen den Deletionsmutanten der Gene des 11-1-Operons vergleichbaren Phänotyp, wohingegen in *R6Δkin11reg11* und *R6Δreg11* kein definierter Phänotyp beobachtet werden konnte (Abbildung 4.46). Eine Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ in diesen Deletionsmutanten sollte zur Aufklärung des Sachverhalts beitragen (4.10.8.2.3).

Überraschenderweise hatte die Deletion der direkt downstream von *reg11* folgenden 39 nt der 3'-untranslatierten Region des Transkriptes des 11-2-Operons einen ähnlichen Phänotyp, wie die Einzeldelationen der Gene des 11-1-Operons oder von *kin11* (Abbildung 4.46). Auch in *R6Δinter* konnte mit 72 min eine erheblich längere Generationszeit (Tabelle 4.13) und eine langsamere Lyse im Vergleich zu R6 beobachtet werden. Eventuell könnte dies ein Hinweis auf eine unbekannte regulatorische Funktion des 3'-untranslatierten Bereichs des Transkriptes des 11-2-Operons sein, welche die mRNA-Stabilität oder die Translation der auf ihr kodierten Gene *kin11* oder *reg11* beeinflussen könnte. Solche, die Initiation der Translation

beeinflussenden Effekte von 3'-untranslatierten Bereichen der mRNA sind jedoch nur aus Eukaryonten beschrieben (Preiss & Hentze, 1999; Sachs & Varani, 2000).

Tabelle 4.13: Generationszeiten und Wachstumsraten von R6 Δ kin11, R6 Δ reg11, R6 Δ kin11reg11, R6 Δ inter und R6 Δ rupA

| Stamm | Wachstumsrate μ [min ⁻¹] | Generationszeit g [min] ¹⁾ |
|------------------------|--|---------------------------------------|
| R6 | 0,0191 | 36 |
| R6 Δ kin11 | 0,0088 | 78 |
| R6 Δ reg11 | 0,0200 | 34 |
| R6 Δ kin11reg11 | 0,0190 | 36 |
| R6 Δ inter | 0,0095 | 72 |
| R6 Δ rupA | 0,0152 | 46 |

¹⁾ gerundet

Auch im Fall von R6 Δ inter sollte durch die Messung der Aktivitäten der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} überprüft werden, inwiefern sich diese Deletion auf die Transkription des 11-1- und des 11-2-Operons auswirkt (4.10.8.2.3).

Die Deletion der Kopie des im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA des 11-2-Operons liegenden rupA-Elements resultierte ebenfalls in einer Verlängerung der Generationszeit und einer verlangsamt Lyse in der spätstationären Phase (Abbildung 4.46; Tabelle 4.13). Für R6 Δ rupA konnte eine Generationszeit von 46min im Vergleich zu 36min im Fall von R6 berechnet werden. Dies konnte eventuell ein Hinweis auf einen, wie im Falle der homologen NEMIS-Elemente in *Neisseria* beschriebenen Einfluß des rupA-Elements auf die Stabilität der mRNA sein (4.10.4; 4.10.8.1). Zur näheren Charakterisierung dieses Effektes sollten auch in dieser Deletionsmutante die Aktivitäten der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} überprüft werden (4.10.8.2.3). Zusätzlich sollte die Menge des Transkriptes des 11-2-Operons mit Hilfe einer wie unter 3.8 beschriebenen Real-Time PCR in R6 Δ rupA und R6 quantifiziert werden (4.10.8.2.4). Bei gleichzeitiger Kenntnis der Promotor-Aktivitäten und der Transkriptmengen sollte eine klare Aussage zum Einfluß von rupA auf die mRNA-Stabilität in diesem Fall zu treffen sein. Im Zuge dieser Untersuchung wurde die Menge des Transkriptes des 11-2-Operons in der Deletionsmutante R6 Δ msp11_3 und R6 Δ inter ebenfalls quantifiziert. Die oben beschriebenen, beobachteten, phänotypischen Effekte, sowie die gemessenen Promotor-Aktivitäten (4.10.8.2.3) konnten so besser bewertet werden.

Keine der hergestellten Deletionsmutanten zeigte bei einer mikroskopischen Untersuchung Veränderungen der Form und Morphologie der von *Streptococcus pneumoniae* R6 bekannten Art. Es konnten Diplokokken, vereinzelt auftretenden Monokokken und kurzen Zellketten beobachtet werden.

4.10.8.2.2 Induzierte Autolyse

Bei der Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Deletionsmutanten aus dem Bereich des TCS11-Clusters (4.10.8.2.1) zeigte sich, daß alle Deletionen der durch das Zweikomponentensystem 11 regulierten Gene des 11-1-Operons (*smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11*) generell eine Verlängerung der Generationszeit und eine langsamere, spätstationäre Lyse zur Folge hatten (Abbildungen 4.43 bis 4.45; Tabellen 4.11 bis 4.13). Ein vergleichbarer Phänotyp wurde bereits im Fall der *cpoA*-Deletionsmutante (4.3.3) beobachtet, wobei aufgrund der dort beschriebenen Effekte eine Beteiligung von CpoA an der Synthese des Lipidankers der Lipoteichonäuren vermutet wurde. Ein ähnlicher Phänotyp konnte auch durch die Deletion von *kin11*, sowie zweier weiterer, auf dem 3'-untranslatierten Bereich des Transkriptes des 11-2-Operons liegenden Abschnitte (*rupA* und 39 nt downstream von *reg11*)

hervorgerufen werden. Dieser Phänotyp könnte auf einen Defekt des für die spätstationäre Lyse verantwortlichen Mechanismus der LytA-vermittelten Autolyse (1.1; 4.10.8.2.1) und somit eventuell auf einen Defekt in den Teichonsäuren (1.4; 1.2), deuten. Zudem lysiert Mutante P406 langsamer (Abbildung 4.1 in 4.1.1) und ist resistenter gegen Piperacillin. Die Ursache hierfür waren die erhöhten Transkriptmengen des TCS11-Clusters. Erhöhte Transkriptmengen des TCS11-Clusters könnten zu einem Defekt in der LytA-abhängigen Lyse und somit zu der beobachteten langsameren Lyse, sowie zur höheren Resistenz gegen Piperacillin in P406 führen. Ähnliche Lyse-abhängige Effekte auf die Toleranz oder Resistenz gegen β -Lactame wurden bereits beschrieben (1.2). Detergentien wie Deoxycholat oder Triton-X-100 sind wie Piperacillin oder Penicillin in der Lage, diesen LytA-abhängigen Lysemechanismus zu induzieren.

Von den oben genannten Deletionsmutanten sollte nunmehr untersucht werden, inwiefern sich die Autolyse unter kontrollierten Bedingungen von der im Parentalstamm R6 unterscheidet. Hierzu wurden neben den Deletionsmutanten, in welchen der beobachtete Phänotyp am deutlichsten hervortrat, auch die Deletionsmutanten $R6\Delta smp11AB$, $R6\Delta nbp11$, $R6\Delta reg11$ und $R6\Delta kin11reg11$ verwendet. Die Autolyse wurde durch die Zugabe des nichtionischen Detergenzes Triton-X-100 zu einer Endkonzentration von 0,01 % (v/v) bei wie in 3.1.2 beschrieben in CpH8-Medium angezogenen Zellen der zu untersuchenden Stämme, nach Erreichen einer Zelldichte von $N=50$ induziert und die Lyse durch Messung der optischen Dichte verfolgt (3.1.1). Sollte sich bei diesen Untersuchungen ein Einfluß des TCS11-Clusters auf die LytA-vermittelte Autolyse zeigen, so wäre dies zudem ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung des TCS11-Clusters bei der Synthese oder der Instandhaltung der Zellhülle. In Abbildung 4.46 wurden die erzeugten Lysekurven der untersuchten Deletionsmutanten dargestellt.

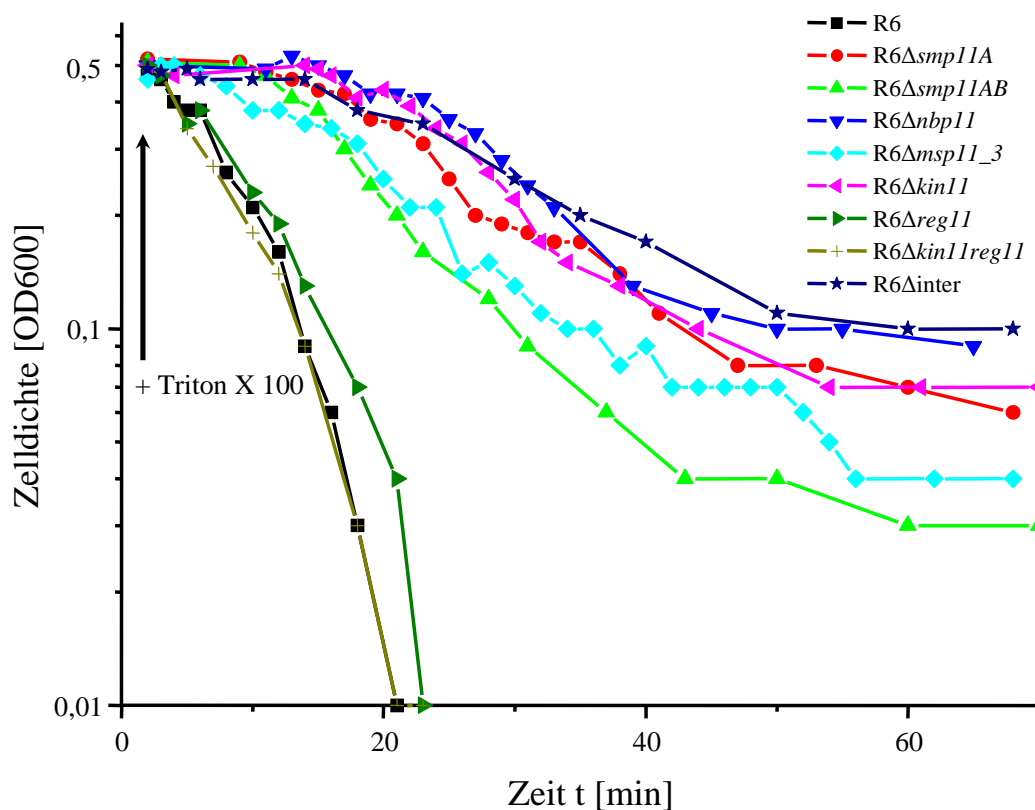


Abbildung 4.46: Triton-induzierte Autolyse der Deletionsmutanten $R6\Delta smp11A$, $R6\Delta smp11AB$, $R6\Delta nbp11$, $R6\Delta msp11_3$, $R6\Delta kin11$, $R6\Delta reg11$ und $R6\Delta inter$ im Vergleich zu Stamm R6: Aufgetragen wurde die Zelldichte [OD600] als Funktion der Zeit t [min] ab dem Zeitpunkt der Zugabe von Triton-X-100 (Endkonzentration 0,01%) bei Erreichen einer Zelldichte von $N=50$ in CpH8-Medium. Die Lyse wurde bis zum Erreichen einer stationären Phase durch Messung der optischen Dichte bei 600nm verfolgt. Pfeil: Zugabe von Triton-X-100. Die Kurven stellen ein Beispiel aus zwei Experimenten dar.

Wie aus Abbildung 4.46 zu ersehen, konnten die bei der Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Deletionsmutanten des TCS11-Cluster gemachten Beobachtungen durch die Induktion der Autolyse mittels Triton-X-100 bestätigt werden.

Alle untersuchten Deletionsmutanten, mit Ausnahme von *R6 Δ kin11reg11* und *R6 Δ reg11* lysierten im Vergleich zum Parentalstamm R6 erheblich langsamer in Anwesenheit von 0,01 % Triton-X-100. In den Kulturen von *R6 Δ kin11reg11* und *R6 Δ reg11* hingegen konnte, wie auch im Fall von R6, 25 min nach Induktion bereits keine Trübung des Mediums mehr festgestellt werden (OD600 von 0,0). Diese drei Stämme waren folglich bereits vollständig lysiert. Alle anderen eingesetzten Mutanten lysierten hingegen auch nach einer Inkubation von 70 min nicht weiter als bis zu einer OD600 von 0,03 bis 0,12. Um festzustellen, wieviele lebensfähige Keime sich noch in den Suspensionen befanden, wurde weitere 110 min inkubiert, im Anschluß Verdünnungsreihen jedes Stammes auf D-Blutagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Auszählung der Platten ergab, daß in 1 ml der Kultur von Stamm R6, bzw. des Stammes *R6 Δ reg11* noch 30 bzw. 20 lebensfähige Keime vorhanden waren. Dahingegen waren in den Lyse-defizienten Deletionsmutanten in 1 ml Kultur durchweg mehr als 1500 lebensfähige Keime zählbar (Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14: Lebendkeimzahl verschiedener Deletionsmutanten des TCS11-Clusters nach 3-stündiger Inkubation mit Triton-X-100

| Stamm | Lebendkeimzahl [cfu/ml] |
|-------------------------------------|-------------------------|
| R6 | 30 |
| <i>R6Δreg11</i> | 20 |
| <i>R6Δsmp11A</i> | 1900 |
| <i>R6Δsmp11AB</i> | 1510 |
| <i>R6Δnbp11</i> | 2110 |
| <i>R6Δmsp11_3</i> | 1630 |
| <i>R6Δkin11</i> | 1850 |
| <i>R6Δinter</i> | 2320 |

Somit konnte klar gezeigt werden, daß eine Störung der Funktion des TCS11-Clusters durch die Deletion einzelner Gene und Bereiche einen signifikanten Einfluß auf die LytA-vermittelte Autolyse hatte. Der ausbleibende Effekt im Fall von *R6 Δ reg11* und *R6 Δ kin11reg11* könnte mit einer ausbleibenden Transkription der Gene des 11-1-Operons erklärt werden. Jedoch zeigte der Lysedefekt von *R6 Δ kin11*, daß der Einfluß auf die Autolyse, ähnlich wie die Unterschiede des Wachstums der drei Deletionsmutanten *R6 Δ kin11*, *R6 Δ reg11* und *R6 Δ kin11reg11* (4.10.8.2.1), nicht nur von der Transkription der Gene des 11-1-Operons abhängig sein konnte.

Vor dem Hintergrund, daß mit erhöhter Transkription des TCS11-Clusters auch die Transkriptmenge des an der Teichonsäurebiosynthese beteiligten *lic1*-Operons steigt (Mutante P406, 4.2.3; 4.8) und der beobachtete Phänotyp der Deletionsmutanten des TCS11-Clusters dem der *cpoA*-Deletionsmutante (4.3.3) vergleichbar war, konnte dies als ein Hinweis auf die physiologische Funktion des TCS11-Clusters gedeutet werden. Da LytA als ein Cholinbindeprotein zur Entfaltung seiner Aktivität strukturell intakte, mit Phosphocholin verbundene Teichonsäuren benötigt, könnte die verlangsamte Autolyse im Fall der untersuchten Stämme, in denen einzelne Gene des TCS11-Clusters deletiert wurden, auf eine veränderte Synthese der Teichonsäuren zurückzuführen sein. Diesbezüglich sollte der Effekt der Deletionen verschiedener Gene des TCS11-Clusters auf die Transkription des *lic1*-Operons durch die Messung der Aktivität der Promotoren des *lic1*-Operons in den hergestellten Deletionsmutanten untersucht werden (4.11).

4.10.8.2.3 Aktivitäten der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2}

Durch die Bestimmung der Aktivität der beiden im TCS11-Cluster vorhandenen Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} in den entsprechenden Mutanten sollte ein tieferer Einblick in das Zusammenwirken der einzelnen, durch die Gene im 11-1- und 11-2-Operon des TCS11-Clusters kodierten Proteine und deren Regulation durch das Zweikomponentensystem 11 gewonnen werden. Von besonderem Interesse waren hierbei der unbekannte regulatorische Mechanismus an P_{11.2}, die mögliche Beteiligung der putativen Membranproteine Smp11A und Smp11B an der Stimulus-Perzeption der Histidin-Kinase Kin11, der Effekt der Deletion der Leadersequenz des Transkripts des 11-2-Operons, die Diskrepanz der Phänotypen einer *kin11*-, *reg11*- und einer *kin11reg11*-Deletion und die Effekte der Deletionen von verschiedenen Bereichen der 3'-untranslatierten Region des Transkripts des 11-2-Operons. Die Durchführung der β -Galactosidase-Assays zur Bestimmung der Aktivitäten der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} wurde wie in 3.13.2 beschrieben durchgeführt.

Effekte auf P_{11.1}

In Abbildung 4.47 wurden die so bestimmten, aus den Messwerten aus zwei Experimenten gemittelten Aktivitäten des Promotors P_{11.1} in den Stämmen R6, R6 Δ *smp11A*, R6 Δ *smp11B*, R6 Δ *smp11AB*, R6 Δ *nbp11*, R6 Δ *msp11*, R6 Δ *msp11_5*, R6 Δ *msp11_3*, R6 Δ *kin11*, R6 Δ *reg11*, R6 Δ *kin11reg11*, R6 Δ *inter* und R6 Δ *rupA* graphisch dargestellt.

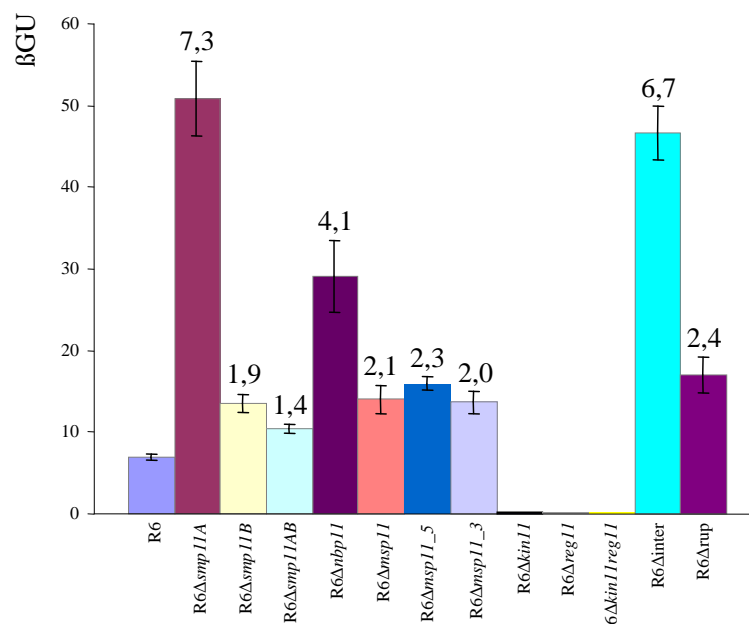


Abbildung 4.47: Graphische Darstellung der Aktivitäten des Promotors P_{11.1} in verschiedenen Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters. Dargestellt wurden die aus zwei Experimenten gemittelten Aktivitäten des Promotors P_{11.1} in β -Galactosidase-Units β GU [nmol freigesetztes ONP/(min*mg)] in den untersuchten Stämmen in C_{PH8}-Medium bei einer Zelldichte von N=40. Fehlerbalken geben die aus zwei durchgeführten Messungen bestimmte Standardabweichung an. Die Zahlen oberhalb der Säulen geben die Aktivität im jeweiligen Stamm als x-faches der Aktivität in R6 an (Faktoren wurden gerundet).

Effekte der Deletion von *kin11* und *reg11* auf P_{11.1}

Wie aus Abbildung 4.47 ersichtlich, konnte in den Deletionsmutanten R6 Δ *kin11*, R6 Δ *reg11* und R6 Δ *kin11reg11* keine messbare Aktivität von Promotor P_{11.1} mehr beobachtet werden. In 4.10.3 konnte bereits durch die Messung der Promotoraktivität von P_{11.1} in R6 und R6 Δ *kin11reg11* gezeigt werden, daß Promotor P_{11.1} unter der positiven Kontrolle des

Zweikomponentensystem 11 steht. Die Deletion von *kin11* oder *reg11* sollte folglich zum gleichen Verlust der Promotoraktivität führen. Die ausbleibende Promotoraktivität in $R6\Delta kin11$ und $R6\Delta reg11$ bestätigte also die positive Regulation durch das Zweikomponentensystem 11. Unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen existierte zudem keine weitere positive Regulation durch andere Regulatoren an $P_{11.1}$. $P_{11.1}$ besaß folglich eine äußerst geringe, wenn überhaupt vorhandene Background-Aktivität.

Im Vergleich zu den für diese drei Deletionsmutanten beobachteten Wachstums- und Lysephänotypen (4.10.8.2.1 und 4.10.8.2.2) bleibt jedoch zu bemerken, daß die dort beobachteten Unterschiede zwischen $R6\Delta kin11$ einerseits und $R6\Delta reg11$ und $R6\Delta kin11 reg11$ andererseits nicht mit einer ausfallenden Transkription der Gene des 11-1-Operons erklärt werden können.

Effekte der Deletion von *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *mSP11* auf $P_{11.1}$

Die Deletionen der Gene des durch das Zweikomponentensystem 11 regulierten 11-1-Operons hingegen, führten durchweg zu einer Erhöhung der Promotor-Aktivität von $P_{11.1}$ (Abbildung 4.47). Folglich schien ein Ausfall der Transporteraktivität des putativen ABC-Transporters Nbp11/Msp11 oder das Fehlen der beiden putativen Membranproteine Smp11A und Smp11B zu einer Aktivierung des Zweikomponentensystems 11 zu führen. Dies führte zu der Vermutung, daß Smp11A und Smp11B eventuell als Substratbindeproteine des putativen ABC-Transporters fungieren könnten. Das Ausmaß der Erhöhung unterschied sich jedoch zwischen den einzelnen Deletionsmutanten erheblich. Am deutlichsten war die Aktivitätserhöhung infolge der Deletion von *smp11A* (7,3-fach). Die Deletion von *smp11B* oder die gleichzeitige Deletion *smp11A* und *smp11B* hingegen hatten nur einen moderaten Anstieg der Promotor-Aktivität von $P_{11.1}$ zur Folge (1,9- bzw. 1,4-fach). Bei der Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Deletionsmutanten $R6\Delta smp11A$, $R6\Delta smp11B$ und $R6\Delta smp11AB$ konnte bereits ein deutlicher Unterschied zwischen $R6\Delta smp11A$ einerseits und $R6\Delta smp11B$ und $R6\Delta smp11AB$ andererseits festgestellt werden (4.10.8.2.1). Bereits hierdurch wurde eine unterschiedliche Funktion der beiden putativen Membranproteine deutlich, was nunmehr durch die bei der Messung der Promotor-Aktivitäten von $P_{11.1}$ beobachteten verschieden starken Erhöhungen der Aktivität bestätigt wurde. Aufgrund der Tatsache, daß die Aktivität von $P_{11.1}$ nur im Falle der Deletion von *smp11A* stark erhöht wurde, wurde in einem Modell postuliert, daß Smp11A mit Smp11B ein Heterodimer bilden kann, welches in Abhängigkeit des von Nbp11/Msp11 transportierten Substrats entweder gebildet wird oder dissoziiert. Smp11B könnte den Stimulus durch Interaktion mit Kin11 weiterleiten.

Die beobachteten Effekte auf die Aktivität des Promotors $P_{11.1}$ werden anhand eines vorgeschlagenen Modells zur Interaktion der einzelnen, durch die Gene des TCS11-Clusters kodierten Proteine und der Regulation des 11-1- und des 11-2-Operons im TCS11-Cluster diskutiert.

Eine Deletion von *nbp11* hatte eine 4-fache Erhöhung der Aktivität von $P_{11.1}$ zur Folge (Abbildung 4.47), wobei die drei verschiedenen Deletionen von *mSP11* ($\Delta mSP11$, $\Delta mSP11_5$ und $\Delta mSP11_3$) nur eine Verdopplung der Aktivität verursachten. Diese Erhöhung der Promotor-Aktivität entsprach zwar nicht dem Ausmaß im Fall der Deletion von *smp11A*, jedoch bewirkte der Ausfall der Transport-Aktivität des putativen ABC-Transporters also ebenfalls eine Selbstaktivierung des Zweikomponentensystems 11 und somit eine Stimulierung der Transkription an $P_{11.1}$.

Effekte auf $P_{11.1}$ in den Deletionsmutanten $R6\Delta inter$ und $R6\Delta rupA$

Interessanterweise konnte in den Deletionsmutanten $R6\Delta inter$ und $R6\Delta rupA$, beides Mutanten in welchen Teile des 3'-untranslatierten Bereichs der mRNA des 11-2-Operons deletiert

wurden, eine 6,7-fache, bzw. 2,4-fache Erhöhung der Promotor-Aktivität festgestellt werden. Im Falle von R6 Δ inter war der Effekt also mit der Deletion des vermutlich an einem regulatorischen Mechanismus zur Stimulus-Perzeption von Kin11 beteiligten Smp11A vergleichbar. Beide Deletionen (R6 Δ inter und R6 Δ rupA) zeigten auch phänotypisch einen ähnlichen Effekt wie die Deletion von Genen des durch das Zweikomponentensystem 11 regulierten 11-1-Operons (4.10.8.2.1; 4.10.8.2.2). Für die dem rupA-Element homologen NEMIS-Elemente in Neisserien konnte eine Beteiligung an der mRNA-Stabilität gezeigt werden (Mazzone et al., 2001; deGregorio et al., 2002; deGregorio et al., 2003). Eine verringerte Menge der mRNA des 11-2-Operons, auf welcher sich neben *kin11* und *reg11* auch das rupA-Element im 3'-untranslatierten Bereich befindet, würde zunächst auch weniger Kin11-Protein bedeuten. Weniger Kin11 bedeutet eine geringere Expression der Gene des 11-1-Operons und somit einen verringerten Transport des unbekanntes Substrats, wodurch es zu einer Anhäufung des Substrats kommen würde. Dies wiederum würde durch Kin11 über Smp11B perzipiert (vgl. oben) und würde folglich zur Aktivierung des Zweikomponentensystems und zur Stimulierung der Transkription ausgehend von P_{11.1} führen. In der Deletionsmutante R6 Δ rupA sollte zur weiteren Abklärung der mRNA-Stabilität die Menge der mRNA des *kin11*-Gens im Vergleich zum Parentalstamm R6 bestimmt werden (4.10.8.2.4).

Der 6,7-fachen Induktion des Promotors P_{11.1} in R6 Δ inter könnte einerseits eine Destabilisierung der mRNA zugrunde liegen, oder aber es befindet sich hier im 3'-untranslatierten Bereich eine mRNA-Struktur, welche, ähnlich wie in Eukaryonten beschrieben (Preiss & Hentze, 1999; Sachs & Varani, 2000; 4.10.8.2.1), zu einer verminderten Translation von *kin11* oder *reg11* führt. Beide Effekte könnten, ähnlich wie im Fall von rupA angenommen, zur Stimulierung von P_{11.1} führen. Auch im Fall von R6 Δ inter sollte der beobachtete Effekt durch eine Quantifizierung der Transkriptmenge des *kin11*-Gens genauer charakterisiert werden (4.10.8.2.4).

Effekte auf P_{11.2}

In Abbildung 4.48 wurden die aus den Messwerten aus zwei Experimenten gemittelten Aktivitäten des Promotors P_{11.2} in den Stämmen R6, R6Δ*smp11A*, R6Δ*smp11B*, R6Δ*smp11AB*, R6Δ*nbp11*, R6Δ*msp11*, R6Δ*msp11_5*, R6Δ*msp11_3*, R6Δ*kin11*, R6Δ*reg11*, R6Δ*kin11reg11*, R6Δ*inter* und R6Δ*rupA* graphisch dargestellt.

Wie aus Abbildung 4.48 zu ersehen, hatte die Deletion von mehreren Genen oder Bereichen innerhalb des TCS11-Clusters eine Aktivierung des vom Zweikomponentensystem 11 unabhängigen Promotors P_{11.2} in den entsprechenden Deletionsmutanten zur Folge. Somit konnte die bereits unter 4.10.3 beobachtete Regulation dieses Promotors durch einen noch unbekanntem Mechanismus bestätigt werden.

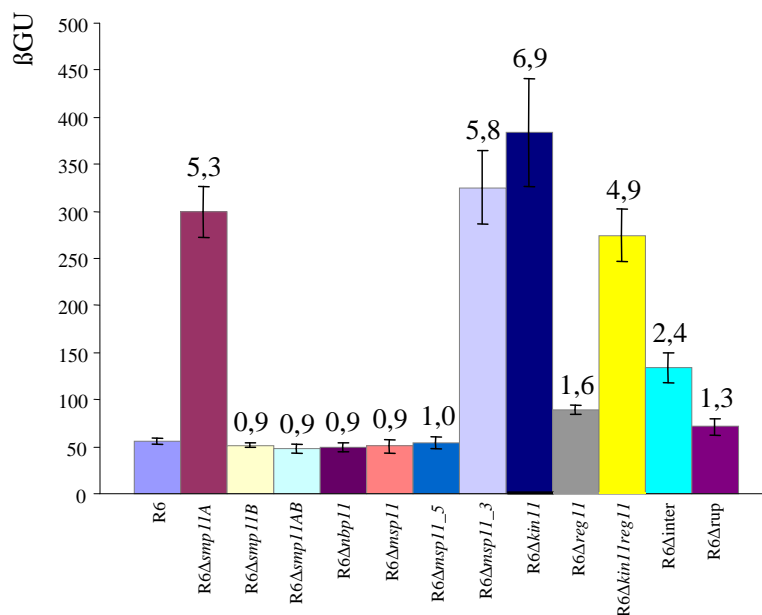


Abbildung 4.48: Graphische Darstellung der Aktivitäten des Promotors P_{11.2} in verschiedenen Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters. Dargestellt wurden die aus zwei Experimenten gemittelten Aktivitäten des Promotors P_{11.2} in β-Galactosidase-Units βGU [nmol freigesetztes ONP/(min*mg)] in den untersuchten Stämmen in CpH8-Medium bei einer Zelldichte von N=40. Fehlerbalken geben die aus zwei durchgeführten Messungen bestimmte Standardabweichung an. Die Zahlen oberhalb der Säulen geben die Aktivität im jeweiligen Stamm als x-faches der Aktivität in R6 an (Faktoren wurden gerundet).

Effekte der Deletion von *kin11* und *reg11* auf P_{11.2}

Die Deletion von *kin11* führte zu einer 6,9-fachen Erhöhung der Aktivität von P_{11.2} (Abbildung 4.48). Die Deletion von *reg11* hingegen führte nur zu einer moderaten, 1,6-fach höheren Promotor-Aktivität, wohingegen die Doppeldeletion von *kin11* und *reg11* wieder zu einer Erhöhung um den Faktor 4,9 führte. Alle drei Deletionen führen bekanntlich zum Verlust der Aktivität des durch Kin11 und Reg11 regulierten Promotors P_{11.1} und somit zur Abwesenheit der durch die Gene im 11-1-Operon kodierten Proteine. Der unbekannt regulatorische Mechanismus an Promotor P_{11.2} kann in diesen drei Deletionsmutanten folglich nur von der An- oder Abwesenheit von Kin11 selbst abhängig sein.

Der Wachstums- und Lysephänotyp von R6Δ*kin11* im Vergleich zu R6Δ*reg11* oder R6Δ*kin11reg11* (4.10.8.2.1 und 4.10.8.2.2) war nunmehr aufgrund der Kenntnis der Aktivitäten von P_{11.2} in diesen Mutanten ebenfalls erklärbar. Der Unterschied in R6Δ*kin11* im Vergleich zu R6Δ*reg11* und R6Δ*kin11reg11* besteht in der im Vergleich zu R6 6,9-fach erhöhten Transkription des isolierten *reg11*-Gens. Das Reg11-Protein in dieser Deletionsmutante konnte durch die Deletion von *kin11* zudem nicht durch Kin11

phosphoryliert werden und wurde auch, wenn überhaupt, nur in äußerst geringer Menge unspezifisch durch andere Mechanismen phosphoryliert. Hierfür war die fehlende Aktivität von $P_{11.1}$ in $R6\Delta kin11$ der direkte Nachweis. Hieraus wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß der Response-Regulator Reg11 in unphosphoryliertem Zustand die Fähigkeit besitzt einen Effekt hervorzurufen. Bei diesem Effekt könnte es sich um die Fähigkeit handeln, in unphosphoryliertem Zustand mit einer weiteren, noch uncharakterisierten DNA-Bindestelle zu interagieren und so die Transkription von Zielgenen zu regulieren. Es konnte sich auch nicht um eine ausfallende Regulation von weiteren Genen, außer denen des 11-1-Operons, welche Reg11 in phosphoryliertem Zustand zusätzlich reguliert, handeln. In diesem Fall müsste die Deletion von *kin11* und die Doppeldeletion von *kin11* und *reg11* den gleichen Effekt verursachen. Dies würde bedeuten, daß noch eine weitere, von der für den phosphorylierten Reg11 in 4.10.6 charakterisierten DNA-Erkennungssequenz abweichende Bindestelle existiert, an welche Reg11 in unphosphorylierter Form binden kann. Folglich stünden auch nicht nur die Gene des 11-1-Operons unter direkter Kontrolle des Zweikomponentensystems 11.

Effekte der Deletion von *smp11A* und *smp11B* auf $P_{11.2}$

Im Fall der Deletion von *smp11A* oder *smp11B*, sowie der Doppeldeletion beider Gene konnten an Promotor $P_{11.2}$ vergleichbare, wie bereits an Promotor $P_{11.1}$ beobachteten Effekte, verzeichnet werden (Abbildung 4.48). Nur im Fall der Deletion von *smp11A* zeigte sich eine Induktion des Promotors. In $R6\Delta smp11B$ oder $R6\Delta smp11AB$ hingegen war die Aktivität unverändert.

Folglich reagierte der unbekannte regulatorische Mechanismus an $P_{11.2}$ nicht nur auf die An- oder Abwesenheit des Kin11-Proteins, sondern auch auf die An- oder Abwesenheit von Smp11A und/oder Smp11B.

Effekte der Deletion von *nbp11* und *msh11* auf $P_{11.2}$

Eine Deletion von *nbp11* zeigte keinen Effekt auf die Aktivität des Promotors $P_{11.2}$. Die Bestimmung der Aktivität von $P_{11.2}$ in den drei verschiedenen Deletionsmutanten von *msh11* hingegen zeigte, daß die vermutlich untranslatierte Leadersequenz der mRNA des 11-2-Operons eine regulatorische Funktion wahrzunehmen scheint. Während in den Deletionsmutanten $R6\Delta msh11$ und $R6\Delta msh11_5$ keine Aktivitäts-Änderung von $P_{11.2}$ im Vergleich zu R6 zu verzeichnen war, zeigte sich im Fall der Deletionsmutante $R6\Delta msh11_3$ eine 5,8-fache Erhöhung der Promotor-Aktivität (Abbildung 4.48; Tabelle 4.16). Dies entsprach in etwa dem gleichen Effekt auf $P_{11.2}$ wie im Fall der Deletion von *kin11* oder *smp11A* (6,9- bzw. 5,3-fache Induktion). Da dieser Effekt nur in $R6\Delta msh11_3$ zu verzeichnen war, handelte es sich nicht um einen durch die Inaktivierung von *msh11* ($R6\Delta msh11_5$) oder den Verlust des Promotors $P_{11.2}$ ($R6\Delta msh11$) hervorgerufenen Effekt, sondern war einzig durch das Fehlen eines großen Teils der 441 Nukleotide langen Leadersequenz verursacht. Eventuell befand sich durch die Deletion des Leaders trotz erhöhter Aktivität von $P_{11.2}$ weniger *kin11*-Transkript in $R6\Delta msh11_3$, die Deletion des Leaders würde somit vermutlich zur Destabilisierung der mRNA führen. Da der unbekannte regulatorische Mechanismus an $P_{11.2}$ von der Menge an Kin11 abhing, würde eine verringerte Menge an Kin11 der Situation in $R6\Delta kin11$ nahe kommen. Durch die Quantifizierung der Transkriptmenge des *kin11*-Gens in $R6\Delta msh11_3$ im Vergleich zu Stamm R6 sollte dies überprüft werden (4.10.8.2.4). Zudem zeigte die ausbleibende Erhöhung der Aktivität von $P_{11.2}$ in $R6\Delta nbp11$, $R6\Delta msh11$ und $R6\Delta msh11_5$, daß der unbekannte regulatorische Mechanismus unabhängig vom kodierten ABC-Transporter zu sein schien.

Effekte auf P_{11.2} in den Deletionsmutanten R6Δinter und R6ΔrupA

Die Deletion verschiedener, in der 3'-untranslatierten Region der mRNA des 11-2-Operons liegenden Bereiche führte zu einer 2,4-fach (R6Δinter) bzw. 1,3-fach (R6ΔrupA) erhöhten Aktivität von P_{11.2} (Abbildung 4.48; Tabelle 4.16). Folglich führte der unbekannte regulatorische Mechanismus an P_{11.2} auch hier zu einer, wenn auch mäßigen Aktivierung. Sollte die Vermutung, daß dieser unbekannte regulatorische Mechanismus die An- oder Abwesenheit von Kin11 perzipiert, wie durch die Effekte der Deletion von *kin11* oder *reg11*, bzw. *kin11* und *reg11* auf die Aktivität von P_{11.2} vermutet, zutreffen, so müsste aus den Effekten in R6Δinter und R6ΔrupA gefolgert werden, daß der primäre Effekt dieser Deletionen eine reduzierte Menge von Kin11 darstellt. Durch die hierdurch wiederum hervorgerufenen Effekte würde die Aktivierung von P_{11.2} jedoch geringer ausfallen als im Fall der Deletion von *kin11*. Durch die Quantifizierung der Transkriptmenge des *kin11*-Gens in R6Δinter und R6ΔrupA im Vergleich zu Stamm R6 sollte für diese Deletionsmutanten überprüft werden, ob sich die vermutete geringere Menge von Kin11 schon auf der Ebene der Transkription zeigen lies (4.10.8.2.4).

4.10.8.2.4 Quantifizierung des Transkriptes des 11-2-Operons in R6Δmsp11_3, R6Δinter und R6ΔrupA

Zur Abklärung der im Zuge der Bestimmung der Aktivitäten der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} in den einzelnen Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters (4.10.8.2.3) gemachten Hypothese, daß eine Deletion des Leaders der mRNA des 11-2-Operons (R6Δmsp11_3) oder daß die Deletionen von im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA des 11-2-Operons liegenden Abschnitten (R6Δinter und R6ΔrupA) zu einer verringerten Menge des Transkripts des 11-2-Operons führte, sollte die Transkriptmenge des 11-2-Operons mit Hilfe einer Real-Time PCR (3.8) in den entsprechenden Deletionsmutanten im Vergleich zum Parentalstamm R6 quantifiziert werden. Die hierzu notwendige Gesamt-RNA wurde aus in CpH8-Medium exponentiell wachsenden Kulturen der vier Stämme bei einer Zelldichte von N=40 isoliert. Zur Durchführung der Real-Time PCR wurden die *kin11*-spezifischen Primer 311 und 312 verwendet. In Tabelle 4.17 wurden erhaltenen Transkriptverhältnisse von R6Δmsp11_3 zu R6, R6Δinter zu R6 und R6ΔrupA zu R6 dargestellt.

Tabelle 4.17: Quantifizierung des *kin11*-Transkripts in R6Δmsp11_3, R6Δinter und R6ΔrupA

| Stamm | Gesamt-RNA-Isolat Nr. | <i>kin11</i> -Transkriptverhältnis [Deletionsmutante/R6] ¹⁾ |
|------------|-----------------------|--|
| R6Δmsp11_3 | 1 | 0,47 (0,06) |
| | 2 | 0,71 (0,04) |
| R6Δinter | 1 | 0,83 (0,03) |
| | 2 | 1,16 (0,10) |
| R6ΔrupA | 1 | 0,90 (0,03) |
| | 2 | 0,80 (0,02) |

¹⁾ Jeder Wert wurde durch Bildung des Mittelwertes aus den Resultaten von zwei mit den gleichen Gesamt-RNA-Isolaten durchgeführten Real-Time PCRs unter Verwendung der LightCycler Software 4.0 berechnet. Werte in Klammern geben die Standardabweichung an.

Wie aus Tabelle 4.17 zu ersehen, führte sowohl die Deletion der Leadersequenz der mRNA des 11-2-Operons (R6Δmsp11_3), als auch die Deletion von *rupA* im Vergleich zu R6 zu einer niedrigeren Transkriptmenge von *kin11*. Die *kin11*-Transkriptmenge zeigte im Durchschnitt ein Verhältnis R6Δmsp11_3/R6 von 0,59 und ein Verhältnis R6ΔrupA/R6 von 0,85. Da die Aktivität des Promotors P_{11.2} in beiden Deletionsmutanten höher als in R6 war (5,8-fach in R6Δmsp11_3 und 1,3-fach in R6ΔrupA; Tabelle 4.16 unter 4.10.8.2.3), konnte gefolgert werden, daß primär noch weniger *kin11*-Transkript in beiden Deletionsmutanten

vorhanden war und dies durch die Erhöhung der Promotor-Aktivität von P_{11.2} teilweise kompensiert wurde. Die geringeren Transkriptmengen stützten folglich die Überlegungen zu den Effekten auf das Wachstumsverhalten und den Effekten auf die Promotoren P_{11.1} und P_{11.2}, sowie die hieraus abgeleiteten Interaktionen der im TCS11-Cluster kodierten Proteine in den entsprechenden Deletionsmutanten (4.10.8.2.2 und 4.10.8.2.3).

Das Resultat im Fall von R6 Δ rupA gab zudem einen Hinweis auf den Effekt der Kotranskription von *rupA* und upstream liegender Gene in mRNA und die damit verbundene, eventuelle Funktion der Kopie von *rupA* im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA des 11-2-Operons. Im vorliegenden Fall schien die Anwesenheit von *rupA* auf dem Transkript zu dessen Stabilisierung zu führen. Ein Effekt dieser Art konnte für die in Neisserien, oder für die in *Yersinia* vorhandenen, zu *rupA* homologen NEMIS- bzw. ERIC-Elemente gezeigt werden (vgl. 4.10.4).

Im Fall von R6 Δ inter hingegen konnte im Durchschnitt keine verringerte Menge des *kin11*-Transkripts verzeichnet werden (Tabelle 4.17). Jedoch zeigt die Tatsache, daß P_{11.1} in R6 Δ inter ebenfalls erheblich induziert wurde, daß hier ein Mechanismus durch die Deletion der 39 Nukleotide downstream von *reg11* verändert wurde, welcher, da er keinen Effekt auf die mRNA-Stabilität hatte, nur noch auf translationeller Ebene oder bei der Transkriptionsinitiation involviert sein konnte.

4.10.9 Globale Transkriptomanalyse von R6 Δ *msp11_3* und R6 Δ *smp11A*

Durch die Charakterisierung verschiedener Deletionsmutanten des TCS11-Clusters (4.10.8.), die Identifizierung der Promotoren im TCS11-Cluster (4.10.3), die Identifizierung der DNA-Bindestelle von phosphoryliertem Response-Regulator Reg11 (4.10.5 und 4.10.6) und die Kartierung der Transkripte im TCS11-Cluster (4.10.4), konnte ein Modell zur Regulation des 11-1- und des 11-2-Operons im TCS11-Cluster, sowie zur Interaktion und den Effekten der einzelnen Proteine entwickelt werden. Die eigentliche physiologische Funktion des TCS11-Clusters war jedoch nach wie vor unklar. Vage Rückschlüsse auf die Funktion konnten lediglich aus der erhöhten Piperacillin-Resistenz und der erhöhten Transkriptmenge des *lic1*-Operons (1.4) in Mutante P406, woran die Beteiligung des TCS11-Clusters gezeigt werden konnte (4.6; 4.7; 4.8; 4.9), sowie aus den auffallend ähnlichen Wachstums- und Lysephänotypen der Deletionsmutanten aus 4.10.8 im Vergleich mit der *cpoA*-Deletionsmutante (4.3.3.1) gezogen werden. Wegen dieser Beobachtungen könnte vom TCS11-Cluster letztendlich eine Beteiligung an der Synthese oder der Integrität von Lipoteichonsäuren vermutet werden. Die Deletionsmutanten R6 Δ *smp11A*, R6 Δ *msp11_3* und R6 Δ *kin11* zeigten phänotypisch den dramatischsten Effekt (4.10.8.2.1 und 4.10.8.2.2). Eine Transkriptomanalyse dieser drei Deletionsmutanten könnte womöglich zur Aufklärung der eigentlichen Funktion des TCS11-Clusters beitragen. Im Rahmen zweier globaler Transkriptomanalysen sollte zunächst im Transkriptom der Deletionsmutanten R6 Δ *smp11A* und R6 Δ *msp11_3* nach Hinweisen zur Funktion des TCS11-Clusters gesucht werden (4.10.9.1). Gene und somit deren Genprodukte, deren Transkriptmenge in beiden Deletionsmutanten signifikant veränderte Transkriptmengen aufwiesen, konnten funktionell mit dem TCS11-Cluster in Verbindung stehen und so durch ihre Funktion weitere Hinweise auf die physiologische Funktion des TCS11-Clusters liefern. Hierzu konnten auch eventuell auftretende Gemeinsamkeiten mit dem Transkriptom von R6 Δ *cpoA* (4.4) beitragen (4.10.9.2). Sollte CpoA (4.3.3) und das TCS11-Cluster an den gleichen, oder miteinander interagierenden Stoffwechselwegen beteiligt sein, so konnte sich dies auch in Änderungen im Transkriptom im Vergleich zu Stamm R6 manifestieren.

4.10.9.1 Vergleich der Veränderungen der Transkriptome von R6 Δ *smp11_3* und R6 Δ *smp11A*

Die zur Mikroarray-basierten Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in CpH8-Medium exponentiell wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von $N=40$ gewonnen (3.3; 3.16.3). Die Analysen wurden mit je zwei getrennt angezogenen und isolierten Gesamt-RNA-Präparationen jedes Stammes durchgeführt. Verwendet wurde das im Nano & Bio-Center der TU Kaiserslautern entwickelte R6/TIGR4 Oligo-Set (3.16.1). Die Transkriptome von R6 Δ *smp11A* und R6 Δ *smp11_3* wurden mit dem des Referenzstamms *Streptococcus pneumoniae* R6 verglichen. Hierbei wurden nur solche Gene als signifikant angesehen, deren Transkriptverhältnisse einen Wert von >2 oder $<0,5$ besaßen und deren Transkriptverhältnisse nach Durchführung der statistischen Analyse einen P-Wert von $<0,01$ aufwiesen (3.16.5). In den folgenden Abbildungen wurden die Transkriptmengenverhältnisse zur besseren graphischen Darstellung als Fold Difference zu R6 angegeben.

Im Transkriptom von R6 Δ *smp11A* konnten 73 Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen im Vergleich zu Stamm R6 identifiziert werden. In R6 Δ *smp11_3* zeigten 74 Gene im Vergleich zu Stamm R6 signifikant veränderte Transkriptmengen. Alle Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in den beiden Deletionsmutanten, nebst den bei der Signifikanztestung erhaltenen P-Werten wurden im Anhang der vorliegenden Arbeit unter 7.11 und 7.12 aufgelistet.

Die ermittelten Gene wurden zu einem Vergleich der Veränderungen in den Transkriptomen der beiden Deletionsmutanten herangezogen. Da durch diesen Vergleich Gene ermittelt werden sollten, welche funktionell mit dem TCS11-Cluster in Verbindung standen, wurde nach Genen gesucht, welche entweder in beiden Deletionsmutanten veränderte Transkriptmengen zeigten oder zumindest in einer der Deletionsmutanten ein erheblich verändertes Transkriptmengenverhältnis (>3 oder $<0,33$) aufwiesen. In Abbildung 4.49 wurden die 64 aus den Transkriptomen der Deletionsmutanten R6 Δ *smp11A* und R6 Δ *smp11_3* identifizierten Gene, für welche diese Kriterien zutrafen, zusammengefasst. Zur übersichtlicheren graphischen Darstellung wurden hierbei die Transkriptverhältnisse als Fold Difference zu R6 angegeben. In Tabelle 4.18 wurden diese Gene einzeln aufgelistet.

Wie aus Abbildung 4.49 zu ersehen, zeigten 40 dieser Gene in beiden Deletionsmutanten eine von R6 abweichende Transkriptmenge (grau oder grün hinterlegt in Abbildung 4.49; Tabelle 4.18). Da sich die Transkriptmenge dieser Gene in beiden Deletionsmutanten infolge der entsprechenden Deletion im TCS11-Cluster änderten, war davon auszugehen, daß die durch sie kodierte Proteine funktionell mit dem TCS11-Cluster in Zusammenhang standen. Es handelte sich hierbei vermutlich um einen indirekten regulatorischen Effekt infolge der Deletionen im Bereich des TCS11-Clusters. Eine erneute Suche nach mehr oder weniger degenerierten Sequenzen der DNA-Bindestelle (4.10.6.3) des phosphorylierten Response-Regulators Reg11 in den putativen Promotorbereichen dieser Gene erbrachte jedenfalls keine Treffer. Unter diesen 40 Genen befanden sich lediglich drei Gene, welche in beiden Deletionsmutanten eine erhöhte Transkriptmenge aufwiesen (grün hinterlegt in Abbildung 4.49; Tabelle 4.18). Hierbei handelte es sich um die Gene *prtA* (Gen einer Subtilisin-artigen Serin-Protease; Bethe et al., 2001), *nbp11* und das für ein uncharakterisiertes Cholinbindeprotein kodierende *pcpA* (Sánchez-Beato et al., 1998). Die weiteren 37 Gene zeigten in beiden Deletionsmutanten jeweils einen gegensätzlichen Effekt bezüglich ihrer Transkriptverhältnisse im Vergleich zu R6 (hellgrau hinterlegt in Abbildung 4.49; Tabelle 4.18). Während diese Gene in R6 Δ *smp11A* erhöhte Transkriptmengen besaßen, so zeigten sie in R6 Δ *smp11_3* niedrigere Transkriptmengen und umgekehrt. Zu diesen Genen zählten 27 Gene des Kompetenzregulons (gelb), bzw. des *blp*-Clusters (türkis; vgl. 1.5 und 4.2.1). Die

Gene des Kompetenzregulons und des *blp*-Clusters zeigten in *R6Δsmp11A* eine höhere Transkriptmenge als in *R6* und in *R6Δsmp11_3* eine niedrigere. Die Transkriptmengen der Gene *spr0105* bis *spr0108*, *spr0446* und *copY* zeigten den gegenteiligen Effekt. Die Transkriptmengen der Gene *spr0388* und *spr0389*, sowie der Gene *spr1856* und *spr1857* verhielten sich wie die der Gene des Kompetenzregulons und des *blp*-Clusters. (Tabelle 4.18).

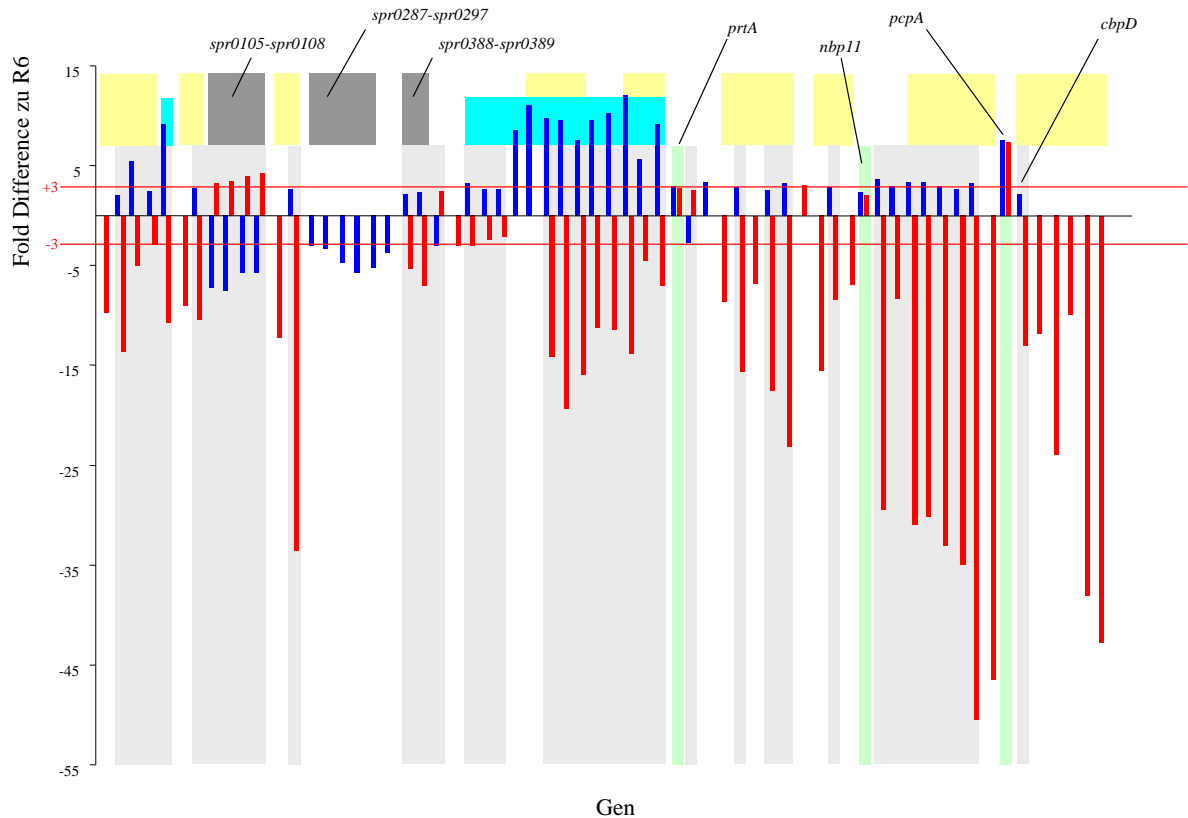


Abbildung 4.49: Übersicht von in ihrer Transkriptmenge im Vergleich zu *R6* veränderten Genen in *R6Δsmp11A* und *R6Δsmp11_3*. Dargestellt wurde das Transkriptmengenverhältnis von Genen als Fold Difference der Transkriptmenge in *R6*. Blaue Säulen: Fold Difference in *R6Δsmp11A*. Rote Säulen: Fold Difference in *R6Δsmp11_3*. Zusammengefasst wurden 64 Gene, welche entweder in beiden Deletionsmutanten eine von *R6* abweichende Transkriptmenge (hellgrau oder grün markiert), oder in einer Deletionsmutante ein Transkriptmengenverhältnis von >3 oder $<0,33$ zeigten. Hellgraue Markierung: Gene, welche eine höhere Transkriptmenge in einer Mutante und eine niedrigere Transkriptmenge in der anderen Mutante zeigten. Grüne Markierung: Gene, welche in beiden Mutanten eine höhere Transkriptmenge aufwiesen. Gelb: Gene des Kompetenzregulons. Türkis: Gene des *blp*-Clusters. Dunkelgrau: Sonstige vermutlich funktionell zusammenhängende Gencluster. *nbp11*: Gen des Nucleotide binding proteins 11. *cbpD* und *pcpA*: Gene der Cholinbindeproteine CpbD und PcpA.

Im Fall von weiteren 24 Genen konnte entweder nur in *R6Δsmp11A* oder nur in *R6Δsmp11_3* eine von *R6* abweichende Transkriptmenge (Verhältnis >3 oder $<0,33$) verzeichnet werden (Abbildung 4.49; Tabelle 4.18). Hierunter befanden sich neben 11 weiteren Genen des Kompetenzregulons die Gene *spr0448* und *czcD*, welche nur in *R6Δsmp11_3* von denen in *R6* abweichende Transkriptmengen zeigten. Dahingegen zeigten 5 Gene aus einem am Pentosephosphatweg, sowie den Pentose-Glucuronsäure-Umwandlungen beteiligten Cluster (*spr0287* bis *spr0297*), sowie zwei weitere Gene des *blp*-Clusters, nebst den Genen *spr0307* und *spr0826* nur in *R6Δsmp11A* von *R6* abweichende Transkriptmengen.

Auch von diesen Genen konnte aufgrund der erheblich veränderten Transkriptmengen im Vergleich zu R6 (>3 oder $<0,33$) zumindest vermutet werden, daß sie mit dem TCS11-Cluster auf eine noch unbekannte Art und Weise funktionell gekoppelt waren.

Tabelle 4.18: Übersicht der auf Veränderungen im TCS11-Cluster reagierenden Gene

| Gennummer in R6 ¹⁾ | Gen ²⁾ | Funktion/Domäne | Transkript- verhältnis ³⁾ | Transkript- verhältnis ⁴⁾ |
|----------------------------------|-------------------|---|---|---|
| | | | [R6 Δ smp11A/R6] | [R6 Δ msp11_3/R6] |
| <i>spr0013</i> ⁵⁾ | <i>comX</i> | Alternative sigma factor ComX | | 0,10 |
| <i>spr0020</i> ⁵⁾ | <i>comW</i> | positive factor involved in competence | 2,03 | 0,07 |
| <i>spr0030</i> ⁵⁾ | - | Hypothetical protein | 5,41 | 0,20 |
| <i>spr0031</i> ⁵⁾ | - | Hypothetical protein | 2,42 | 0,34 |
| <i>spr0040</i> ⁶⁾ | <i>blpU</i> | Amphipathic pore-forming peptide precursor | 9,09 | 0,09 |
| <i>spr0043</i> ⁵⁾ | <i>comA</i> | Transport ATP-binding protein ComA | | 0,11 |
| <i>spr0044</i> ⁵⁾ | <i>comB</i> | Transport permease protein ComB | 2,74 | 0,10 |
| <i>spr0105</i> | - | Bacteriocin transporter, peptidase c39 family, truncation | 0,14 | 3,17 |
| <i>spr0106</i> | - | Putative bacteriocin transporter, truncation | 0,13 | 3,48 |
| <i>spr0107</i> | - | Hypothetical protein | 0,17 | 3,92 |
| <i>spr0108</i> | - | Conserved hypothetical protein, comB homologue | 0,18 | 4,17 |
| <i>spr0127</i> ⁵⁾ | <i>cibB</i> | Competence induced bacteriocin B | | 0,08 |
| <i>spr0128</i> ⁵⁾ | <i>cibA</i> | Competence induced bacteriocin A | 2,60 | 0,03 |
| <i>spr0288</i> | <i>kdgK</i> | 2-keto-3-deoxygluconate kinase | 0,33 | |
| <i>spr0290</i> | <i>gno</i> | 5-keto-D-gluconate 5-reductase | 0,30 | |
| <i>spr0291</i> | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIla component | 0,21 | |
| <i>spr0293</i> | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIlb component | 0,18 | |
| <i>spr0295</i> | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIId component | 0,19 | |
| <i>spr0307</i> | - | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 0,27 | |
| <i>spr0388</i> | - | Hypothetical protein | 2,17 | 0,18 |
| <i>spr0389</i> | - | Hypothetical protein | 2,34 | 0,14 |
| <i>spr0446</i> | - | Putative type I restriction enzyme, truncation | 0,34 | 2,40 |
| <i>spr0448</i> | - | Putative type I restriction enzyme, truncation | | 0,33 |
| <i>spr0462</i> ⁶⁾ | <i>blpS</i> | Regulatory protein | 3,23 | 0,33 |
| <i>spr0463</i> ⁶⁾ | <i>blpR</i> | Response regulator BlpR | 2,68 | 0,42 |
| <i>spr0464</i> ⁶⁾ | <i>blpH</i> | Histidine kinase BlpH | 2,65 | 0,48 |
| <i>spr0465</i> ⁶⁾ | <i>blpC</i> | Peptide pheromone BlpC | 8,51 | |
| <i>spr0466</i> ^{5) 6)} | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 11,11 | |
| <i>spr0467</i> ^{5) 6)} | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 9,76 | 0,07 |
| <i>spr0468</i> ^{5) 6)} | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 9,52 | 0,05 |
| <i>spr0469</i> ^{5) 6)} | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 7,55 | 0,06 |
| <i>spr0470</i> ⁶⁾ | <i>blpO</i> | Hypothetical protein | 9,52 | 0,09 |
| <i>spr0471</i> ⁶⁾ | - | Hypothetical protein | 10,26 | 0,09 |
| <i>spr0472</i> ^{5) 6)} | <i>blpY</i> | BlpY immunity protein | 12,12 | 0,07 |
| <i>spr0473</i> ^{5) 6)} | <i>blpZ</i> | BlpZ protein | 5,63 | 0,22 |
| <i>spr0474</i> ^{5) 6)} | <i>pncP</i> | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 9,09 | 0,14 |

| | | | | |
|------------------------------|--------------|--|------|------|
| <i>spr0504</i> | <i>licT</i> | Transcriptional antiterminator (BglG family) | 0,41 | |
| | | Cell wall-associated serine proteinase | | |
| <i>spr0561</i> | <i>prtA</i> | precursor PrtA | 2,92 | 2,76 |
| <i>spr0639</i> | <i>copY</i> | COPAB ATPases metal-fist type repressor | 0,37 | 2,53 |
| <i>spr0826</i> | - | Hypothetical protein | 3,33 | |
| <i>spr0856</i> ⁵⁾ | <i>celA</i> | Competence protein | | 0,12 |
| <i>spr0857</i> ⁵⁾ | <i>celB</i> | Competence protein | 2,88 | 0,06 |
| <i>spr0881</i> ⁵⁾ | <i>coiA</i> | Competence protein | | 0,15 |
| <i>spr0996</i> ⁵⁾ | <i>radC</i> | DNA repair protein | 2,50 | 0,06 |
| <i>spr1144</i> ⁵⁾ | <i>smf</i> | DNA processing Smf protein | 3,31 | 0,04 |
| | | Cation diffusion facilitator transporter-heavy | | |
| <i>spr1672</i> | <i>czcD</i> | metal transport | | 3,03 |
| <i>spr1724</i> ⁵⁾ | <i>ssbB</i> | Single-stranded DNA-binding protein | | 0,06 |
| <i>spr1758</i> ⁵⁾ | <i>cinA</i> | Competence induced protein | 2,82 | 0,12 |
| <i>spr1762</i> ⁵⁾ | <i>comM</i> | Hypothetical protein | | 0,14 |
| | | ABC transporter ATP-binding protein - | | |
| <i>spr1817</i> | <i>nbp11</i> | unknown substrate | 2,30 | 2,01 |
| | | Putative SAM-dependent methyltransferase, | | |
| <i>spr1856</i> | - | truncation | 3,67 | 0,03 |
| | | Putative SAM-dependent methyltransferase, | | |
| <i>spr1857</i> | - | truncation | 2,99 | 0,12 |
| <i>spr1858</i> ⁵⁾ | - | Hypothetical protein | 3,39 | 0,03 |
| | | Conserved hypothetical protein, N-terminal | | |
| <i>spr1859</i> ⁵⁾ | - | methylation motif | 3,33 | 0,03 |
| <i>spr1861</i> ⁵⁾ | <i>cglD</i> | Competence protein | 2,94 | 0,03 |
| <i>spr1862</i> ⁵⁾ | <i>cglC</i> | Competence protein | 2,68 | 0,03 |
| <i>spr1863</i> ⁵⁾ | <i>cglB</i> | Competence protein | 3,28 | 0,02 |
| <i>spr1864</i> ⁵⁾ | <i>cglA</i> | Competence protein | | 0,02 |
| <i>spr1945</i> | <i>pcpA</i> | Choline-binding protein | 7,55 | 7,41 |
| <i>spr2006</i> ⁵⁾ | <i>cbpD</i> | Choline-binding protein D | 2,16 | 0,08 |
| | | Involved in transformation (competence for | | |
| <i>spr2012</i> ⁵⁾ | <i>comFC</i> | DNA uptake) | | 0,08 |
| | | Required for DNA uptake; related to ATP- | | |
| <i>spr2013</i> ⁵⁾ | <i>comFA</i> | dependent RNA/DNA helicases | | 0,04 |
| <i>spr2041</i> ⁵⁾ | <i>comE</i> | Response regulator | | 0,10 |
| <i>spr2042</i> ⁵⁾ | <i>comD</i> | Histidine protein kinase | | 0,03 |
| <i>spr2043</i> ⁵⁾ | <i>comC</i> | Competence stimulating peptide precursor (CSP) | | 0,02 |

Berücksichtigt wurden nur solche Gene, deren Transkriptmengenverhältnis im Vergleich zu R6 entweder in beiden Deletionsmutanten einen Wert von >2 oder <0,5, oder in nur einer Deletionsmutante einen Wert von mindestens >3 oder <0,33 entsprach. ¹⁾ Annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ Bezeichnung charakterisierter Gene; ³⁾ Transkriptmengenverhältnis von R6 Δ *smp11A* zu R6; ⁴⁾ Transkriptmengenverhältnis von R6 Δ *smp11_3* zu R6; ⁵⁾ Gene des Kompetenzregulons; ⁶⁾ Gene des *blp*-Clusters

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß, zusätzlich zu den Genen des *lic1*-Operons (4.2.3; 4.8) auch das Kompetenzregulon, das *blp*-Cluster, die Gene *spr0105* bis *spr0108*, *spr0446*, *copY*, *spr0388* und *spr0389*, sowie die Gene *spr1856*, *spr1857*, *prtA* und *pcpA* sicher mit dem TCS11-Cluster auf eine noch zu charakterisierende Art funktionell gekoppelt waren. Einen Hinweis zur Funktion des TCS11-Clusters konnte die Tatsache darstellen, daß für eine Vielzahl von Genen, welche infolge von Veränderungen im TCS11-Cluster eine signifikant veränderte Transkriptmenge aufwiesen, auch schon bei der Transkriptomanalyse von R6 Δ *cpoA* ein vergleichbarer Effekt beobachtet werden konnte (4.4). In Abschnitt 4.10.9.2

wurden die Gemeinsamkeiten der Veränderungen der Transkriptome von R6 Δ *cpoA*, R6 Δ *smp11A* und R6 Δ *smp11_3* aufgezeigt.

4.10.9.2 Vergleich der Veränderungen der Transkriptome von R6 Δ *smp11_3* und R6 Δ *smp11A* und R6 Δ *cpoA*

Für CpoA wurde eine Funktion bei der Synthese des Lipidankers der Lipoteichonsäuren in *Streptococcus pneumoniae* R6 vermutet (4.2.2; 4.3; 4.4). Deletionsmutanten einzelner Gene des TCS11-Clusters zeigten einen der Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* vergleichbaren Wachstums- und Lysephänotyp (4.3.3; 4.10.8.2.1; 4.10.8.2.2). In Mutante P406 konnten die im Vergleich zu R6 erhöhten Transkriptmengen des an der Teichonsäurebiosynthese beteiligten *licI*-Operons auf erhöhte Transkriptmengen der Gene des TCS11-Clusters zurückgeführt werden (4.8). Dies führte zu der Vermutung, daß das TCS11-Cluster ebenfalls an der Synthese oder der Regulation von Teichonsäuren beteiligt sein könnte. Bei der Transkriptomanalyse der Deletionsmutanten R6 Δ *smp11A* und R6 Δ *smp11_3* konnten 40 Gene identifiziert werden, welche in beiden Deletionsmutanten signifikant veränderte Transkriptmengen aufwiesen und folglich funktionell mit dem TCS11-Cluster in Verbindung gebracht werden konnten. Sollte CpoA (4.3.3) und das TCS11-Cluster an den gleichen, oder miteinander interagierenden Stoffwechselwegen beteiligt sein, so sollte sich dies auch in ähnlichen Änderungen im Transkriptom im Vergleich zu Stamm R6 zeigen. Ein Vergleich der Veränderungen im Transkriptom bezüglich des Referenzstammes R6 der Deletionsmutanten R6 Δ *cpoA*, R6 Δ *smp11A* und R6 Δ *smp11_3* sollte solche Gemeinsamkeiten aufdecken. In Abbildung 4.50 wurden alle Gene mit im Vergleich zu R6 signifikant veränderten Transkriptmengen aus diesen Deletionsmutanten zusammengefasst, welche in mindestens zwei dieser Deletionsmutanten signifikant veränderte Transkriptmengen aufwiesen.

Der direkte Vergleich zwischen den Veränderungen in R6 Δ *cpoA* (112 Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen) und R6 Δ *smp11_3* (74 Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen) ergab eine Übereinstimmung in 56 Genen, wobei alle Gene außer *spr0446* entweder in beiden Deletionsmutanten erhöhte-, oder in beiden Deletionsmutanten erniedrigte Transkriptmengen zeigten (Abbildung 4.50). Eine Liste der übereinstimmenden Gene wurde in Tabelle 4.19 erstellt. Es handelte sich hierbei meist um Gene des Kompetenzregulons, inklusive des Gens *cbpD*, sowie des *blp*-Clusters. Zudem beinhaltete diese Gruppe Gene der uncharakterisierten Gencluster *spr0098-spr0107* sowie *spr0388-spr0389*, des *cyl*-Clusters, sowie einige einzelne, meist noch uncharakterisierte Gene. Zu diesen einzelnen Genen gehörte das für ein noch uncharakterisiertes Cholinbindeprotein kodierende Gen *pcpA* (Sánchez-Beato et al., 1998) und das Gen *prtA* (Bethe et al., 2001), welches für eine Zellwand-gebundene, Subtilisin-artige Serinprotease kodiert.

Der direkte Vergleich zwischen den Veränderungen in R6 Δ *cpoA* und R6 Δ *smp11A* ergab eine Übereinstimmung von 37 Genen (Abbildung 4.50). Eine Liste dieser Gene wurde in Tabelle 4.19 erstellt. 33 dieser Gene waren zudem auch im Vergleich von R6 Δ *smp11_3* mit R6 Δ *cpoA* auffällig. Hierunter befanden sich erneut *pcpA*, *cbpD*, *prtA*, *spr0446*, *copY*, Gene der uncharakterisierten Cluster *spr0096-spr0108*, *spr0388-spr0389* und 26 Gene des Kompetenzregulons bzw. des *blp*-Clusters. Alle diese Gene, bis auf *prtA*, *pcpA*, *spr0446*, *yrA* und *spr1559* zeigten, wie schon beim Vergleich mit R6 Δ *smp11_3* eine erhöhte Transkriptmenge wenn sie in R6 Δ *cpoA* eine geringere Transkriptmenge zeigten und umgekehrt. Sie zeigten also genau den gegenteiligen Effekt wie in R6 Δ *cpoA*. Die Gene *prtA* und *pcpA* zeichneten sich in allen drei Mutanten durch eine im Vergleich zu R6 erhöhte Transkriptmenge aus. Dies waren die einzigen Gene, die in allen drei Mutanten einen

übereinstimmenden Effekt zeigten. Die Gene *spr0446*, *ytrA* und *spr1559* besaßen sowohl in $R6\Delta smp11A$, als auch in $R6\Delta cpoA$ erhöhte Transkriptmengen.

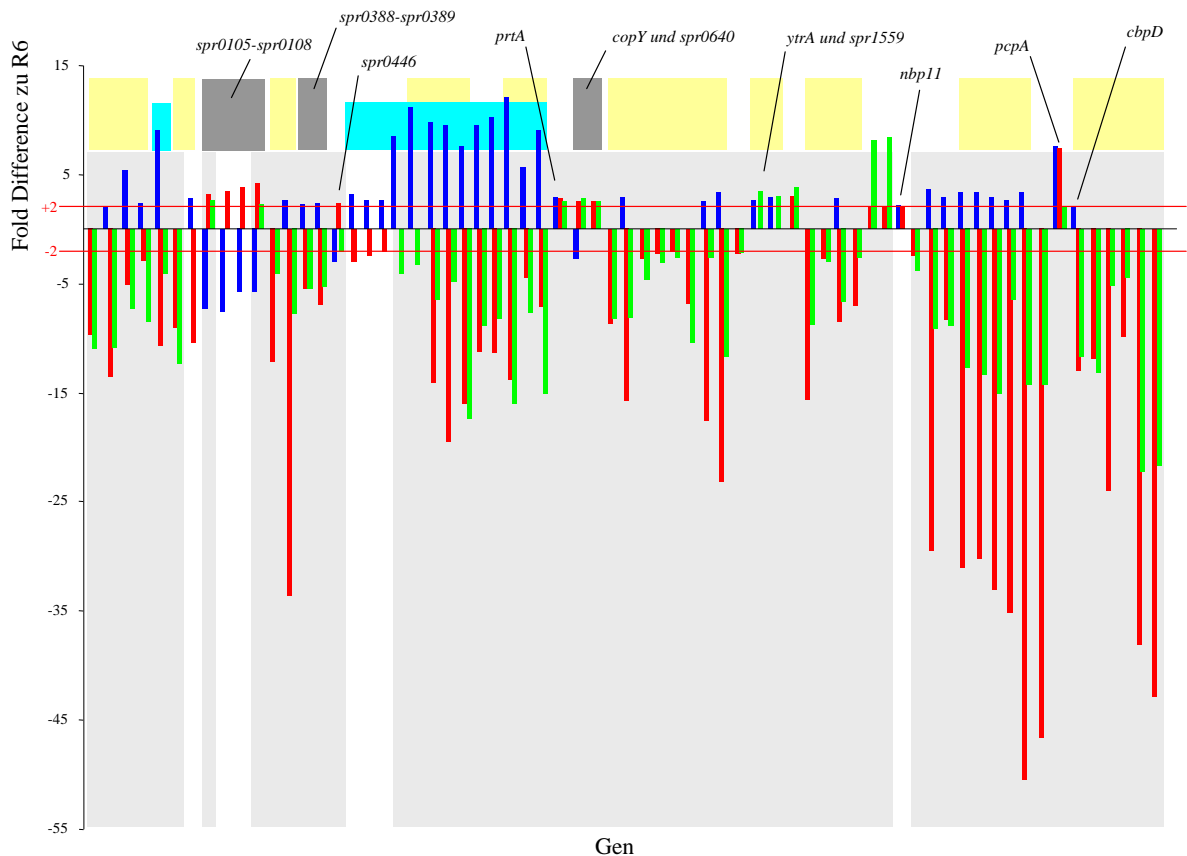


Abbildung 4.50: Vergleich der Gene mit veränderten Transkriptmengen in $R6\Delta cpoA$, $R6\Delta smp11A$ und $R6\Delta smp11_3$. Dargestellt wurde das Transkriptmengenverhältnis von Genen als Fold Difference der Transkriptmenge in R6. Blaue Säulen: Fold Difference in $R6\Delta smp11A$. Rote Säulen: Fold Difference in $R6\Delta smp11_3$. Grüne Säulen: Fold Difference in $R6\Delta cpoA$. Zusammengefasst wurden 67 Gene, welche entweder in allen Deletionsmutanten, nur in $R6\Delta smp11A$ und $R6\Delta cpoA$, nur in $R6\Delta smp11_3$ und $R6\Delta cpoA$ (alle hellgrau markiert) oder nur in $R6\Delta smp11A$ und $R6\Delta smp11_3$ eine von R6 abweichende Transkriptmenge zeigten. Gelb: Gene des Kompetenzregulons. Türkis: Gene des *blp*-Clusters. Dunkelgrau: Sonstige vermutlich funktionell zusammenhängende Gencluster. *nbp11*: Gen des Nucleotide binding proteins 11. *cbpD* und *pcpA*: Gene der Cholinbindepoteine CpbD und PcpA. *prtA*: Gen einer Subtilisin-artigen Serin-Protease. *copY*: Gen einer ATPase eines Kupfertransporters. *ytrA*: Gen eines transkriptionellen Regulators.

Generell konnte festgestellt werden, daß vor allem die Veränderungen im Vergleich zu R6 der Transkriptome von $R6\Delta smp11_3$ und $R6\Delta cpoA$ eine große Übereinstimmung zeigten. 55 von 74 sich in ihrer Transkriptmenge von R6 unterscheidenden Gene in $R6\Delta smp11_3$ zeigten auch in $R6\Delta cpoA$ entweder erhöhte oder erniedrigte Transkriptmengen. Beide Deletionen haben einen vergleichbaren Effekt auf das Kompetenzregulon inklusive des *cbpD*-Gens, das *blp*-Cluster, einzelne Gene der Gencluster *spr0096-spr0108* (vgl. auch 4.2.1), *spr0388-spr0389* sowie des *cyl*-Clusters und auf die Gene *prtA* und *pcpA*. Die Übereinstimmung der Veränderungen im Transkriptom von $R6\Delta smp11A$ im Vergleich zu $R6\Delta cpoA$ fiel mit 37 Genen geringer aus, jedoch handelte es sich auch hier bei 33 der 37 Gene um solche Gene, welche auch zu den 55 Genen in $R6\Delta smp11$ gehörten, von welchen in $R6\Delta cpoA$ ein vergleichbarer Effekt infolge der Deletion von *cpoA* beobachtet werden konnte.

Es handelte sich bei den Genen mit in allen drei Deletionsmutanten veränderten Transkriptmengen durchweg um Gene oder Cluster, deren Genprodukte aufgrund ihrer beschriebenen-, bzw. aufgrund ihrer postulierten Funktion oder Lokalisation mit der Zellwand

assoziiert und folglich auf intakte Strukturen und die natürliche Zusammensetzung der Zellwand angewiesen sind. Neben der biochemischen Charakterisierung von CpoA als α -Galactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin-Synthase (Berg et al., 2001; Edman et al., 2003), welche an der Synthese des Lipidankers von Lipoteichonsäuren beteiligt sein könnte, konnte auch in der vorliegenden Arbeit (4.2.1; 4.2.2; 4.3; 4.4) bei der Charakterisierung von P106 und R6 Δ cpoA eine Fülle von Hinweisen bezüglich einer solchen Funktion von CpoA gesammelt werden. Das an der Synthese von Teichonsäuren beteiligte *lic1*-Operon zeigte, infolge einer erhöhten Transkriptmenge des TCS11-Clusters ebenfalls eine höhere Transkriptmenge (4.2.3; 4.8). Da nunmehr die Deletion einzelner Gene des TCS11-Clusters einen dem von R6 Δ cpoA vergleichbaren Phänotyp aufwies (4.10.8.2) und die Veränderungen im Transkriptom zweier dieser Deletionsmutanten im Bezug auf die betroffenen Gene in großen Teilen mit den beobachteten Veränderungen des Transkriptoms von R6 Δ cpoA übereinstimmten, wurde vermutet, daß das TCS11-Cluster und CpoA zumindest an miteinander interagierenden Prozessen, welche am Aufbau oder der direkten-, bzw. indirekten Regulation von Teichonsäuren beteiligt sind, mitwirken.

Tabelle 4.19: Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in R6 Δ smp11A, R6 Δ smp11_3 und R6 Δ cpoA.

| Gennummer in R6 ¹⁾ | Gen ²⁾ | Transkript- verhältnis ³⁾ [R6 Δ smp11A/R6] | Transkript- verhältnis ⁴⁾ [R6 Δ smp11_3/R6] | Transkript- verhältnis ⁵⁾ [R6 Δ cpoA/R6] | |
|----------------------------------|-------------------|--|---|--|------|
| <i>spr0013</i> ⁶⁾ | <i>comX</i> | | | 0,10 | 0,09 |
| <i>spr0020</i> ⁶⁾ | <i>comW</i> | 2,03 | | 0,07 | 0,09 |
| <i>spr0030</i> ⁶⁾ | - | 5,41 | | 0,20 | 0,14 |
| <i>spr0031</i> ⁶⁾ | - | 2,42 | | 0,34 | 0,12 |
| <i>spr0040</i> ⁷⁾ | <i>blpU</i> | 9,09 | | 0,09 | 0,25 |
| <i>spr0043</i> ⁶⁾ | <i>comA</i> | | | 0,11 | 0,08 |
| <i>spr0105</i> | - | 0,14 | | 3,17 | 2,64 |
| <i>spr0108</i> | - | 0,18 | | 4,17 | 2,23 |
| <i>spr0127</i> ⁶⁾ | <i>cibB</i> | | | 0,08 | 0,25 |
| <i>spr0128</i> ⁶⁾ | <i>cibA</i> | 2,60 | | 0,03 | 0,13 |
| <i>spr0388</i> | - | 2,17 | | 0,18 | 0,19 |
| <i>spr0389</i> | - | 2,34 | | 0,14 | 0,19 |
| <i>spr0446</i> | - | 0,34 | | 0,33 | 0,49 |
| <i>spr0465</i> ⁷⁾ | <i>blpC</i> | 8,51 | | | 0,25 |
| <i>spr0466</i> ^{6) 7)} | <i>blpB</i> | 11,11 | | | 0,31 |
| <i>spr0467</i> ^{6) 7)} | <i>blpB</i> | 9,76 | | 0,07 | 0,16 |
| <i>spr0468</i> ^{6) 7)} | <i>blpA</i> | 9,52 | | 0,05 | 0,21 |
| <i>spr0469</i> ^{6) 7)} | <i>blpA</i> | 7,55 | | 0,06 | 0,06 |
| <i>spr0470</i> ⁷⁾ | <i>blpO</i> | 9,52 | | 0,09 | 0,11 |
| <i>spr0471</i> ⁷⁾ | - | 10,26 | | 0,09 | 0,12 |
| <i>spr0472</i> ^{6) 7)} | <i>blpY</i> | 12,12 | | 0,07 | 0,06 |
| <i>spr0473</i> ^{6) 7)} | <i>blpZ</i> | 5,63 | | 0,22 | 0,13 |
| <i>spr0474</i> ^{6) 7)} | <i>pncP</i> | 9,09 | | 0,14 | 0,07 |
| <i>spr0561</i> | <i>priA</i> | 2,92 | | 2,76 | 2,52 |
| <i>spr0639</i> | <i>copY</i> | 0,37 | | 2,53 | 2,77 |
| <i>spr0640</i> | - | | | 2,52 | 2,52 |
| <i>spr0856</i> ⁶⁾ | <i>celA</i> | | | 0,12 | 0,12 |
| <i>spr0857</i> ⁶⁾ | <i>celB</i> | 2,88 | | 0,06 | 0,12 |
| <i>spr0858</i> ⁶⁾ | - | | | 0,36 | 0,22 |
| <i>spr0859</i> ⁶⁾ | - | | | 0,45 | 0,33 |
| <i>spr0860</i> ⁶⁾ | - | | | 0,49 | 0,39 |
| <i>spr0881</i> ⁶⁾ | <i>coiA</i> | | | 0,15 | 0,10 |
| <i>spr0996</i> ⁶⁾ | <i>radC</i> | 2,50 | | 0,06 | 0,39 |

| | | | | |
|------------------------------|--------------|------|------|------|
| <i>spr1144</i> ⁶⁾ | <i>smf</i> | 3,31 | 0,04 | 0,09 |
| <i>spr1452</i> | - | | 0,43 | 0,45 |
| <i>spr1558</i> ⁶⁾ | <i>ytrA</i> | 2,58 | | 3,51 |
| <i>spr1559</i> ⁶⁾ | - | 2,86 | | 3,06 |
| <i>spr1672</i> | <i>czcD</i> | | 3,03 | 3,91 |
| <i>spr1724</i> ⁶⁾ | <i>ssbB</i> | | 0,06 | 0,11 |
| <i>spr1756</i> ⁶⁾ | <i>dinF</i> | | 0,38 | 0,33 |
| <i>spr1758</i> ⁶⁾ | <i>cinA</i> | 2,82 | 0,12 | 0,15 |
| <i>spr1762</i> ⁶⁾ | <i>comM</i> | | 0,14 | 0,39 |
| <i>spr1767</i> | <i>cylM</i> | | 2,15 | 8,15 |
| <i>spr1770</i> | <i>clyB</i> | | 2,12 | 8,41 |
| <i>spr1831</i> | - | | 0,41 | 0,26 |
| <i>spr1856</i> | - | 3,67 | 0,03 | 0,11 |
| <i>spr1857</i> | - | 2,99 | 0,12 | 0,11 |
| <i>spr1858</i> ⁶⁾ | - | 3,39 | 0,03 | 0,08 |
| <i>spr1859</i> ⁶⁾ | - | 3,33 | 0,03 | 0,08 |
| <i>spr1861</i> ⁶⁾ | <i>cglD</i> | 2,94 | 0,03 | 0,07 |
| <i>spr1862</i> ⁶⁾ | <i>cglC</i> | 2,68 | 0,03 | 0,16 |
| <i>spr1863</i> ⁶⁾ | <i>cglB</i> | 3,28 | 0,02 | 0,07 |
| <i>spr1864</i> ⁶⁾ | <i>cglA</i> | | 0,02 | 0,07 |
| <i>spr1945</i> | <i>pcpA</i> | 7,55 | 7,41 | 2,03 |
| <i>spr2006</i> ⁶⁾ | <i>cbpD</i> | 2,16 | 0,08 | 0,09 |
| <i>spr2012</i> ⁶⁾ | <i>comFC</i> | | 0,08 | 0,08 |
| <i>spr2013</i> ⁶⁾ | <i>comFA</i> | | 0,04 | 0,19 |
| <i>spr2041</i> ⁶⁾ | <i>comE</i> | | 0,10 | 0,22 |
| <i>spr2042</i> ⁶⁾ | <i>comD</i> | | 0,03 | 0,05 |
| <i>spr2043</i> ⁶⁾ | <i>comC</i> | | 0,02 | 0,05 |

Berücksichtigt wurden nur solche Gene, deren Transkriptmengenverhältnis im Vergleich zu R6 entweder in beiden Deletionsmutanten einen Wert von >2 oder <0,5, oder in nur einer Deletionsmutante einen Wert von mindestens >3 oder <0,33 entsprach. ¹⁾ Annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ Bezeichnung charakterisierter Gene; ³⁾ Transkriptmengenverhältnis von R6 Δ *smp11A* zu R6; ⁴⁾ Transkriptmengenverhältnis von R6 Δ *msp11_3* zu R6; ⁵⁾ Transkriptmengenverhältnis von R6 Δ *cpoA* zu R6. ⁶⁾ Gene des Kompetenzregulons; ⁷⁾ Gene des *blp*-Clusters.

4.10.10 Überexpression des TCS11-Clusters in R6

Durch die Doppeldeletion der im Vergleich zu R6 stärker transkribierten Gene *kin11* und *reg11* in Mutante P406 konnte die für diese Mutante festgestellte Erhöhung der MHK für Piperacillin im Vergleich zum Parentalstamm P306 aufgehoben werden (4.7). Zudem führte die Inaktivierung des für eine ATPase kodierenden Gens *nbp11* des durch das Zweikomponentensystem 11 regulierten ABC-Transporters Nbp11/Msp11 in P406 ebenfalls zum Abfall der MHK (4.9). Infolge der Beteiligung an einem Mechanismus, welcher zur höheren Resistenz gegen Piperacillin führte, wurde das TCS11-Cluster in *Streptococcus pneumoniae* R6 näher molekulargenetisch charakterisiert (4.10.1-4.10.9). Da sich jedoch die Mutante P406 von R6 auch durch Mutationen in *pbp2b*, *pbp2x* und *cpoA* unterscheidet (1.6), sollte die Beteiligung des TCS11-Clusters an einem Resistenzmechanismus gegen Piperacillin nunmehr auch im Wildtyp R6 überprüft werden. Der durch das Zweikomponentensystem 11 regulierte Promotor P_{11.1} (4.10.2) wurde hierzu durch zwei verschiedene, konstitutive Promotoren P_{vegW} (Halfmann, Dissertation 2008) und P_{vegM}, (Halfmann et al., 2007a) mit im Vergleich zu P_{11.1} (~10 β GU) hohen Aktivitäten ersetzt. P_{vegW} besitzt eine Aktivität von ~80 β GU und P_{vegM} eine Aktivität von ~900 β GU in *S. pneumoniae* R6 (Halfmann, Dissertation 2008). Hierdurch sollte die Regulation von P_{11.1} durch das Zweikomponentensystem 11 aufgehoben und die Transkription des 11-1-Operons (*smp11A*, *smp11B*, *nbp11*, *msp11* und

eventuell auch *kin11* und *reg11*; vgl. 4.10.4) im Vergleich zu Stamm R6 erhöht werden. Die vermutlich infolge der identifizierten chromosomalen Veränderung upstream des TCS11-Clusters in P406 (4.6) erhöhten Transkriptmengen der Gene des TCS11-Clusters in P406 sollten so in R6 erreicht werden. Waren erhöhte Transkriptmengen der Gene des TCS11-Clusters alleine ausreichend zur Resistenzhöhung in P406, so sollte die entsprechende Resistenzhöhung durch den Austausch von $P_{11.1}$ gegen starke konstitutive Promotoren auch in R6 hervorgerufen sein.

Durch den gleichen Austausch von $P_{11.1}$ in $R6\Delta kin11reg11$ könnte zudem, insofern der Austausch von $P_{11.1}$ in R6 zur Erhöhung der Piperacillin-Resistenz führte, die wie durch die Herstellung der *nbp11*-Deletionsmutante in P406 gezeigte, direkte Beteiligung des ABC-Transporters (4.9), kodiert durch die Gene *nbp11* und *msp11* im 11-1-Operon des TCS11-Clusters an der Piperacillin-Resistenz auch in R6 verifiziert werden.

Zudem könnte die Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ in den R6-Derivaten, in welchen $P_{11.1}$ gegen P_{vegW} oder P_{vegM} ausgetauscht wurde, die Frage klären, ob das unbekannte Substrat des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 den Stimulus, welcher vermutlich über Smp11B an die Histidin-Kinase Kin11 geleitet wird, darstellt (4.10.8.2).

Die Verwendung zweier konstitutiver Promotoren mit verschieden hoher Aktivität (P_{vegW} und P_{vegM}), könnte zeigen, inwiefern eine verschieden starke Transkription der Gene des TCS11-Clusters einen Einfluß auf den eventuell auftretenden Wachstums- und Lysephänotyp besitzt.

4.10.10.1 Ersetzen des Promotors $P_{11.1}$ in R6 und $R6\Delta kin11reg11$ durch die modifizierten Promotoren P_{vegW} und P_{vegM} aus *B. subtilis*

Der Promotor $P_{11.1}$ in R6 und $R6\Delta kin11reg11$ wurde einerseits durch den Promotor P_{vegW} und andererseits durch den Promotor P_{vegM} ersetzt werden. Beide Promotoren stellen veränderte Promotoren des *vegII*-Gens aus *B. subtilis* dar (Halfmann, Dissertation 2008; Halfmann et al., 2007a). Der Promotor $P_{11.1}$ wurde unter Verwendung der Janus-Kassette (3.11) durch P_{vegW} bzw. P_{vegM} ersetzt. Die Durchführung erfolgte ähnlich wie im Falle einer Deletion von Genen unter Verwendung der Janus-Kassette (3.11.2). Es wurden zwei Konstrukte (Konstrukt 1 und 2) hergestellt, wobei Konstrukt 1 zur Einbringung der Janus-Kassette an die Stelle des Promotors $P_{11.1}$ im Genom von R6 diente. Konstrukt 2 enthielt jedoch in diesem Fall kein vorkonstruiertes Minigen, sondern ein den Promotor P_{vegW} - bzw. P_{vegM} -tragendes DNA-Fragment zur Integration des entsprechenden Promotors am Ort von $P_{11.1}$ im Genom von R6.

Zur Herstellung von Konstrukt 1, wurden in beiden Fällen (P_{vegW} - bzw. P_{vegM}) die Primer L18xx_for und LP1rev, sowie RP1for und No_r verwendet.

Zur Herstellung von Konstrukt 2 wurden im Fall von P_{vegW} zur Amplifikation der den zu ersetzenden DNA-Bereich flankierenden Regionen die Primer L18xx_for und LP1rev, sowie RP1for2 und No_r verwendet. Durch den Primer RP1for2 wurde hierbei, abweichend zum unter 3.11.2 beschriebenen Vorgehen eine *XhoI*-Schnittstelle angefügt. Das den Promotor P_{vegW} -tragende DNA-Fragment wurde unter Verwendung der Primer *vegWf* und *vegWr* aus pPPvegW (Halfmann, Dissertation 2008) amplifiziert, wobei durch die Primer eine *BamHI*- und eine *XhoI*-Schnittstelle angefügt wurden. Nach der Restriktion der drei Fragmente wurden diese ligiert. Der Ligationsansatz konnte direkt zur wie unter 3.11.2 beschriebenen, zweiten Transformation eingesetzt werden. Beide aufeinanderfolgenden Transformationen zeigten mit 0,31 % und 0,45 % der Lebendkeimzahl, Transformationseffizienzen, wie sie unter diesen Bedingungen für Stamm R6 zu erreichen waren (4.1.2). Die so hergestellten Stämme, in dem $P_{11.1}$ durch P_{vegW} ersetzt war, wurden als $R6P_{vegW}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$ bezeichnet.

Im Fall von P_{vegM} wurde bei der Herstellung von Konstrukt 2 zur Amplifikation der den zu ersetzenden DNA-Bereich flankierenden Regionen die Primer L18xx_for und LP1rev, sowie RP1for2 und No_r verwendet. Das den Promotor P_{vegM} -tragende DNA-Fragment wurde unter Verwendung der Primer vegWf und vegMr aus pPP2vegM (Halfmann et al., 2007a) amplifiziert, wobei durch die Primer eine *Bam*HI- und eine *Xho*I-Schnittstelle angefügt wurden. Nach erfolgter Restriktion und Ligation der Fragmente konnte die zweite Transformation direkt durchgeführt werden (3.11.2). Die Transformation zeigte mit 0,38 % der Lebendkeimzahl eine unter diesen Bedingungen für R6 zu erreichende Transformationseffizienz (4.1.2). Die so hergestellten Stämme, in dem $P_{11.1}$ durch P_{vegM} ersetzt war, wurden als $R6P_{vegM}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$ bezeichnet.

Von allen vier hergestellten Stämmen wurde chromosomale DNA isoliert und die Region um die eingefügten Promotoren im Genom unter Verwendung der Primer L18xx_for und No_r zur Kontrolle amplifiziert und sequenziert.

Da in diesen Stämmen auch die Effekte der Überexpression der Gene des TCS11-Clusters auf die Aktivität der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ bestimmt werden sollten, wurden sie mit den wie unter 4.10.3 beschrieben hergestellten Promotor-Probe-Plasmiden pPP2 $P_{11.1}$ und pPP2 $P_{11.2}$ transformiert. Nach der Selektion auf D-Blutagarplatten mit 3 µg/ml Tetracyclin wurde die Integration im Genom unter Verwendung der Primer EII_fwd_Kontr und tetM_rev_Kontr mittels PCR überprüft. Die resultierenden Stämme wurden als $R6P_{vegW}P_{11.1}$, $R6P_{vegW}P_{11.2}$, $R6P_{vegM}P_{11.1}$, $R6P_{vegM}P_{11.2}$, sowie $R6\Delta kin11reg11P_{vegW}P_{11.2}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}P_{11.2}$ bezeichnet.

4.10.10.2 Wachstum von $R6P_{vegW}$, $R6P_{vegM}$, $R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$

Von R6 und den wie unter 4.10.10.1 hergestellten Derivaten von R6 und $R6\Delta kin11reg11$ wurden Kulturen wie unter 3.1.2 beschrieben in CpH8-Medium angezogen und deren Wachstum gemäß 3.1.1 dokumentiert. Die Wachstumsexperimente wurden zur Kontrolle dreifach durchgeführt. Abbildung 4.51 zeigt das beobachtete Wachstumsverhalten aller Stämme im Vergleich zu R6.

Aus Abbildung 4.51 ist zu ersehen, daß die Überexpression des kompletten TCS11-Clusters in den Stämmen $R6P_{vegW}$ und $R6P_{vegM}$, sowie die alleinige Überexpression des 11-1-Operons des TCS11-Clusters in den Stämmen $R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$ zu einem dem bereits im Fall von $R6\Delta cpoA$ (4.3.3), sowie den Deletionsmutanten des TCS11-Clusters (4.10.8.2) beobachteten, vergleichbaren Phänotyp führte:

Alle Stämme zeichneten sich durch eine längere Generationszeit, eine geringere maximale Zelldichte in der stationären Phase und eine langsamere und früher einsetzende Lyse aus. Diese Effekte konnten somit, aufgrund der Beobachtung, daß sie auch in den Stämmen in denen *kin11* und *reg11* deletiert waren ($R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$) auftraten, auf die alleinige Überexpression der im 11-1-Operon organisierten Gene *smpl1A*, *smpl1B*, *nbp11* und *msp11* zurückgeführt werden. Der Effekt auf die maximale Zelldichte war in den beiden Stämmen, in denen $P_{11.1}$ durch den stärkeren Promotor P_{vegM} ersetzt war, stärker ausgeprägt als in den beiden Stämmen, in denen $P_{11.1}$ durch mittelmäßigen Promotor P_{vegW} ersetzt war. Folglich war dieser Effekt abhängig vom Ausmaß der Überexpression der Gene des 11-1-Operons und somit in R6 abhängig von der Aktivität von $P_{11.1}$. In Tabelle 4.20 wurden die berechneten Generationszeiten g und Wachstumsraten μ zusammengefasst.

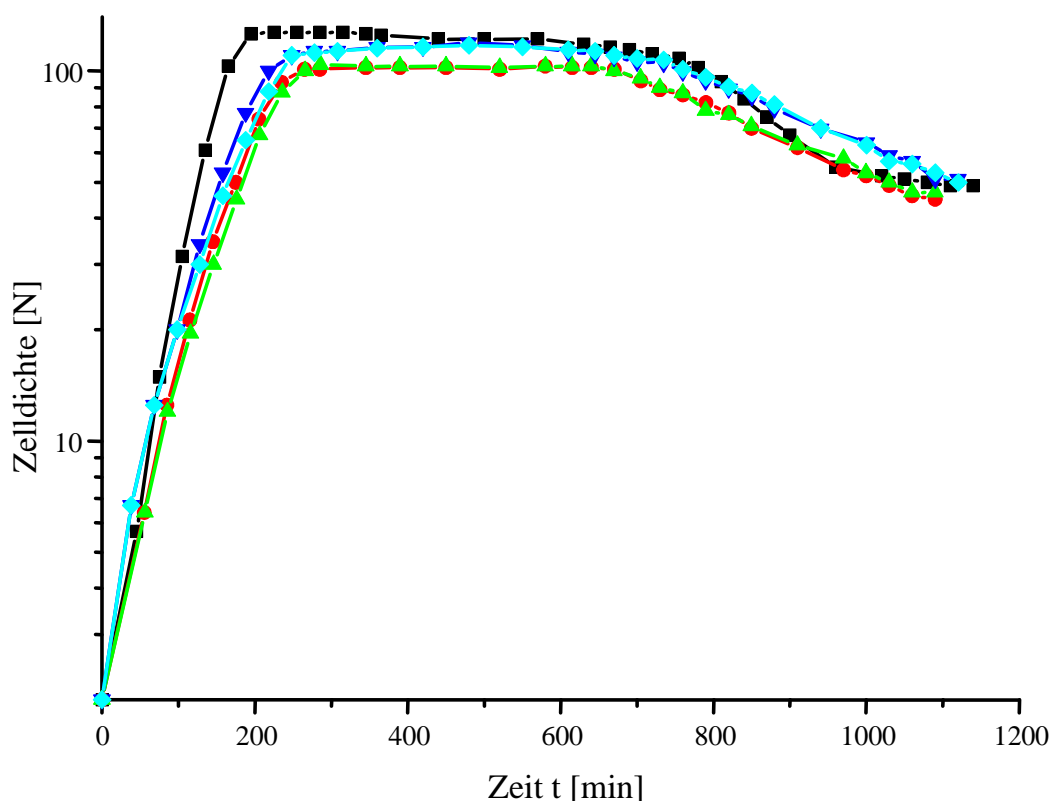


Abbildung 4.51: Wachstumsverhalten der Stämme $R6P_{vegW}$, $R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$, $R6P_{vegM}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$ im Vergleich zu Stamm $R6$: Aufgetragen wurde die Zelldichte in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min], wobei die Wachstumskurven der einzelnen Stämme auf eine Zelldichte von $N=2$ bei $t=0$ normalisiert wurden. Das Wachstum wurde bis zur Lyse in CpH8-Medium verfolgt. Die Kurven stellen Beispiele aus drei unabhängigen Experimenten dar. ■ $R6$; ● $R6P_{vegM}$; ▲ $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$; ▼ $R6P_{vegW}$; ■ $R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$.

Tabelle 4.20: Generationszeit g und Wachstumsrate μ von $R6P_{vegW}$, $R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$, $R6P_{vegM}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$ im Vergleich zu Stamm $R6$.

| Stamm | Wachstumsrate μ [min^{-1}] | Generationszeit g [min] ¹⁾ |
|-------------------------------|---|--|
| $R6$ | 0,022 | 31 |
| $R6P_{vegW}$ | 0,0124 | 55 |
| $R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$ | 0,0121 | 56 |
| $R6P_{vegM}$ | 0,0126 | 54 |
| $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$ | 0,0120 | 57 |

¹⁾ gerundet

4.10.10.3 MHK für Piperacillin von $R6P_{vegW}$, $R6P_{vegM}$, $R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$

Die erhöhten Transkriptmengen der Gene des TCS11-Clusters in P406 waren ausreichend zur Resistenzerhöhung in P406 (4.7). Die entsprechende Resistenzerhöhung sollte folglich durch das Ersetzen von $P_{11.1}$ durch P_{vegW} oder P_{vegM} auch in $R6$ hervorrufbar sein.

Durch die isolierte, mittels Austausch von $P_{11.1}$ gegen P_{vegW} , bzw. P_{vegM} verursachte Überexpression der Gene des 11-1-Operons ($R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$) sollte zudem die in P406 gezeigte, direkte Beteiligung des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 an der Piperacillin-Resistenz (4.9) auch in $R6$ verifiziert werden.

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Piperacillin der Stämme $R6$, $R6P_{vegW}$, $R6P_{vegM}$, $R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$ wurde wie unter 3.1.5

beschrieben, verfahren. Hierbei wurde auch, zum direkten Vergleich, die MHK von R6 Δ *cpoA* (4.3) erneut bestimmt. In Tabelle 4.21 wurden die ermittelten Werte der MHK für Piperacillin der einzelnen Stämme zusammengestellt.

Tabelle 4.21: MHK für Piperacillin der Stämme R6P_{vegW}, R6P_{vegM}, R6 Δ *kin11reg11P*_{vegW} und R6 Δ *kin11reg11P*_{vegM} im Vergleich zu R6 und R6 Δ *cpoA*.

| Stamm | MHK für Piperacillin [μ g/ml] |
|--|------------------------------------|
| R6 | 0,015 |
| R6 Δ <i>cpoA</i> | 0,045 |
| R6P _{vegW} | 0,05 |
| R6P _{vegM} | 0,05 |
| R6 Δ <i>kin11reg11P</i> _{vegW} | 0,045 |
| R6 Δ <i>kin11reg11P</i> _{vegM} | 0,05 |

Wie aus Tabelle 4.21 zu erkennen, zeigten alle vier Stämme, in denen das TCS11-Cluster, oder nur die Gene des 11-1-Operons überexprimiert wurden, eine im Vergleich zu R6 höhere minimale Hemmkonzentration für Piperacillin. In allen Fällen konnten, der MHK in R6 Δ *cpoA* vergleichbare, minimale Hemmkonzentrationen von 0,045 μ g/ml bzw. 0,05 μ g/ml bestimmt werden.

Somit konnte die Beteiligung des TCS11-Clusters, und hier insbesondere der durch die Gene des 11-1-Operons kodierten Proteine, an einem bisher unbekanntem Mechanismus, welcher zur Resistenzerhöhung gegen Piperacillin führte, auch im Wildtyp *Streptococcus pneumoniae* R6 nachgewiesen werden. Das Ausmaß der Resistenzerhöhung entsprach hierbei in etwa dem im Fall von R6 Δ *cpoA* beobachteten Wert (4.3) und war zudem größer als im Fall der Resistenzerhöhung in Mutante P406.

4.10.10.4 Aktivitäten der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} in R6P_{vegW}, R6P_{vegM}, R6 Δ *kin11reg11P*_{vegW} und R6 Δ *kin11reg11P*_{vegM}

Im Zuge der Bestimmung der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} und P_{11.2} in den einzelnen Deletionsmutanten des TCS11-Clusters (4.10.8.2) wurde postuliert, daß das unbekannte Substrat des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 den Stimulus zur Aktivierung der Kinase-Aktivität der Histidin-Kinase Kin11 unter Beteiligung von Smp11B darstellen könnte, woraufhin Reg11 phosphoryliert würde und somit durch die Bindung des phosphorylierten Reg11 die Transkription ausgehend von Promotor P_{11.1} stimuliert würde. Eine Überexpression der Gene des TCS11-Clusters wie in R6P_{vegW} oder R6P_{vegM} sollte demnach zu einer Abnahme der Substratkonzentration und somit zur Abnahme der Kinase-Aktivität von Kin11 führen, was letztendlich eine niedrigere Aktivität von P_{11.1} bedeutet. Für P_{11.1} konnte in Mutante P406, in welcher die Gene des TCS11-Clusters stark erhöhte Transkriptmengen aufwiesen (4.2), keine Promotor-Aktivität mehr gemessen werden (4.10.3), was für solch einen Mechanismus sprach. Promotor P_{11.2} sollte in R6P_{vegW} oder R6P_{vegM}, wie schon in P406, keine erhöhte Aktivität aufweisen.

Von Promotor P_{11.2} wurde auch in den Stämmen R6 Δ *kin11reg11P*_{vegW} und R6 Δ *kin11reg11P*_{vegM} die Aktivität bestimmt.

Die β -Galactosidase-Assays zur Bestimmung der Aktivitäten der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} wurden, wie in 3.13.2 beschrieben, durchgeführt. Die Kulturen wurden in CpH8-Medium bis zu einer Zelldichte von N=40 angezogen und je 2 ml der Kulturen zur Bestimmung der Promotoraktivitäten gemäß 3.13.2 verwendet. In Abbildung 4.52 wurden die aus zwei Experimenten gemittelten Aktivitäten des Promotors P_{11.1} in den Stämmen R6, R6P_{vegW} und

R6P_{vegM}, sowie die Aktivitäten des Promotors P_{11.2} in den Stämmen R6, R6P_{vegW}, R6P_{vegM}, R6Δ*kin11reg11*P_{vegW} und R6Δ*kin11reg11*P_{vegM} graphisch dargestellt.

Wie aus Abbildung 4.52 zu ersehen, führte die Überexpression der Gene des TCS11-Clusters in R6P_{vegW} und R6P_{vegM}, im Vergleich zu R6 zum Verlust der Promotor-Aktivität von P_{11.1}. In beiden Stämmen war keine Aktivität mehr messbar. Somit konnte die aufgrund der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} in den verschiedenen Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters aufgestellte Hypothese der Beteiligung von Smp11A und Smp11B an der Stimulus-Perzeption der Histidin-Kinase Kin11 (4.10.8.2) bestätigt werden.

Die Aktivität von Promotor P_{11.2} hingegen veränderte sich weder bei der Überexpression aller Gene des TCS11-Clusters (R6P_{vegW} und R6P_{vegM}), noch bei der isolierten Überexpression der Gene des 11-1-Operons (R6Δ*kin11reg11*P_{vegW} und R6Δ*kin11reg11*P_{vegM}; Abbildung 4.52). Eine isolierte, durch die *veg*-Promotoren hervorgerufene Überexpression der Gene des 11-1-Operons in einer *kin11reg11*-Deletionsmutante verhinderte folglich die Stimulierung von Promotor P_{11.2} durch den unbekannt Mechanismus. Fehlte diese Überexpression, wie in der *kin11reg11*-Deletionsmutante R6Δ*kin11reg11*, erfolgte hingegen die Stimulierung von P_{11.2} (4.10.8.2.3). Da die Aktivitätserhöhung von P_{11.2} unabhängig vom durch *nbp11* und *msp11* kodierten ABC-Transporters war (ausbleibende Erhöhung der Aktivität in R6Δ*nbp11* oder R6Δ*msp11*) und bereits gezeigt werden konnte, daß Smp11A und Smp11B in diese Stimulation involviert sind (4.10.8.2.3), wurde vermutet, daß dieses Ausbleiben der Aktivitätserhöhung allein durch die gleichzeitige Überexpression von Smp11A und Smp11B bedingt wurde.

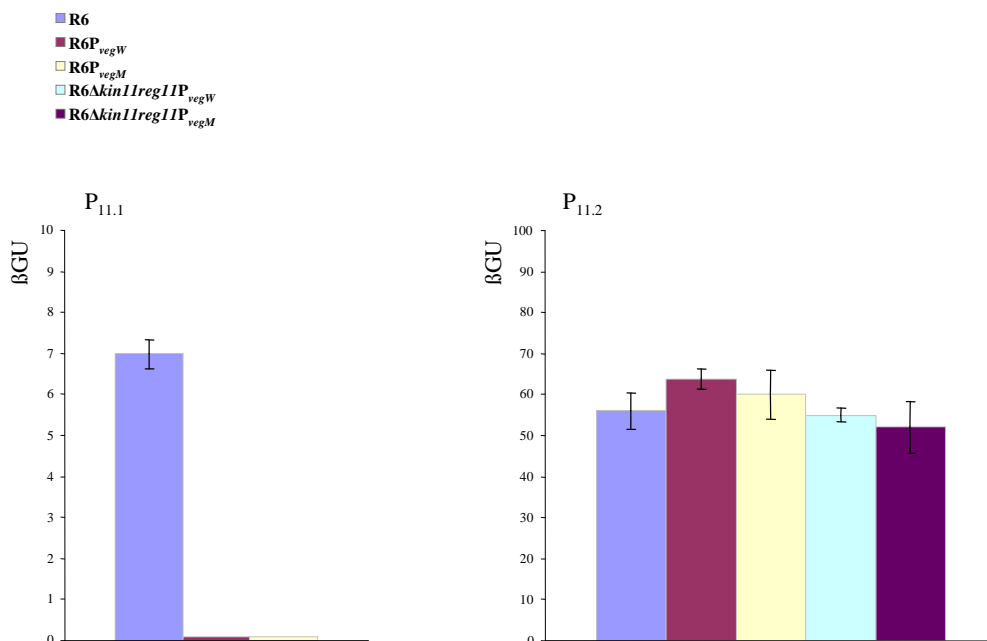


Abbildung 4.52: Graphische Darstellung der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} in R6, R6P_{vegW} und R6P_{vegM}, sowie von P_{11.2} in R6, R6P_{vegW}, R6P_{vegM}, R6Δ*kin11reg11*P_{vegW} und R6Δ*kin11reg11*P_{vegM}. Dargestellt wurden die aus zwei Experimenten gemittelten Aktivitäten der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} in β-Galactosidase-Units βGU [nmol freigesetztes ONP/(min*mg)] in den untersuchten Stämmen in CpH8-Medium bei einer Zelldichte von N=40. Fehlerbalken geben die aus zwei durchgeführten Messungen bestimmte Standardabweichung an.

Unter Berücksichtigung der Promotor-Aktivitäten von P_{11.1} und P_{11.2} in allen hergestellten Deletionsmutanten (4.10.8.2.3), konnte für den unbekannt regulatorischen Mechanismus an P_{11.2} einerseits gefolgert werden, daß er zur Aktivierung von P_{11.2} führt, wenn das Verhältnis von Smp11A und Smp11B auf die Seite von Smp11B verschoben ist (in R6Δ*smp11A*). Andererseits bleibt diese Aktivierung aus, solange die Histidin-Kinase Kin11 exprimiert wird:

In R6 Δ *reg11*, einem Stamm, in dem wie auch in R6 Δ *kin11* oder R6 Δ *kin11reg11* keine Transkription von *smp11A* und *smp11B* mehr erfolgt, wird keine Erhöhung der Aktivität von P_{11.2} beobachtet, wogegen in R6 Δ *kin11* und R6 Δ *kin11reg11* eine Stimulierung von P_{11.2} zu verzeichnen ist.

4.11 Effekte des TCS11-Clusters auf das *lic1*-Operon

Im Zuge der Mikroarray-gestützten, globalen Transkriptomanalyse der Mutanten der Familie P006 konnten für die Gene des an der Teichonsäurebiosynthese beteiligten *lic1*-Operons in Mutante P406 im Vergleich zu R6 bis zu 7,9-fach erhöhte Transkriptmengen beobachtet werden (4.2.1; 4.2.3). In Mutante P406 konnten zudem bis zu 22-fach höhere Transkriptmengen der Gene des TCS11-Clusters festgestellt (4.2.1; 4.2.3), sowie die Ursache für diese Erhöhung identifiziert werden (4.6). Der Effekt auf die Transkriptmenge der Gene des *lic1*-Operons in P406 konnte durch die Deletion der Gene *kin11* und *reg11* in P406 rückgängig gemacht werden (4.7; 4.8). Im Verlauf der molekulargenetischen Charakterisierung des TCS11-Clusters und der phänotypischen Untersuchung verschiedener Deletionsmutanten von Genen des TCS11-Clusters konnten sehr ähnliche Effekte auf Wachstum, Zelldichte, Lyse und hinsichtlich von Veränderungen im Transkriptom beobachtet werden wie in der Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* (4.10). Für die α -Galactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin-Synthase CpoA (Berg et al., 2001 und 2003; EC2.4.1.208), welche in der Lage ist, einen Galactosylrest von UDP-Galactose auf Monoglucoyldiacylglycerin zu transferieren (1.2; 1.4), wurde aufgrund der bei der Charakterisierung der Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* gemachten Beobachtungen eine Beteiligung an der Synthese des Lipidankers der Lipoteichonsäuren vermutet (4.3; 4.4). Die Übereinstimmungen der Effekte einer Deletion von *cpoA* oder von Genen des TCS11-Clusters und der Effekt von erhöhten Transkriptmengen des TCS11-Clusters auf das *lic1*-Operon in P406 führten zu der Annahme, daß die durch die Gene des TCS11-Clusters kodierten Proteine an einem Mechanismus beteiligt sein könnten, welcher entweder, wie CpoA Teil der Synthese von Lipoteichonsäuren ist, oder eine Art der Regulation von Teichonsäuren darstellt. Zur genaueren Charakterisierung des in Mutante P406 festgestellten Effekts des TCS11-Clusters auf die Transkriptmengen der Gene des *lic1*-Operons sollte zunächst die Aktivität des Promotors P1_{*spr1149*} des *lic1*-Operons (1.4) in Mutante P406 und der Deletionsmutante P406 Δ *kin11reg11* untersucht werden (4.11.1). Der zweite kartierte Promotor des *lic1*-Operons (P2_{*spr1149*}) wurde hierbei nicht untersucht. Die Beteiligung dieses Promotors an der Erhöhung der Transkriptmenge der Gene des *lic1*-Operons konnte bereits ausgeschlossen werden (Marciszewski, Diplomarbeit 2007). Ebenso konnte dort bereits eine direkte Interaktion von Reg11 mit den Promotoren P1_{*spr1149*} und P2_{*spr1149*} ausgeschlossen werden.

4.11.1 Aktivität des Promotors P1_{*spr1149*} in P406 und P406 Δ *kin11reg11*

Zur Bestimmung der Promotor-Aktivität von P1_{*spr1149*} wurde ein bereits vorhandenes pPP2 P1_{*spr1149*}-Reporter-genplasmid (Halfmann et al., 2007b) verwendet. Zur Herstellung der in den β -Galactosidase-Assays benötigten Stämme mit chromosomal integriertem P1_{*spr1149*}::*lacZ* als Reporter-gen wurde das Plasmid pPP2 P1_{*spr1149*}, wie unter 3.13.1 beschrieben, in P406 und P406 Δ *kin11reg11* transformiert und auf D-Blutagarplatten mit 3 μ g/ml Tetracyclin selektioniert. Im Anschluß erfolgte die Überprüfung der Integration laut 3.13.1. Die so hergestellten Promotor-Probe-Stämme P406P1_{*spr1149*} und P406 Δ *kin11reg11*P1_{*spr1149*} wurden in den folgenden β -Galactosidase-Assays zur Bestimmung der Promotoraktivitäten eingesetzt. Die β -Galactosidase-Assays zur Bestimmung der Aktivität des Promotors P1_{*spr1149*} wurden

wie in 3.13.2 beschrieben durchgeführt. Die Kulturen wurden in CpH8-Medium bis zu einer Zelldichte von $N=40$ angezogen und je 2ml der Kulturen zur Bestimmung der Promotoraktivitäten gemäß 3.13.2 verwendet. In Abbildung 4.53 wurden die aus zwei Experimenten gemittelten Aktivitäten des Promotors $P1_{spr1149}$ in R6, P406 und $P406\Delta kin11reg11$ graphisch dargestellt.

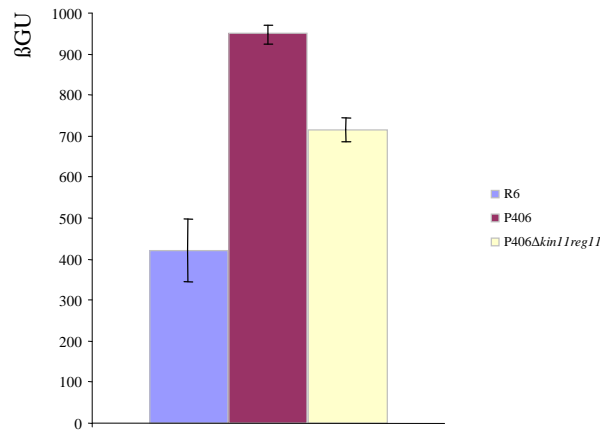


Abbildung 4.53: Aktivitäten des Promotors $P1_{spr1149}$ P406, $P406\Delta kin11reg11$ und R6. Dargestellt wurden die aus zwei Experimenten gemittelten Aktivitäten des Promotors $P1_{spr1149}$ in β -Galactosidase-Units β GU [nmol freigesetztes ONP/(min*mg)] in den untersuchten Stämmen in CpH8-Medium bei einer Zelldichte von $N=40$. Fehlerbalken geben die aus zwei durchgeführten Messungen bestimmte Standardabweichung an.

Die Bestimmung der Promotor-Aktivität von $P1_{spr1149}$ zeigte, daß sowohl in Mutante P406, als auch in Mutante $P406\Delta kin11reg11$, Promotor $P1_{spr1149}$ eine höhere Aktivität als in Stamm R6 besaß, wobei die Erhöhung der Aktivität in $P406\Delta kin11reg11$ geringer ausfiel. Im Wildtyp R6 konnte eine Aktivität von 420 β GU gemessen werden, wohingegen in P406 eine Aktivität von 950 β GU gemessen wurde. In Übereinstimmung mit dem bei der globalen Transkriptomanalyse von Mutante P406 festgestellten Anstieg der Transkriptmenge der Gene des *licI*-Operons (4.2.1), zeigte sich also auch eine Erhöhung der Promotor-Aktivität von $P1_{spr1149}$ um den Faktor 2. In $P406\Delta kin11reg11$ konnten infolge der Deletion von *kin11* und *reg11* keine erhöhten Transkriptmengen der Gene des *licI*-Operons mehr festgestellt werden (4.7; 4.8). Die Aktivität des Promotors $P1_{spr1149}$ sank jedoch im Vergleich zu P406 in $P406\Delta kin11reg11$ nur auf einen Wert von 710 β GU, erreichte also nicht den Wert von 420 β GU in Stamm R6. Eventuell reichte dieser Aktivitätsunterschied aus, um eine bis zu 7,9-fache Erhöhung der Transkriptmengen der Gene des *licI*-Operons zu verursachen oder es existierten weitere Faktoren, welche hier Einfluß nahmen. Die höhere Transkriptmenge der Gene des 11-1-Operons im TCS11-Clusters in Mutante P406 sank, vermutlich aufgrund der chromosomalen Veränderungen upstream des TCS11-Clusters (4.6), auch in $P406\Delta kin11reg11$ nicht auf die Transkriptmengen in Stamm R6 (4.8). Eventuell war dies die Ursache für die im Vergleich zu R6 immer noch höhere Aktivität $P1_{spr1149}$ in $P406\Delta kin11reg11$. Dies bedeutete jedoch, daß die Aktivität des Promotors $P1_{spr1149}$ des *licI*-Operons abhängig von der Transkriptmenge der Gene im 11-1-Operon des TCS11-Clusters und damit, da Reg11 nicht mit den Promotoren $P1_{spr1149}$ und $P2_{spr1149}$ interagierte (Marciszewski, Diplomarbeit 2007) indirekt vom durch *kin11* und *reg11* kodierten Zweikomponentensystem 11 beeinflusst wurde. Zur näheren Charakterisierung dieses Zusammenhangs sollte die Aktivität des Promotors $P1_{spr1149}$ sowohl in den hergestellten Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters (4.10.8), als auch in den Stämmen $R6P_{vegM}$, $R6P_{vegM}\Delta kin11reg11$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$, in welchen die Transkription des

kompletten TCS11-Clusters oder nur der Gene des 11-1-Operons unter der Kontrolle eines mittelstarken- bzw. starken, konstitutiven Promotors stand (4.10.10), bestimmt werden (4.11.2 und 4.11.3).

4.11.2 Einfluß von Deletionen einzelner Gene und Regionen im TCS11-Cluster auf die Aktivität von $P1_{spr1149}$

Zur Herstellung der zur Bestimmung der Aktivität von $P1_{spr1149}$ in den Deletionsmutanten verschiedener Gene des TCS11-Clusters benötigten Stämme mit chromosomal integriertem $P1_{spr1149}::lacZ$ wurde das Plasmid pPP2 $P1_{spr1149}$ (Halfmann et al., 2007b) wie unter 3.13.1 beschrieben in die Stämme $R6\Delta smp11A$, $R6\Delta smp11B$, $R6\Delta smp11AB$, $R6\Delta nbp11$, $R6\Delta msp11$, $R6\Delta msp11_3$, $R6\Delta msp11_5$, $R6\Delta kin11$, $R6\Delta reg11$, $R6\Delta inter$, $R6\Delta rupA$ aus 4.10.8.2 transformiert und auf D-Blutagarplatten mit $3\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin selektioniert. Im Anschluß erfolgte die Überprüfung der Integration laut 3.13.1. Die so hergestellten Promotor-Probe-Stämme wurden in den folgenden β -Galactosidase-Assays zur Bestimmung der Promotoraktivitäten in diesen Deletionsmutanten eingesetzt. Die β -Galactosidase-Assays zur Bestimmung der Aktivität des Promotors $P1_{spr1149}$ wurden wie in 3.13.2 beschrieben durchgeführt. Die Kulturen wurden in CpH8-Medium bis zu einer Zelldichte von $N=40$ angezogen und je 2ml der Kulturen zur Bestimmung der Promotoraktivitäten gemäß 3.13.2 verwendet. In Abbildung 4.54 wurden die aus zwei Experimenten gemittelten Aktivitäten des Promotors $P1_{spr1149}$ in den Deletionsmutanten im Vergleich zu R6 graphisch dargestellt.

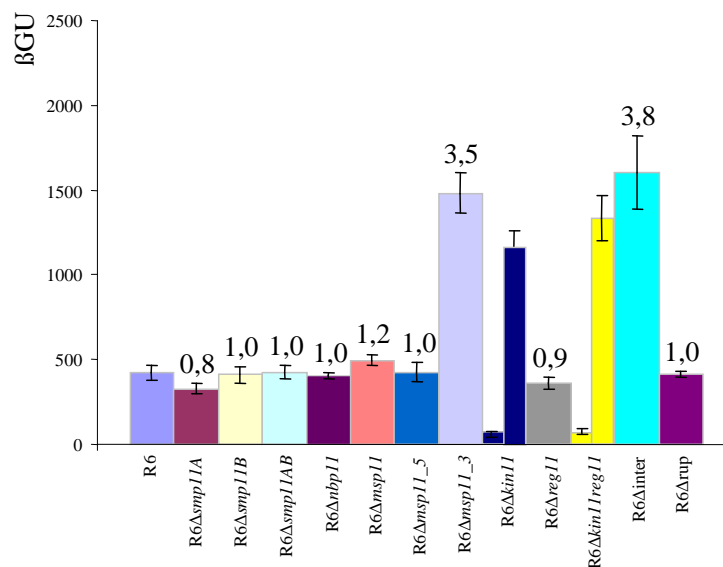


Abbildung 4.54: Aktivitäten des Promotors $P1_{spr1149}$ in verschiedenen Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters im Vergleich zu R6. Dargestellt wurden die aus zwei Experimenten gemittelten Aktivitäten des Promotors $P1_{spr1149}$ in β -Galactosidase-Units βGU [$\text{nmol freigesetztes ONP}/(\text{min}\cdot\text{mg})$] in den untersuchten Stämmen in CpH8-Medium bei einer Zelldichte von $N=40$. Fehlerbalken geben die aus zwei durchgeführten Messungen bestimmte Standardabweichung an. Für $R6\Delta kin11reg11$ und $R6\Delta kin11$ wurden die gemittelten Werte aus je zwei Experimenten mit je zwei verschiedenen Klonen dargestellt. Die Zahlen oberhalb der Säulen geben die Aktivität im jeweiligen Stamm als x-faches der Aktivität in R6 an (Faktoren wurden gerundet).

Wie aus Abbildung 4.54 zu ersehen, konnte in keinem Fall der Deletionen einzelner Gene des 11-1-Operons eine Änderung der Aktivität des Promotors $P1_{spr1149}$ im Vergleich zu R6 verzeichnet werden. Wurden jedoch einzelne Gene des 11-2-Operons, oder aber Bereiche seiner 5'- bzw. 3'-untranslatierten Region deletiert, so zeigte sich eine bis zu 3,8-fache Erhöhung der Aktivität des Promotors $P1_{spr1149}$ im Vergleich zu R6.

Hierbei war besonders auffällig, daß einerseits, im Fall der Deletion des Leaders des Transkriptes des 11-2-Operons ($R6\Delta msp11_3$) und der Deletion eines Abschnitts im 3'-untranslatierten Bereich des Transkripts des 11-2-Operons ($R6\Delta inter$), beides Deletionsmutanten mit geringerer Menge an *kin11*-Transkript als in $R6$ (4.10.8.2.4), $P1_{spr1149}$ eine 3,5- bzw. 3,8-fach höhere Aktivität als in $R6$ besaß. Andererseits führte die Deletion von *kin11* oder *kin11* und *reg11* jedoch zu erheblich unterschiedlichen Effekten auf die Aktivität von $P1_{spr1149}$ (Abbildung 4.54: Dunkelblaue-, bzw. gelbe Säulen) in verschiedenen Klonen, welche aus der gleichen Transformation zur Herstellung der entsprechenden Deletionsmutante stammten (4.10.3; 4.10.8.1). Da die Transformationseffizienzen bei den Transformationen zur Herstellung dieser Deletionsmutanten (4.10.3; 4.10.8.1) keinen Anlaß zu der Vermutung gaben, daß bei den Transformationen solche Zellen selektioniert wurden, welche durch eine spontane Mutation die Deletion der entsprechenden Gene erst ermöglichte (3.11) und da von insgesamt 5 untersuchten Transformanten im Fall von $R6\Delta kin11 reg11$ zwei eine Aktivität von $P1_{spr1149}$ von nur 50 bis 60 β GU und drei eine Aktivität von 1300 bis 1500 β GU aufwiesen, wurde vermutet, daß dieser unterschiedliche Effekt auf $P1_{spr1149}$ mit der Art des unbekanntem regulatorischen Mechanismus an diesem Promotor zusammen hängen musste und eher nicht durch eine bei der Herstellung der entsprechenden Deletionsmutante selektionierte, unbekannte Mutation verursacht war. Auch konnten Mutationen im Bereich des im Genom integrierten Reporter-gen-Konstruktes $P1_{spr1149}::lacZ$ durch entsprechende Sequenzierungen ausgeschlossen werden. Vorstellbar wäre hingegen, daß der Effekt der Einzeldelationen der Gene des 11-2-Operons jedoch für die Zelle trotzdem ein Problem darstellte und bei der Kultivierung nach den Transformationen daher relativ schnell kompensatorische Mutationen selektioniert und angereichert wurden, womit schon nach der zweistündigen Inkubation zur phänotypischen Expression nach den Transformationen (3.1.6) Mischkulturen vorliegen würden.

Dahingegen schien die Deletion von *reg11*, wie auch die einzelnen Deletionen der Gene des 11-1-Operons, keinen Einfluß auf Promotor $P1_{spr1149}$ zu haben.

Der gemeinsame Effekt in $R6\Delta kin11$, $R6\Delta kin11 reg11$, $R6\Delta msp11_3$ und $R6\Delta inter$ war eine Erhöhung der Aktivität des Promotors $P_{11.2}$ (4.10.8.2.3). In $R6\Delta kin11$ und $R6\Delta kin11 reg11$ führten die Deletionen zu einer Inaktivierung des Promotors $P_{11.1}$ und somit zur Abwesenheit der im 11-1-Operon kodierten Proteine. Eventuell stellte die An- oder Abwesenheit der im 11-1-Operon kodierten Proteine letztendlich die Ursache für die erhöhte- oder erniedrigte Aktivität von Promotor $P1_{spr1149}$ in diesen Deletionsmutanten dar. Jedoch müsste demnach auch zumindest *Smp11A* einen Einfluß auf die Aktivität von $P1_{spr1149}$ haben, da die Deletion dieses Gens ebenfalls zur Erhöhung der Aktivität von $P_{11.2}$ führte (4.10.8.2.3).

Eine klare Aussage über die Art der Abhängigkeit der Regulation an Promotor $P1_{spr1149}$, hervorgerufen durch das TCS11-Cluster, konnte folglich nicht getroffen werden. Jedoch konnte die Aktivität von Promotor $P1_{spr1149}$ in den Stämmen $R6P_{vegW}$, $R6P_{vegM}$, $R6\Delta kin11 reg11 P_{vegW}$ und $R6\Delta kin11 reg11 P_{vegM}$ (4.10.10.1) eventuell einen tieferen Einblick erlauben (4.11.3).

Der Einfluß einer verschieden starken Überexpression der Gene des TCS11-Clusters, bzw. nur des 11-1-Operons, hervorgerufen durch die unterschiedlich aktiven Promotoren P_{vegW} und P_{vegM} , konnte zumindest zeigen, ob die durch die Gene im 11-1-Operon kodierten Proteine direkt einen Einfluß auf die Aktivität von $P1_{spr1149}$ hatten.

Da für die Aktivität von $P1_{spr1149}$ in $R6$ eine Abhängigkeit von der Wachstumsphase gezeigt werden konnte (Halfmann, Dissertation 2008), sollte die Aktivität von $P1_{spr1149}$ in den Deletionsmutanten der einzelnen Gene des TCS11-Cluster im Vergleich zur Aktivität in $R6$ zu mehreren Zeitpunkten der Wachstumskurve bestimmt werden. Hierbei wurde die Aktivität von $P1_{spr1149}$, wie unter 3.13.2 beschrieben, in $R6\Delta smp11A$, $R6\Delta nbp11$, $R6\Delta msp11_3$, $R6\Delta reg11$ und $R6\Delta inter$ bestimmt. Die Experimente wurden zweifach durchgeführt.

$R6\Delta kin11$ und $R6\Delta kin11reg11$ wurden hierbei aufgrund der unterschiedlichen Effekte in verschiedenen Klonen nicht mit einbezogen. In Abbildung 4.55 wurde das repräsentative Ergebnis eines Experiments graphisch dargestellt.

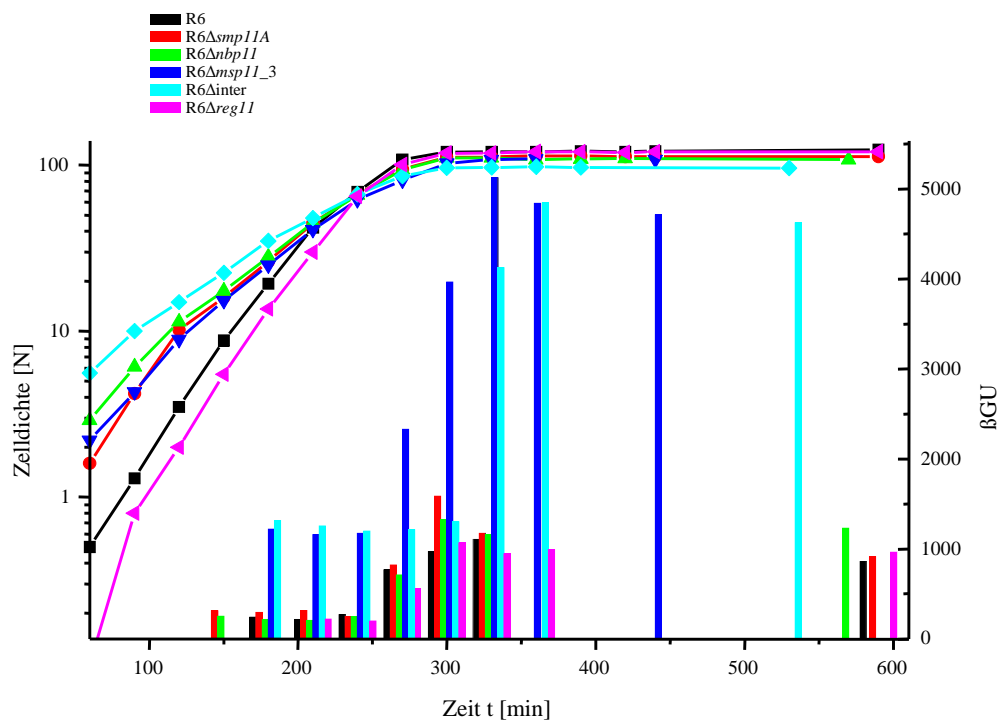


Abbildung 4.55: Aktivitäten des Promotors $P1_{spr1149}$ in Deletionsmutanten verschiedener Gene des TCS11-Clusters in Abhängigkeit der Wachstumsphase. Dargestellt wurden die Aktivitäten des Promotors $P1_{spr1149}$ als β -Galactosidase-Units β GU [nmol freigesetztes ONP/(min*mg)] in Deletionsmutanten verschiedener Gene des TCS11-Clusters bei Wachstum in CPH8-Medium in Abhängigkeit der Zeit t [min], sowie die zugehörigen Zellichten in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min]. Die Wachstumskurven wurden auf den Eintritt in die stationäre Phase, welcher mit der von Promotor $P1_{spr1149}$ beobachteten Aktivitätserhöhung in R6 einhergeht, normalisiert. Säulen: Promotor-Aktivitäten zum Zeitpunkt t . Die Wachstumskurven und Promotor-Aktivitäten stellen Beispiele aus zwei durchgeführten Experimenten dar.

Die Wachstumskurven der einzelnen Stämme wurden in Abbildung 4.55 auf den Eintritt in die stationäre Phase normalisiert, da dieser mit dem Zeitpunkt der Aktivitätserhöhung von $P1_{spr1149}$ einhergeht. Deutlich ist beim Vergleich des Verlaufs der Promotor-Aktivität zwischen den einzelnen Stämmen in Abbildung 4.55 zu sehen, daß die Aktivität von $P1_{spr1149}$ in den Stämmen $R6\Delta msp11_3$ und $R6\Delta inter$ bereits vor dem Eintritt in die stationäre Phase ungefähr um den Faktor 4 im Vergleich zu R6 erhöht war. Ähnlich wie in R6 erhöhte sich die Aktivität in diesen beiden Stämmen am Übergang in die stationäre Phase. Diese Erhöhung trat jedoch früher ein und resultierte in einer erneut im Vergleich zu R6 ca. 4-fach höheren Aktivität in beiden Stämmen. Die bekannte Regulation an $P1_{spr1149}$ wurde folglich nicht aufgehoben, sondern es zeigte sich eine generelle Erhöhung der Aktivität im Vergleich zur jeweiligen, Wachstumsphasen-abhängigen Aktivität in R6. Alle weiteren Deletionsmutanten zeigten keinen signifikanten, von R6 abweichenden Effekt auf die Aktivität von $P1_{spr1149}$.

Da von Promotor $P1_{spr1149}$ eine Regulation durch das Zweikomponentensystem CiaRH bekannt war (1.2; 1.4), sollte überprüft werden, inwiefern das Zweikomponentensystem CiaRH in die in $R6\Delta msp11_3$ (und somit eventuell auch in P406 und $R6\Delta inter$) beobachtete Aktivitätsänderung von $P1_{spr1149}$ verwickelt war. Hierzu sollte die Aktivität des durch CiaRH regulierten Promotors P_{htrA} (Halfmann et al 2007b) in $R6\Delta msp11_3$ und R6 untersucht werden. Beide Promotoren $P1_{spr1149}$ und P_{htrA} werden durch direkte Bindung des

phosphorylierten Response-Regulators CiaR induziert. Sollte die Erhöhung der Aktivität des Promotors $P_{spr1149}$ in $R6\Delta msp11_3$ durch eine erhöhte Aktivität des Zweikomponentensystems CiaRH erfolgen, so müsste dies auch mit einer Erhöhung der Aktivität von P_{htrA} einhergehen. Die beiden hierzu benötigten Promotor-Probe-Stämme $R6\Delta msp11_3 P_{htrA}$ und $R6 P_{htrA}$ wurden, wie unter 3.13.1 beschrieben, durch Transformation mit dem den P_{htrA} -tragenden Promotor-Probe-Plasmid pPP2htrA (Halfmann et al., 2007b) hergestellt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte laut 3.13.2 und wurde zweifach durchgeführt. In Abbildung 4.56 wurde der Verlauf der Aktivität von P_{htrA} in Abhängigkeit der Wachstumsphase in beiden Stämmen graphisch dargestellt.

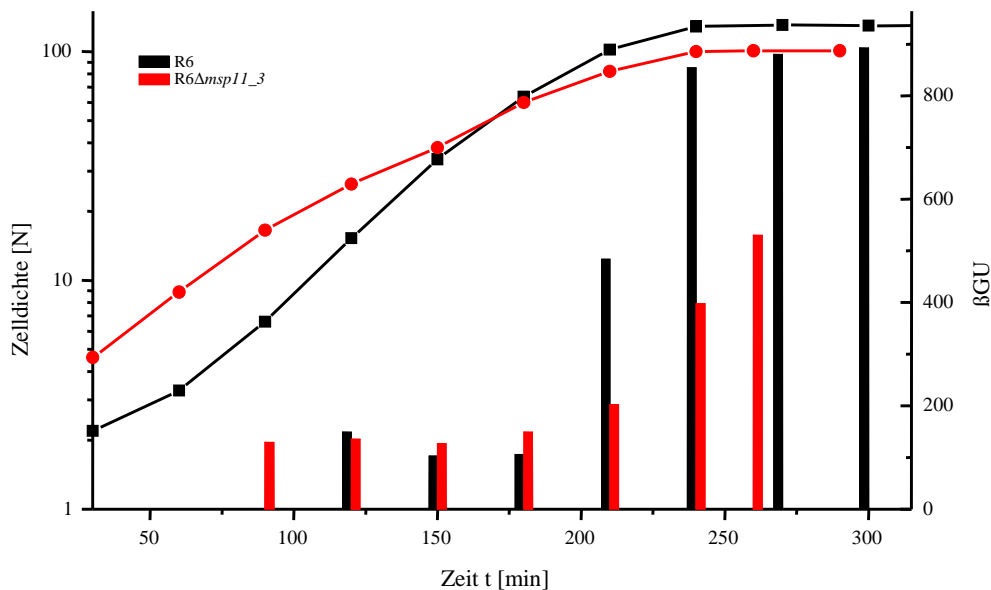


Abbildung 4.56: Aktivität des Promotors P_{htrA} in $R6\Delta msp11_3$ im Vergleich zu R6 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase. Dargestellt wurden die Aktivitäten des Promotors P_{htrA} als β -Galactosidase-Units β GU [nmol freigesetztes ONP/(min*mg)] in $R6\Delta msp11_3$ und R6 bei Wachstum in CpH8-Medium in Abhängigkeit der Zeit t [min], sowie die zugehörigen Zelldichten in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min]. Wachstumskurven wurden auf den Eintritt in die stationäre Phase, welcher mit der von P_{htrA} beobachteten Aktivitäts-Erhöhung in R6 einhergeht, normalisiert. Säulen: Promotor-Aktivitäten zum Zeitpunkt t. Wachstumskurven und Promotor-Aktivitäten stellen ein Beispiel aus zwei Experimenten dar.

Da von P_{htrA} in R6 eine von CiaRH abhängige Erhöhung der Aktivität ab dem Übergang in die stationäre Phase festgestellt wurde (Halfmann, Dissertation 2008), wurden die Wachstumskurven auch hier auf den Übergang zur stationären Phase normalisiert. Wie aus Abbildung 4.56 zu ersehen, zeigte dieser Promotor in $R6\Delta msp11_3$ nicht die wie im Fall von $P_{spr1149}$ beobachtete Erhöhung der Aktivität im Vergleich zu R6. Die beschriebene CiaRH-abhängige Erhöhung der Aktivität in der stationären Phase fiel hier sogar geringer aus als in R6. Folglich handelte es sich bei dem auf den Promotor $P_{spr1149}$ wirkenden Effekt infolge verschiedener Deletionen im TCS11-Cluster nicht um einen über das Zweikomponentensystem CiaRH laufenden Mechanismus. Die CiaRH-abhängige Regulation scheint jedoch beeinflusst zu werden.

Der Einfluß des TCS11-Clusters auf die Transkription der Gene des *lic1*-Operons stellte folglich einen bisher unbekanntem Mechanismus der Regulation der an der Teichonsäurebiosynthese beteiligten Gene des *lic1*-Operons in *Streptococcus pneumoniae* R6 dar.

4.11.3 Einfluß der Überexpression des TCS11-Clusters auf $P1_{spr1149}$

Im Zuge der Bestimmung der Promotor-Aktivität von $P1_{spr1149}$ in den verschiedenen Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters (4.11.2) wurde aufgrund der dort beobachteten Effekte letztendlich ein Zusammenhang zwischen den Genen des 11-1-Operons und der veränderten Promotor-Aktivität von $P1_{spr1149}$ vermutet. Die gegensätzlichen Effekte im Fall von verschiedenen Klonen der Deletionsmutanten $R6\Delta kin11reg11$ und $R6\Delta kin11$ konnten letztendlich in der Art des unbekanntem regulatorischen Mechanismus begründet sein. Vermutet wurde, daß eventuell die Höhe der Expression der Gene des TCS11-Clusters alleine für den Effekt auf $P1_{spr1149}$ verantwortlich war. Durch die Bestimmung der Aktivität von $P1_{spr1149}$ in den unter 4.10.10.1 hergestellten R6-Derivaten, in welchen entweder das TCS11-Cluster komplett ($R6P_{vegW}$, $R6P_{vegM}$), oder die Gene des 11-1-Operons isoliert ($R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$, $R6\Delta kin11reg11P_{vegM}$) in verschieden hohem Maße überexprimiert wurden, konnte überprüft werden, ob der durch das TCS11-Cluster ausgeübte Effekt auf $P1_{spr1149}$ durch Kin11 und Reg11 direkt oder aber über die kodierten Proteine des 11-1-Operons verursacht wurde und ob es eine Abhängigkeit von der Stärke der Überexpression gab.

Zur Herstellung der zur Bestimmung der Promotor-Aktivität von $P1_{spr1149}$ in diesen vier R6-Derivaten benötigten Stämme, wurde das Plasmid pPP2 $P1_{spr1149}$ in alle zu testenden Ausgangsstämme, wie unter 3.13 beschrieben, transformiert. Hierbei entstanden die Stämme $R6P_{vegW} P1_{spr1149}$, $R6P_{vegM} P1_{spr1149}$, $R6\Delta kin11reg11P_{vegW} P1_{spr1149}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegM} P1_{spr1149}$. Die Durchführung der β -Galactosidase-Assays erfolgte laut 3.11.2 zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumsphase. In den Abbildungen 4.57 und 4.58 wurden die so erhaltenen Aktivitäten von $P1_{spr1149}$ in Abhängigkeit der Wachstumsphase in den verschiedenen Stämmen dargestellt.

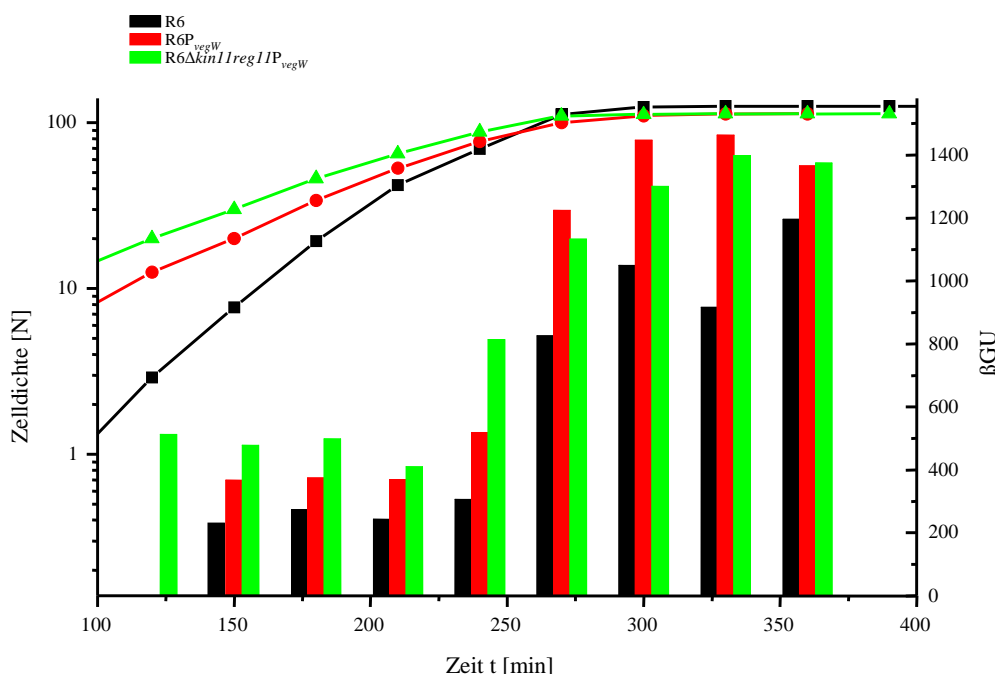


Abbildung 4.57: Aktivität des Promotors $P1_{spr1149}$ in $R6P_{vegW}$ und $R6\Delta kin11reg11P_{vegW}$ im Vergleich zu R6 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase. Dargestellt wurden die Aktivitäten des Promotors $P1_{spr1149}$ als β -Galactosidase-Units β GU [nmol freigesetztes ONP/(min*mg)] bei Wachstum in CpH8-Medium in Abhängigkeit der Zeit t [min], sowie die zugehörigen Zellichten in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min]. Die Wachstumskurven wurden auf den Eintritt in die stationäre Phase, welcher mit der von Promotor $P1_{spr1149}$ beobachteten Aktivitäts-Erhöhung in R6 einhergeht, normalisiert. Säulen: Promotor-Aktivitäten zum Zeitpunkt t. Wachstumskurven und Aktivitäten stellen ein Beispiel aus zwei Experimenten dar.

Aus dem Vergleich der Aktivitäten in Abhängigkeit von der Wachstumsphase von $P1_{spr1149}$ in R6, $R6P_{vegW}$ und $R6\Delta kin11reg1IP_{vegW}$ in Abbildung 4.57 war zu erkennen, daß eine moderate Überexpression sowohl des kompletten TCS11-Clusters ($R6P_{vegW}$), als auch nur der Gene des 11-1-Operons ($R6\Delta kin11reg1IP_{vegW}$), zu einer Erhöhung der Aktivität von $P1_{spr1149}$ zu jedem gemessenen Zeitpunkt der Wachstumsphase führte. Folglich war die über den unbekanntem regulatorischen Mechanismus vermittelte Regulation von $P1_{spr1149}$ abhängig von den im 11-1-Operon kodierten Genen und somit von der Funktion der Genprodukte.

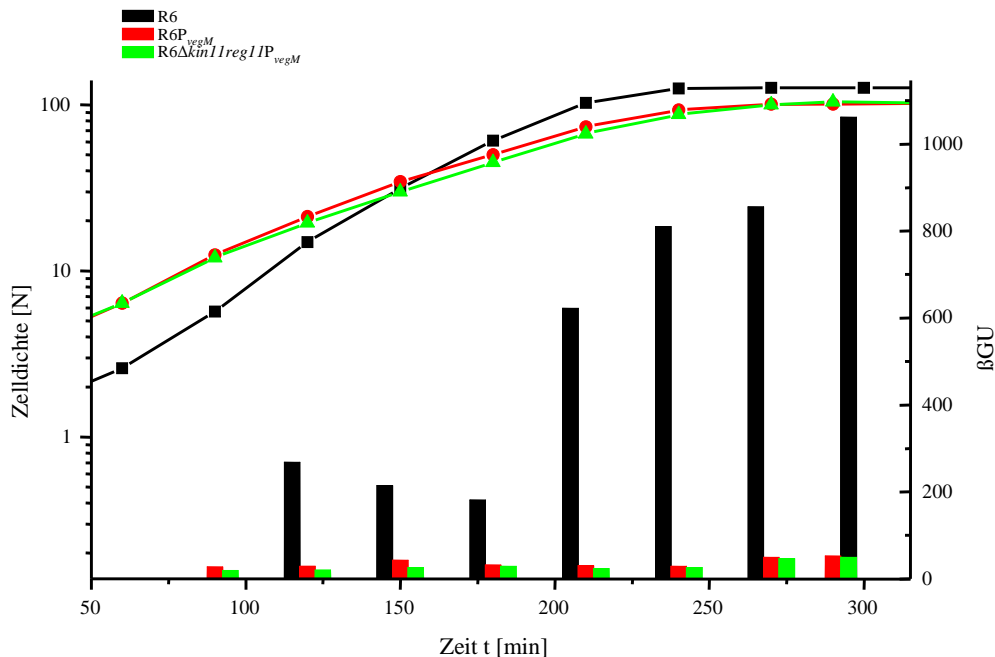


Abbildung 4.58: Aktivität des Promotors $P1_{spr1149}$ in $R6P_{vegM}$ und $R6\Delta kin11reg1IP_{vegM}$ im Vergleich zu R6 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase. Dargestellt wurden die Aktivitäten des Promotors $P1_{spr1149}$ als β -Galactosidase-Units β GU [nmol freigesetztes ONP/(min*mg)] bei Wachstum in CpH8-Medium in Abhängigkeit der Zeit t [min], sowie die zugehörigen Zell-dichten in Nepheloeinheiten [N] als Funktion der Zeit t [min]. Die Wachstumskurven wurden auf den Eintritt in die stationäre Phase, welcher mit der von Promotor $P1_{spr1149}$ beobachteten Aktivitäts-Erhöhung in R6 einhergeht, normalisiert. Säulen: Promotor-Aktivitäten zum Zeitpunkt t . Wachstumskurven und Aktivitäten stellen ein Beispiel aus zwei Experimenten dar.

Aus dem Vergleich der Aktivitäten in Abhängigkeit von der Wachstumsphase von $P1_{spr1149}$ in R6, $R6P_{vegM}$ und $R6\Delta kin11reg1IP_{vegM}$ in Abbildung 4.58 war zu erkennen, daß eine starke Überexpression sowohl des kompletten TCS11-Clusters ($R6P_{vegM}$), als auch nur der Gene des 11-1-Operons ($R6\Delta kin11reg1IP_{vegM}$), zu einem Verlust der Aktivität des Promotors $P1_{spr1149}$ führte. Dies zeigte, daß die über den unbekanntem regulatorischen Mechanismus vermittelte Regulation von $P1_{spr1149}$ nicht nur abhängig von den im 11-1-Operon kodierten Genen und somit von der Funktion der Genprodukte war, sondern eigentlich auch (in R6) in erheblichem Maße von der Aktivität des Zweikomponentensystems 11 und der dadurch regulierten, vorhandenen Menge des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 und der beiden putativen Membranproteine Smp11A und Smp11B.

Der funktionelle Zusammenhang zwischen TCS11-Cluster und den Genen des an der Teichonsäurebiosynthese beteiligten *licI*-Operons konnte somit nachgewiesen werden, wobei die Art des ihn vermittelnden regulatorischen Mechanismus jedoch noch der Aufklärung bedarf.

5. Diskussion

5.1 Die Glykosyltransferase CpoA

5.1.1 Beitrag zur Piperacillin-Resistenz

Der unklare Effekt der Deletion eines Adenosin-Restes in Mutante P106

Die Glykosyltransferase CpoA wurde als Teil eines Resistenzmechanismus gegen Piperacillin in einer Mutante von *S. pneumoniae* (P106) beschrieben, welcher unabhängig von den eigentlichen Targets der β -Lactame, den Penicillin-Bindeproteinen (Pbbs), ist (1.2). Die höhere Resistenz gegen Piperacillin ging einher mit einer reduzierten genetischen Kompetenz und geringeren Mengen des Penicillin-Bindeproteins Pbp1a. Bisherige biochemische Untersuchungen zu CpoA lassen eine Teilnahme an der Synthese des Lipidankers von Lipoteichonsäuren (LTA) vermuten (Edman et al., 2003). Die physiologische Funktion, sowie der Mechanismus, welcher zur Resistenzhöhung führt, konnten bisher jedoch nicht geklärt werden.

In diesem Zusammenhang ergaben sich aus den bis heute angestellten Untersuchungen und aus der Tatsache, daß bisher weder der Transkriptions- noch der Translationsstartpunkt von *cpoA* bekannt war, ungelöste Fragen in Bezug auf die Expression von CpoA in P106, ohne deren Beantwortung die Aufklärung des Resistenzmechanismus nicht möglich ist (1.6; Grebe et al., 1997).

In Mutante P106 führte die Deletion eines Adenosin-Restes im DNA-Bereich zwischen zwei putativen Translationsstartpunkten von *cpoA* zur Resistenzhöhung (1.6).

Einerseits wurde berichtet, daß in der Mutante P106 in Western-Analysen kein CpoA mit polyklonalen Anti-CpoA-Antikörpern mehr nachzuweisen war. Somit würde die beschriebene Deletion die Expression von CpoA beeinflussen und letztendlich eine zumindest stark verringerte Menge von CpoA die Effekte hervorrufen. Andererseits war jedoch keine Inaktivierung des *cpoA*-Gens oder einer weiteren, im Genom von *S. pneumoniae* direkt downstream von *cpoA* durch *spr0982* kodierten, Glykosyltransferase durch Insertionsmutagenese möglich (Grebe et al., 1997). Dies wiederum deutete auf eine essentielle Funktion von CpoA oder Spr0982, welche laut den Arbeiten von Berg et al. (2001) und Edman et al. (2003) in der Lage sind, aus UDP-Glucose, UDP-Galactose und Diacylglycerin die beiden Hauptglycolipide der Zellmembran von *S. pneumoniae*, Monoglucosyl-Diacylglycerin (GlcDAG) und Galactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin (GalGlcDAG; Kaufman et al., 1965; Brundish et al., 1965a und 1965b), zu synthetisieren. Beides könnten auch Zwischenstufen des aus Glucosyl-AATGalactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin bestehenden Lipidankers von Lipoteichonsäuren (1.2; 1.4) darstellen. Gegen eine essentielle Funktion von CpoA sprach hingegen eine von Song et al. (2005), durch Ersetzen der einzelnen Gene mit einer Kanamycinresistenz-Kassette erhaltene Liste essentieller Gene aus *S. pneumoniae*, welche *cpoA* als nicht essentiell, jedoch *spr0982* als essentiell auswies.

Aufgrund der Datenlage wurde nunmehr vermutet, daß die von Grebe et al. (1997) verfolgte Strategie zur Deletion von *cpoA*, aufgrund von Effekten auf die Translation des downstream liegenden *spr0982*-Gens nicht erfolgreich war. Dies würde den Widerspruch von nicht detektierbarem CpoA in Mutante P106 zur nicht möglichen Deletion von *cpoA* aufklären und könnte bedeuten, daß die in Mutante P106 identifizierte Deletion tatsächlich zu einer erheblich geringeren, wenn nicht komplett ausbleibenden Expression von CpoA führt.

Die Deletion von *cpoA* führt zur Resistenz gegen Piperacillin in R6

Zur weiteren Charakterisierung der Beteiligung von CpoA am Resistenzmechanismus gegen Piperacillin einerseits und der Funktion von CpoA andererseits, war die Charakterisierung einer *cpoA*-Deletionsmutante unverzichtbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem erneuten Versuch zur Herstellung einer *cpoA*-Deletionsmutante eine Strategie angewendet, welche die Effekte auf die downstream von *cpoA* kodierte, essentielle Glycosyltransferase Spr0982 minimieren sollte:

cpoA konnte durch Herstellung einer In-frame Deletion problemlos deletiert werden (4.3.2). Die bei der Konstruktion der Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* erreichten Transformationseffizienzen von 0,55 % bzw. 0,69 % demonstrierten, daß die Inaktivierung von CpoA kein Problem für die Zellen darstellte (3.11). Folglich war CpoA nicht essentiell. Die Deletionsmutante zur weiteren Charakterisierung des Resistenzmechanismus gegen Piperacillin konnte somit bereit gestellt werden.

Durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Piperacillin der Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* konnte die von Grebe et al. (1997) gezeigte Beteiligung von CpoA an einem unbekanntem Mechanismus zur Piperacillin-Resistenz in Mutante P106 endgültig bestätigt werden (4.3.3.4):

Sowohl Mutante P106, deren Unterschied im Vergleich zum Parentalstamm R6 einzig in der beschriebenen Deletion des Adenosin-Restes bestand, als auch R6 Δ *cpoA*, zeigten einen vergleichbaren Anstieg der MHK von Piperacillin. Im Fall von R6 Δ *cpoA* war der Anstieg der MHK zudem leicht höher als in P106 (Tabelle 4.5, 4.3.3.4). Eine stärkere Ausprägung des von P106 bekannten Phänotyps in R6 Δ *cpoA* konnte auch in Bezug auf weitere Effekte beobachtet werden (4.3.3; 5.1.2), was dafür sprach, daß die in P106 zur Piperacillin-Resistenz führende Deletion eines Adenosin-Restes nicht zum kompletten Ausfall der CpoA-Expression führte, sie jedoch erheblich reduzierte. Zu diesen Effekten zählte auch die von P106 beschriebene Abnahme der Proteinmenge von Pbp1a. Die Menge an Pbp1a nahm in der Reihenfolge R6, P106, R6 Δ *cpoA* ab (4.3.3.5). Die verringerte Menge des Pbp1a in R6 Δ *cpoA* musste ihre Ursache auf translationeller- bzw. posttranslationeller Ebene haben, denn die mittels Real-Time PCR bestimmten Transkriptmengen von *pbp1a* zeigten im Vergleich zwischen R6 und R6 Δ *cpoA* keinen signifikanten Unterschied (4.3.3.5).

Der ausgeprägtere Phänotyp von R6 Δ *cpoA* im Vergleich zu Mutante P106 war ein Indiz für eine stark verringerte, jedoch nicht komplett ausbleibende Expression von CpoA infolge der beschriebenen Deletion des Adenosin-Restes. Um die Ursache des Effektes dieser Deletion auf die Expression von CpoA besser zu verstehen, wurde der Transkriptionsstartpunkt von *cpoA* kartiert (4.3.1). Hierdurch konnte zumindest zwischen einem die Transkription oder die Translation betreffenden Effekt unterschieden werden. Da ein Adenosin-Rest downstream des annotierten Startkodons GTG als Transkriptionsstart identifiziert werden konnte, konnte zumindest dieses GTG als Translationsstart ausgeschlossen werden. Zudem konnte hierdurch gezeigt werden, daß die Mutation auf dem *cpoA*-Transkript liegt und die nicht mehr nachweisbare Expression von CpoA in P106 folglich durch einen Effekt auf die Translation hervorgerufen wird. Der Transkriptionsstart wäre identisch mit der ersten Position eines der verbleibenden putativen Startkodons (ATG), welche up- und downstream der in P106 beschriebene Mutation liegen. Für beide putativen Startkodons wären Mechanismen denkbar, welche zur verminderten Translation von *cpoA* führen würden (4.3.1). Ohne die Kenntnis des Translationsstarts von *cpoA* konnte der Effekt der Deletion des Adenosin-Rests in P106 auf die Translation von *cpoA* jedoch nicht genauer untersucht werden.

Der Mechanismus, welcher infolge der Deletion von *cpoA* zur höheren Resistenz gegen Piperacillin in *S. pneumoniae* führt, ist ohne eine nähere Kenntnis der eigentlichen Funktion

von CpoA nicht nachvollziehbar. Im Zuge einer globalen Transkriptomanalyse und einer eingehenden phänotypischen Charakterisierung der Deletionsmutante R6 Δ cpoA wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die eigentliche Funktion von CpoA zu beschreiben (5.1.2). Hieraus ergaben sich auch Hinweise auf den zur Resistenz gegen Piperacillin führenden Mechanismus.

5.1.2 Die physiologische Funktion von CpoA

Grebe et al. (1997) vermuteten aufgrund von Homologie-Vergleichen mit bereits beschriebenen Glycosyltransferasen eine Beteiligung von CpoA an der Synthese von Lipoteichonsäuren (LTA; vgl. 1.2 und 1.4). In Mutante P106 wurde bereits eine verringerte Fähigkeit zur Entwicklung der natürlichen genetischen Kompetenz beobachtet (Grebe et al., 1997), welche ihre Ursache durchaus in einer veränderten Struktur oder einer veränderten Menge von Teichonsäuren (TA) haben könnte. So berichteten Zhang et al. (1999), daß die Inaktivierung des einzigen, nicht-essentiellen Gens (*licD2*) des an der Synthese von TA beteiligten *lic*-Clusters in *S. pneumoniae* (1.4) zu einem Verlust der natürlichen genetischen Kompetenz führt. Die Notwendigkeit von Cholin in TA (1.4) zur Ausbildung der genetischen Kompetenz konnte zuvor auch schon von Tomasz (1968) gezeigt werden.

Hinweise auf eine Beteiligung an der Lipoteichonsäure- (LTA) Synthese

Sollte CpoA tatsächlich an der Synthese von LTA beteiligt sein, so müsste die Deletion von *cpoA* in R6 ebenfalls einen Effekt auf die Kompetenz haben. Dies konnte durch die Kompetenz-Testung der Deletionsmutante R6 Δ cpoA bestätigt werden (4.3.3.3). Auch R6 Δ cpoA zeigte, wie schon Mutante P106 (4.1.2) eine verringerte genetische Kompetenz. Jedoch wurden bisher eine Vielzahl weiterer Ursachen beschrieben, welche zur Verminderung oder zum Ausfall der genetischen Kompetenz führen können. Zahlreiche Defekte der Mechanismen, welche zur Aufnahme, der Prozessierung und zur Integration von exogener DNA notwendig sind, sollen hier nur als Beispiel genannt werden (Claverys et al., 2006 und Referenzen). Aufgrund der biochemischen Charakterisierung von CpoA (Edman et al., 2003) war die Beteiligung an solchen Mechanismen jedoch eher unwahrscheinlich und die Beteiligung an der Synthese einer Strukturkomponente der Zellhülle, wie z.B. LTA plausibler.

TA sind neben der Entwicklung der genetischen Kompetenz noch für eine Reihe weiterer Funktionen essentiell (1.4). Sollte CpoA an der LTA-Synthese beteiligt sein, so müsste die Deletion von *cpoA* auch auf diese Funktionen einen Effekt zeigen. Hierzu zählen unter anderem die durch LytA vermittelte Autolyse (1.4), die Bindung von zweiwertigen Kationen (insbesondere für die Aktivität vieler Enzyme benötigte Mg²⁺-Ionen) und die Säuretoleranz. Auf all diese unter Beteiligung von TA vermittelten Eigenschaften hatte die Deletion von *cpoA* ebenfalls einen dramatischen Effekt (4.3.3):

- R6 Δ cpoA zeigte im Vergleich zum Parentalstamm R6 eine erheblich längere Generationszeit. Dieser Defekt konnte durch die Erhöhung der Mg²⁺-Ionenkonzentration im Medium komplett kompensiert werden (4.3.3.2).
- R6 Δ cpoA zeigte im Vergleich zu R6 eine erheblich verminderte Säuretoleranz (4.3.3.2), wobei auch dieser Defekt durch eine höhere Mg²⁺-Ionenkonzentration im Medium kompensiert werden konnte.
- R6 Δ cpoA zeichnete sich zudem durch eine stark verlangsamte Lyserate bei der spätstationären, LytA-vermittelten Autolyse aus (4.3.3.1).

Diese Ergebnisse konnten alle auf eine Veränderung der TA in R6 Δ *cpoA* hinweisen. Zwar waren die beobachteten Effekte der *cpoA*-Deletion einzeln gesehen nicht als spezifische Phänomene infolge veränderter TA zu werten, jedoch war das gleichzeitige Auftreten all dieser Effekte mehr als ein Hinweis.

Aus den von Mutante P106 und Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* durchgeführten globalen Transkriptomanalysen ergab sich zudem ein weiterer Hinweis, welcher ebenfalls für diese Vermutung sprechen könnte (4.4).

So zeigte sich, daß infolge einer Deletion von *cpoA* unter anderem solche Gene eine höhere Transkriptmenge aufwiesen, welche für an der Synthese von Glycerophosphat und Glycerin-3-Phosphat beteiligte Enzyme kodieren. Glycerophosphat und Glycerin-3-Phosphat stellen Vorstufen zur Synthese von Phospho- und Glycolipiden dar. Der Lipidanker der LTA besteht aus einem Glycolipid (1.4). Zudem wurde der phänotypisch beobachtete Kompetenz-Defekt und der Lysedefekt von P106 und R6 Δ *cpoA* auch im Transkriptom sichtbar. Fast alle bisher beschriebenen Gene des Kompetenzregulons (Dagkessamanskaia et al., 2004; Peterson et al., 2004; 1.5) zeigten eine erheblich verminderte Transkriptmenge. Unter diesen Genen befindet sich auch das auf intakte TA angewiesene Cholinbindeprotein CbpD, welches im Zusammenspiel mit LytA essentiell für die Autolyse ist, der kompetenzinduzierten Form der Autolyse (1.5). In R6 Δ *cpoA* zeigte mit PcpA noch ein weiteres Cholinbindeprotein, dessen Funktion jedoch noch nicht charakterisiert wurde, eine erniedrigte Transkriptmenge.

Sowohl die phänotypischen Effekte der *cpoA*-Deletion als auch einige Effekte im Transkriptom von P106 und R6 Δ *cpoA* könnten mit TA in Verbindung gebracht werden. Jedoch stellen diese Effekte lediglich Hinweise und keinesfalls einen Beweis für eine Beteiligung von CpoA an der Synthese von LTA dar.

Modell zur physiologischen Funktion von CpoA

An dieser Stelle soll unter Berücksichtigung der erhaltenen Hinweise zur physiologischen Funktion von CpoA und unter Einbezug der von Berg et al. (2001) und Edman et al. (2003) gelieferten biochemischen Charakterisierung der Glycosyltransferasen CpoA und Spr0982 ein Modell zur physiologischen Funktion von CpoA vorgestellt und diskutiert werden. Hieraus ergibt sich auch ein Mechanismus, welcher infolge der *cpoA*-Deletion zur Erhöhung der Resistenz gegen Piperacillin führen würde.

Die Cytoplasmamembran von *S. pneumoniae* besteht zu ca. 2/3 aus den beiden Phospholipiden Phosphatidylglycerin und Cardiolipin (Verhältnis 1:1) und zu 1/3 aus den Glycolipiden Monoglucosyl-Diacylglycerin (GlcDAG) und Galactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin (GalGlcDAG; Verhältnis 1:100; Brundish et al., 1965a und 1965b).

Berg et al. (2001) konnten zeigen, daß die im Genom von *S. pneumoniae* downstream von *cpoA* kodierte Glycosyltransferase Spr0982 den Transfer eines Glucosyl-Restes von UDP-Glucose auf Diacylglycerin katalysiert, womit GlcDAG entsteht, welches den quantitativ kleineren Anteil an Glycolipiden in *S. pneumoniae* darstellt (Abbildung 5.1). Edman et al. (2003) charakterisierten CpoA als α -Galactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin-Synthase, welche den Transfer eines Galactosyl-Restes von UDP-Galactose auf das von Spr0982 synthetisierte GlcDAG katalysiert. Hierdurch entsteht das unter den Glycolipiden in der Cytoplasmamembran von *S. pneumoniae* quantitativ vorherrschende Glycolipid GalGlcDAG. Die allgemein akzeptierte Struktur von LTA und deren Lipidanker (1.4, Abbildung 1.2), sowie die Überlegungen zur Synthese von LTA gehen davon aus, daß die aus mit Phosphocholin substituiertem Glc-AATGal-GalNAc-GalNAc-RitP bestehende Repeating Unit nach Export durch die Flippase TacF durch ein noch unbekanntes Enzym auf den Glc-AATGal-Glc-Linker des Lipidankers transferiert wird (1.4; Damjanovic et al., 2007). CpoA könnte aufgrund der von Edman et al. (2003) beschriebenen Funktion als α -Galactosyl-Glucosyl-Diacylglycerin-Synthase an der Synthese des Lipidankers von LTA beteiligt sein (Abbildung 5.1). Hieraus ergibt sich jedoch zwangsläufig die Frage, warum CpoA einen

Galactosyl-Rest auf das GlcDAG transferieren und dieser Galactosyl-Rest erst im Anschluß durch mehrere Reaktionen zu einem AATGal-Rest modifiziert werden sollte. Von Hexosyl-Resten, welche die Linkerregion von Lipidankern der LTA bilden, wurde bisher nur berichtet, daß sie in ihrer endgültigen Form durch entsprechende Glucosyltransferasen auf das Diacylglycerin transferiert werden. So transferiert YpfP in *S. aureus* direkt die beiden Glucosyl-Reste des Linkers in zwei aufeinander folgenden Reaktionen (Kiriukhin et al., 2001). Denkbar wäre, daß die von Edman et al. (2003) als CpoA-Substrat beschriebene UDP-Galactose nicht das eigentliche- bzw. nicht das einzige Substrat von CpoA und folglich womöglich AATGal das natürliche Substrat darstellt. Die Beteiligung von CpoA an der Synthese des Linkers des LTA-Lipidankers war zwar vorstellbar, jedoch keineswegs eindeutig. Zudem konnten die in R6Δ*cpoA* beobachteten Effekte aufgrund einer wie in Abbildung 5.1 dargestellten Beteiligung von CpoA an der LTA-Synthese nur schwer erklärt werden.

Jedoch sprachen die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung von R6Δ*cpoA* eindeutig für einen Effekt auf die Teichonsäuren.

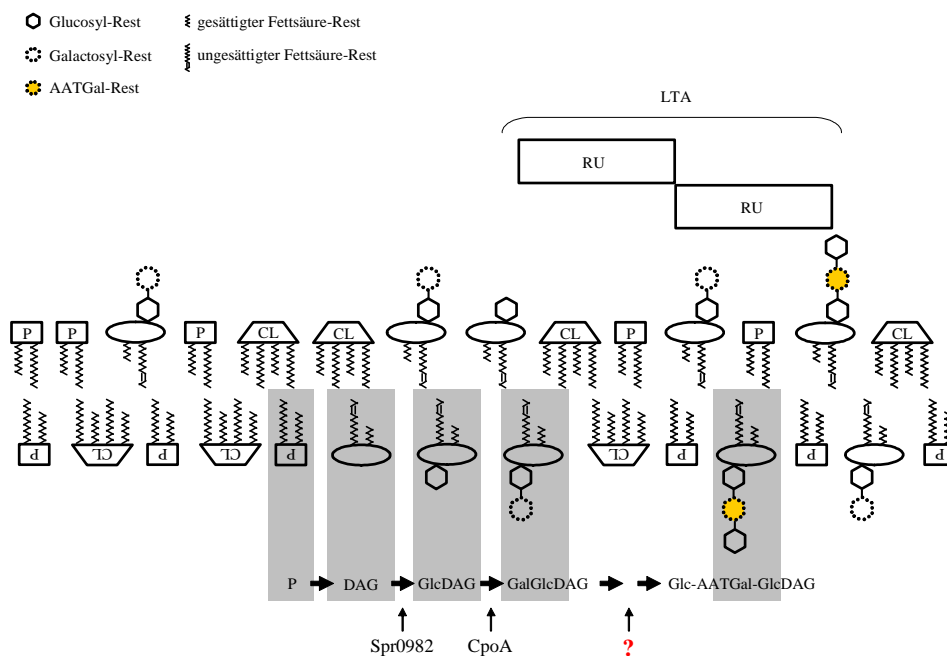


Abbildung 5.1: Auf der bisher allgemein akzeptierten Struktur von LTA basierendes Modell zur Beteiligung von CpoA und Spr0982 an der Synthese des Linkers des LTA-Lipidankers. Die Cytoplasmamembran von *S. pneumoniae* besteht hauptsächlich aus P, CL, GlcDAG und GalGlcDAG. P wird zu DAG umgewandelt. Auf DAG wird durch Spr0982 ein Glucosyl-Rest transferiert und auf das entstandene Glycolipid GlcDAG wird durch CpoA ein Galactosyl-Rest transferiert, womit das Glycolipid GalGlcDAG entsteht. GalGlcDAG könnte nach Modifikation und den Transfer eines weiteren Glucosyl-Restes zum Lipidanker der LTA werden. Die hierfür verantwortlichen Enzyme sind bisher nicht charakterisiert (?). P: Phosphatidylglycerin; CL: Cardiolipin; DAG: Diacylglycerin; Glc: Glucosyl-Rest; Gal: Galactosyl-Rest; AATGal: 2-Acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-Galactosyl-Rest; RU: Repeating Unit von Teichonsäuren bestehend aus AATGal-GalNAc-GalNAc-RitP; LTA: Lipoteichonsäure. GalNAc: N-Acetyl-Glucosamin-Rest.

Ein weiteres Problem stellte die Tatsache dar, daß bis heute kein Glycolipid aus *S. pneumoniae* isoliert werden konnte, welches den AATGal-Rest beinhaltet (Fischer, 2000; Seo et al., 2008). Dies könnte bedeuten, daß in *S. pneumoniae* kein Glycolipid mit diesem modifizierten Hexosyl-Rest existiert.

Durch eine kürzlich erschienene Publikation wird die Funktion von CpoA in Bezug auf die Synthese des Lipidankers von LTA jedoch deutlicher. Das allgemein akzeptierte Modell zur Struktur und Synthese der LTA in *S. pneumoniae* muss vermutlich in Bezug auf die Definition der Repeating Units und der Linker-Region des LTA-Lipidankers revidiert werden, wobei die eigentliche Struktur der LTA jedoch unverändert bleibt (Abbildung 5.2). Seo et al. (2008) berichteten, daß eine Repeating Unit nicht von einem Ribitol-Rest bis zu einem Glycosyl-Rest reicht (Glc-AATGal-GalNAc-GalNAc-RitP, vgl. Abbildung 1.2 in 1.4), sondern von GalNAc bis AATGal (GalNAc-GalNAc-RitP-Glc-AATGal, Abbildung 5.2).

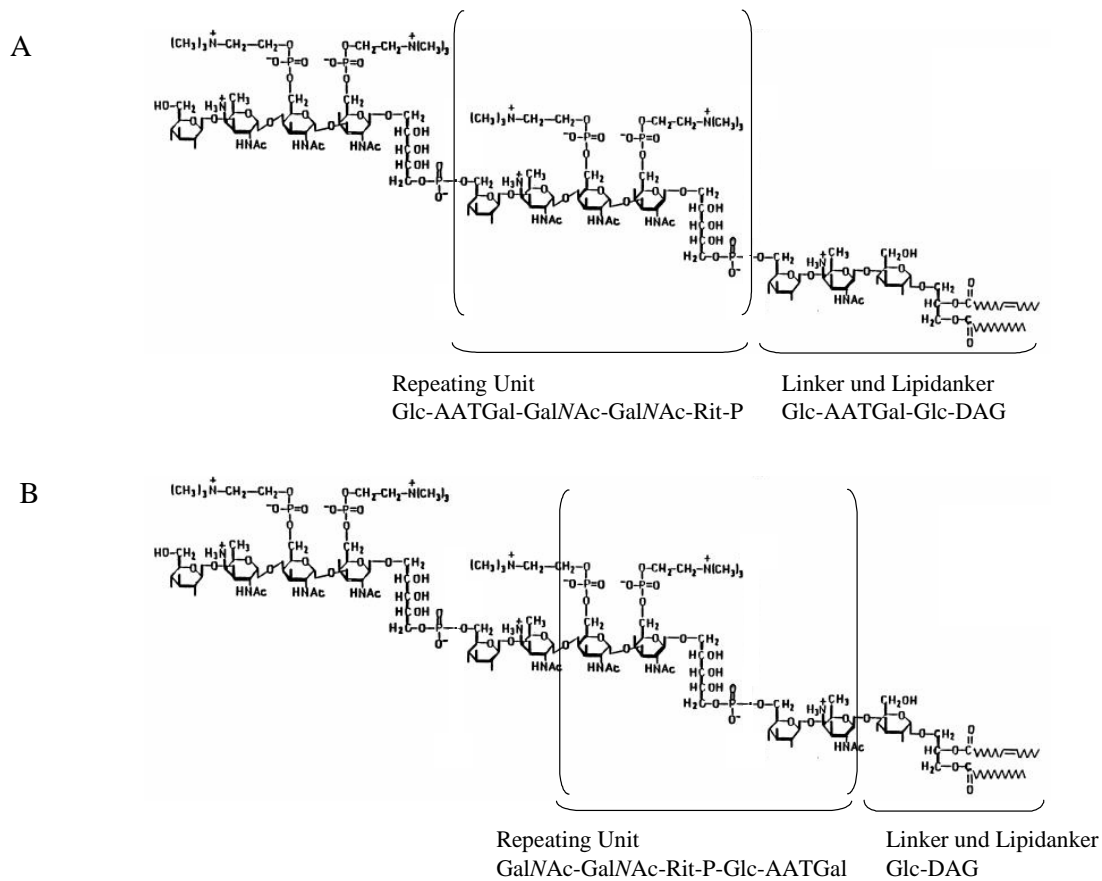


Abbildung 5.2: Bisher allgemein akzeptierte- (A) und modifizierte Struktur (B) von Lipoteichonsäuren. Dargestellt wurde jeweils die Struktur von je zwei aufeinander folgenden Repeating Units von LTA nach beiden Modellen. Die nach den beiden Modellen in der Definition ihres Anfangs und Endes unterschiedlichen Repeating Units wurden zur Veranschaulichung in eckigen Klammern dargestellt. Die Abfolge der einzelnen Zucker- und Ribitol-Reste in LTA ändert sich durch die neue Sichtweise nicht. Der Lipidanker besteht jedoch folglich nicht aus Glc-AATGal-Glc-DAG, sondern lediglich aus GlcDAG. Glc: Glucosyl-Rest; AATGal: 2-Acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-Galactosyl-Rest; GalNAc: N-Acetylgalactosaminyl-Rest; RitP: Ribitolphosphat; DAG: Diacylglycerin (Lipidanker); ChoP: Cholinphosphat-Rest. Aus: Yother et al., 1998, modifiziert.

Dies hat zum Teil erhebliche Konsequenzen für die Biosynthese von LTA. So werden keine Repeating Units eines Glc-AATGal-GalNAc-GalNAc-RitP-Typs, sondern Repeating Units in Form von GalNAc-GalNAc-RitP-Glc-AATGal durch TacF exportiert (1.4). Weitgehendere Konsequenzen hat dies jedoch für die Struktur des LTA-Glycolipidankers. Er besteht folglich nicht, wie bisher angenommen aus Glc-AATGal-Glc-Diacylglycerin, sondern lediglich aus GlcDAG, dem selteneren Glycolipid in der Cytoplasmamembran von *S. pneumoniae*. Hieraus ergibt sich für die Biosynthese des Glycolipidankers von LTA ein relativ simples Modell des Synthesewegs (Abbildung 5.3).

Phosphatidylglycerin wird (vermutlich durch das Genprodukt von *spr0434*; Edman et al., 2003) zu Diacylglycerin (DAG) umgewandelt. Die Glycosyltransferase Spr0982 katalysiert den Transfer des Glucosyl-Restes, womit GlcDAG entsteht. Hiermit ist die Synthese des Lipidankers von LTA bereits abgeschlossen. Spr0982 wäre somit die Glycosyltransferase, welche für die Konversion eines der Haupt-Phospholipide (Phosphatidylglycerin) zu einem der Haupt-Glycolipide (GlcDAG) mit verantwortlich ist. GlcDAG ist das im Vergleich zu GalGlcDAG weitaus seltenere Glycolipid in *S. pneumoniae* (Verhältnis 1:100). CpoA katalysiert bekanntlich den Transfer eines Galactosyl-Restes auf GlcDAG, womit GalGlcDAG entsteht.

CpoA scheint somit nicht direkt an der Biosynthese des Lipidankers von LTA beteiligt zu sein, sondern limitiert vielmehr durch die katalysierte Reaktion den Anteil von GlcDAG im Glycolipid-Pool der Zellmembran und somit die verfügbare Menge an LTA-Lipidanker.

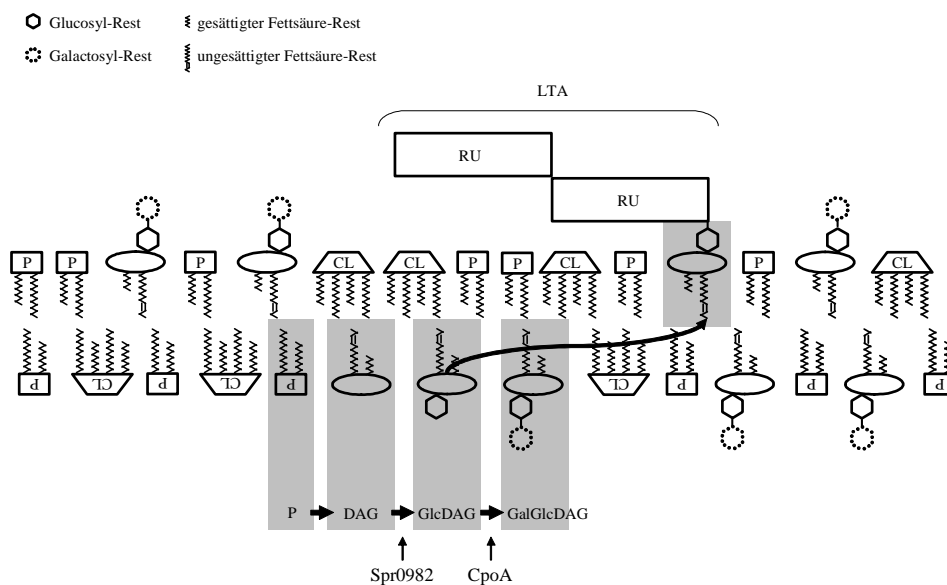


Abbildung 5.3: Modell zur Beteiligung von CpoA und Spr0982 an der Synthese des LTA-Lipidankers. P wird zu DAG umgewandelt. Auf DAG wird durch Spr0982 ein Glucosyl-Rest transferiert. Hierdurch entsteht der Glycolipidanker der LTA. CpoA transferiert auf das entstandene Glycolipid GlcDAG einen Galactosyl-Rest, womit das Glycolipid GalGlcDAG entsteht, welches keinen Lipidanker für LTA darstellt. P: Phosphatidylglycerin; CL: Cardiolipin; DAG: Diacylglycerin; Glc: Glucosyl-Rest; Gal: Galactosyl-Rest; RU: Repeating Unit von Teichonsäuren bestehend aus AATGal-GalNAc-GalNAc-RitP-Glc-AATGal; LTA: Lipoteichonsäure. GalNAc: N-Acetyl-Glucosamin-Rest. AATGal: 2-Acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-Galactosyl-Rest.

Durch die CpoA-vermittelte Limitierung der verfügbaren Menge an LTA-Lipidanker (Verhältnis GlcDAG:GalGlcDAG=1:100), wird zwangsläufig auch die Menge an LTA in der Zellwand von *S. pneumoniae* limitiert und reguliert (Verhältnis LTA:TA=10:90; 1.4). Bei entsprechender Regulation von Transkription, Translation bzw. Aktivität dieses Enzyms, würde dies einen effektiven Mechanismus darstellen, um die verfügbare Menge an GlcDAG und somit die Menge an LTA zu regulieren. Von Edman et al. (2003) wurden erste Hinweise auf eine Regulation von CpoA beschrieben. Die CpoA-Aktivität wurde durch Phosphatidylglycerin stimuliert, wohingegen Cardiolipin keinen Effekt zeigte. Eine Regulation des LTA/WTA-Verhältnisses in der Zellwand auf der Ebene des zur kovalenten Bindung der Repeating Units der LTA benötigten Glycolipids, könnte in jedem Fall effektiver und schneller verlaufen als durch eine Regulation im extrazellulären Bereich der Zellwand. Zudem ist bekannt, daß WTA einzig in der äquatorialen Zellwand-Wachstumszone

synthetisiert und an das hier neu synthetisierte Peptidoglycan gebunden werden (Tomasz et al., 1975). Der WTA-Anteil im WTA-Peptidoglycan-Komplex wird nach der Synthese nicht mehr verändert. Folglich bliebe als einzige Möglichkeit der Regulation des LTA/WTA-Verhältnisses die Regulation der LTA-Menge. Ob neben CpoA noch weitere Glycosyltransferasen in *S. pneumoniae* existieren, welche die Synthese des Glycolipids GalGlcDAG aus GlcDAG *in vivo* katalysieren, bliebe fraglich.

Unabhängig davon, ob CpoA die einzige Glycosyltransferase dieser Art in *S. pneumoniae* darstellt, würden diese Zusammenhänge für die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte *cpoA*-Deletionsmutante bedeuten, daß das Verhältnis von GlcDAG zu GalGlcDAG auf alle Fälle zugunsten von GlcDAG verschoben würde. Eine direkte Folge hiervon wäre ein Überangebot von LTA-Lipidanker, was zu einem, im Vergleich zum Parentalstamm R6 höheren Anteil von LTA an den TA führen könnte. Zumindest auf transkriptioneller Ebene gab es keine Anzeichen dafür, daß in *R6ΔcpoA* die Synthese von Repeating Units induziert wurde. Keines der bekannten, für die TA-Biosynthese essentiellen Gene zeigte eine erhöhte Transkriptmenge bei der globalen Transkriptomanalyse (4.4).

Mit dem in Abbildung 5.3 gezeigten Modell wäre zudem zu erklären, weshalb *spr0982* essentiell ist und nicht deletiert werden kann (Song et al., 2005). Die Deletion von *spr0982* hätte zur Folge, daß weder GlcDAG, noch GalGlcDAG, ausgehend von Phosphatidylglycerin synthetisiert werden könnte. Folglich wäre eine Synthese von LTA aus den einzelnen Repeating Units nicht möglich, da kein Lipidanker zur Verfügung stünde. Die einzige Möglichkeit, LTA aus Repeating Units zu synthetisieren, bestünde eventuell in der direkten kovalenten Bindung an DAG, wie im Fall von *S. aureus* beschrieben (Kiriukhin et al., 2001). Eine erhöhter Anteil von LTA im Vergleich zu WTA in *R6ΔcpoA* könnte den in dieser Deletionsmutante beobachteten negativen Effekt auf die Autolyse erklären:

LytA benötigt zur Hydrolyse von Peptidoglycan die Anwesenheit von mit Cholinphosphat substituierter WTA (Vollmer, 2007 und Referenzen). Eine hohe Cholin-Konzentration des Mediums oder die Zugabe von mit Cholinphosphat substituierter LTA verhindert die Bindung von LytA an WTA und verhindert hierdurch die Degradation des Peptidoglycans und die Lyse der Zelle (Briese & Hakenbeck, 1983; Briese & Hakenbeck, 1985; Guidicelli & Tomasz, 1984). Ein wie für *R6ΔcpoA* geforderter, erhöhter Anteil von LTA in der Zellwand sollte einen vergleichbaren Effekt erzielen.

Ein größerer Anteil von LTA in *R6ΔcpoA* könnte zudem für die in 4.3.3.2 gezeigte Mg^{2+} -Abhängigkeit und pH-Suszeptibilität verantwortlich sein. WTA binden zweiwertige Kationen wie Mg^{2+} und stellen sie für enzymatische Reaktionen bereit, wobei LTA für die Interaktion von an WTA gebundenem Mg^{2+} mit der Zellmembran verantwortlich ist (Hughes et al., 1973). Das Verschieben des Gleichgewichts zwischen LTA und WTA könnte zu einer weniger effektiven Rekrutierung freier Mg^{2+} -Ionen durch WTA führen und so den höheren Bedarf an Mg^{2+} von *R6ΔcpoA* erklären. Die erhöhte Suszeptibilität gegenüber Veränderungen des pH-Wertes infolge von Veränderungen der Zusammensetzung von WTA und LTA wurde bereits eingehend in *S. aureus* und *B. subtilis* beschrieben (Neuhaus & Baddiley, 2003 und Referenzen) und steht im engen Zusammenhang mit der Fähigkeit von TA, Kationen wie Mg^{2+} aus der Umgebung zu akquirieren. Eine Störung des Verhältnisses von LTA zu WTA wie für *R6ΔcpoA* vermutet, könnte zu der beobachteten pH-Suszeptibilität führen.

Möglicher Mechanismus der Resistenzerhöhung infolge der *cpoA*-Deletion

Die Resistenzerhöhung infolge der *cpoA*-Deletion (4.3.3.4) könnte, basierend auf dem Modell zur physiologischen Funktion von Spr0982 und CpoA (Abbildung 5.3) nunmehr folgende Ursache haben:

Effekte einer defekten- oder inhibierten Autolyse in *S. pneumoniae* auf die Resistenz gegen Penicillin sind bereits beschrieben (1.2). Dieses Phänomen wurde jedoch aufgrund der Tatsache, daß solche Mutanten zwar in Gegenwart von Penicillin nicht lysieren, jedoch die

Lebendkeimzahl zwar langsamer, aber trotzdem abnimmt, als Toleranz bezeichnet. Sollte die *cpoA*-Deletion tatsächlich eine Erhöhung der LTA-Menge bewirken, so könnte die hierdurch resultierende Verzögerung der Autolyse in *R6ΔcpoA* eine Ursache der beobachteten moderaten Erhöhung der Resistenz gegen Piperacillin darstellen.

Weitere Ursache der phänotypischen Effekte in *R6ΔcpoA*

Einzelne phänotypische Eigenschaften der Deletionsmutante *R6ΔcpoA* werden jedoch wahrscheinlich nicht durch den vermuteten Effekt der *cpoA*-Deletion auf die Zusammensetzung der TA verursacht. So wurde bereits gezeigt, daß LTA keinen Einfluß auf die Generationszeit oder auch die maximal erreichbare Zelldichte von *S. pneumoniae* haben (Höltje & Tomasz, 1975). *R6ΔcpoA* oder auch Mutante P106 zeigen jedoch eine wesentlich längere Generationszeit als der Parentalstamm R6 (4.3.3.1; 4.1.1).

Die Glycosyltransferasen Spr0982 und CpoA sind nach dem vorgestellten Modell (Abbildung 5.3) maßgeblich an der Synthese der beiden Hauptglycolipide GlcDAG und GalGlcDAG in *S. pneumoniae* beteiligt. Die Phospho- und Glycolipid-Zusammensetzung der Cytoplasmamembran von Bakterien hat, verursacht durch die Eigenschaft der verschiedenen Phospho- und Glycolipide, in wässriger Lösung eher Monolayer oder eher Bilayer zu bilden, Effekte auf eine Vielzahl von Membran-assoziierten physiologischen Funktionen. Diese Eigenschaft der verschiedenen Membranlipide wird dabei durch den Aufbau der Kopfgruppe der Phospho- und Glycolipide verursacht. Die Zusammensetzung hat beispielsweise Einfluß auf die Aktivierung und Lokalisation von Membran-gebundenen Proteinen, den Transmembrantransport, die Stabilität des Bilayers der Cytoplasmamembran und die Antwort auf verschiedene Stressbedingungen (Dowham, 1997 und Referenzen). Die Regulation des Verhältnisses der verschiedenen Phospho- und Glycolipide in der Membran stellt neben der Modifikation der Fettsäuren der Lipide ein wichtiges Instrument der Adaption auf Umwelteinflüsse in Bakterien dar:

In Gram-negativen Bakterien werden solche Eigenschaften der Membran durch die Variation der Phospholipid-Zusammensetzung erreicht. So wurden beispielsweise Effekte variierender Phosphatidylglycerin-Anteile in Membranen auf die Generationszeit oder die maximal erreichbare Zelldichte in *E. coli* beschrieben (Hiraoka et al., 1993).

In Gram-positiven Bakterien wird die Integrität der Cytoplasmamembran wahrscheinlich durch die Konversion von GlcDAG (einem Monolayer-formenden Glycolipid) in GlcGlcDAG (einem Bilayer-formenden Glycolipid; Lindblom et al., 1983) beeinflusst (Jorasch et al., 1998; Kiriukhin et al., 2001).

Im Zellwand-freien *Acholeplasma laidlawii* werden die Eigenschaften der Cytoplasmamembran zu einem großen Teil durch die Regulation des Verhältnisses von GlcDAG zu GlcGlcDAG reguliert (Lindblom & Rilfors, 1992; Lindblom et al., 1993). Insbesondere infolge von Temperaturschwankungen wird GlcDAG zu GlcGlcDAG (bei hohen Temperaturen) oder GlcGlcDAG zu GlcDAG (bei niedrigen Temperaturen) umgewandelt. Vor dem Hintergrund, daß *A. laidlawii* keine gesättigten Fettsäuren synthetisieren kann, stellt dies ein wichtiges Instrument zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität in Abhängigkeit von der Temperatur dar.

GlcGlcDAG konnte in *S. pneumoniae* bisher nicht nachgewiesen werden (Brundish & Baddiley, 1965a und 1965b; Trombe et al., 1979). Die Haupt-Glycolipide sind hier GlcDAG und GalGlcDAG. GalGlcDAG könnte jedoch das GlcGlcDAG-Analog in *S. pneumoniae* darstellen. Da CpoA für die Synthese von GalGlcDAG aus GlcDAG verantwortlich zu sein scheint, ist anzunehmen, daß die Deletion von *cpoA* Effekte auf die durch die Phospho- und Glycolipid-Zusammensetzung vermittelten Eigenschaften der Cytoplasmamembran hat. Die Piperacillin-resistenten Mutanten der Familie P006 wurden bei 30°C selektioniert (Laible & Hakenbeck, 1987). Die Mutation in *cpoA* wurde bereits in der ersten Selektionsstufe

beobachtet (Mutante P106; 1.6) und führt zur Abwesenheit nachweisbarer Mengen des Proteins (1.6; 5.1.1). Folge hiervon scheint nach dem Modell zur Funktion von CpoA (Abbildung 5.3) eine Verschiebung des Verhältnisses von GlcDAG:GalGlcDAG zugunsten von GlcDAG zu sein. GlcDAG als Monolayer-formendes Glycolipid ist in *A. laidlawii* ebenfalls bei tieferen Temperatur das vorherrschende Glycolipid und hilft so die Fluidität der Membran aufrecht zu erhalten (Lindblom et al., 1993). Eventuell reagiert *S. pneumoniae* ähnlich unter anderem durch eine Anpassung des GlcDAG-GalGlcDAG-Verhältnisses auf spezifische Umweltfaktoren.

Die *cpoA*-Deletion führt folglich zu zwei (nicht voneinander trennbaren) primären Effekten:

Einerseits beeinflusst die Deletion von *cpoA* die Zusammensetzung des Glycolipid-Pools der Cytoplasmamembran. Bereits dies hat Auswirkungen auf die von der Lipid-Zusammensetzung der Membran abhängigen, membran-assoziierten Funktionen wie beispielsweise Transportmechanismen, von welchen auch in hohem Maß Quorum-Sensing-Systeme wie das Kompetenz-Regulon, das *blp*-Bacteriocincluster und das *cyl*-Cluster abhängig sind. Auf diese drei Systeme hatte die *cpoA*-Deletion erhebliche Effekte, was auf dramatische Weise im Transkriptom der *cpoA*-Deletionsmutante sichtbar wurde (4.3.3.3 und 4.4). Zudem scheinen durch die *cpoA*-Deletion noch weitere, jedoch bisher uncharakterisierte Transport-Systeme, welche von der Zusammensetzung der Membran beeinflusst werden könnten, betroffen zu sein (4.4; *spr0097-spr0107*, *spr0276-spr0282*, *spr0639-spr0641* (putativer Cu-Transport), *ytrA*-Cluster, *spr1546-spr1549*, *fatCD* und *fecE* (Fe-Transport)). Andererseits beeinflusst die Deletion von *cpoA* durch die Veränderung der Glycolipidzusammensetzung der Membran vermutlich unmittelbar die LTA-Menge der Zellwand und somit die Funktion des Kompetenzregulons und der Cholinbindeproteine, was einerseits durch den beobachteten Kompetenz-Defekt in $R6\Delta cpoA$ und andererseits durch die erheblich veränderten Transkriptmengen der Gene des Kompetenzregulons und einiger Cholinbindeproteine im Transkriptom von $R6\Delta cpoA$ deutlich wird (4.3.3.3; 4.4).

5.2 Die Beteiligung des TCS11-Clusters an der Piperacillin-Resistenz

Besondere Merkmale der Mutante P406

Die in der vierten Selektionsstufe der Familie P006 isolierte Piperacillin-resistente Mutante P406 wurde bisher bezüglich der zur Resistenzerhöhung führenden Ursache nicht charakterisiert (1.6). Bisherige Analysen zeigten, daß in P406 keine weiteren Veränderungen der Penicillin-Bindeproteine im Vergleich zum Parentalstamm P306 vorhanden waren (1.6). Im Rahmen der durchgeführten globalen Transkriptomanalyse aller Mutanten aus Familie P006 konnte gezeigt werden, daß in P406 einige Gene und Gencluster im Vergleich zu R6 eine stark veränderte Transkriptmenge aufwiesen (4.2). Im Parentalstamm P306 oder in der nächsten Selektionsstufe P506 hingegen konnten diese Veränderungen bezüglich der Transkriptmenge dieser Gene nicht beobachtet werden. Die Veränderungen auf transkriptioneller Ebene gingen einher mit einer im Vergleich zu dem Parentalstamm P306 teilweise wiederhergestellten genetischen Kompetenz in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (4.1.2) und einer weitgehenden Kompensation des in dem Parentalstamm P306, sowie in P106 und P206 beobachteten Wachstumsdefekts (4.1.1). Hieraus konnte vermutet werden, daß es sich im Fall der unbekannt Mutation(en) im Genom von P406 um (eine) kompensatorische Mutation(en) handeln könnte, welche einen der durch die beschriebenen Mutationen in P406 (*cpoA*, *pbp2b*, *pbp2x*) hervorgerufenen Defekte zumindest teilweise kompensiert(n).

Identifizierung des Zweikomponentensystems 11 (Kin11/Reg11) als Resistenzvermittelnde Determinante in P406 und R6

Durch die systematische Deletion einiger solcher Gene und Gencluster, welche die beschriebenen Veränderungen bezüglich ihrer Transkriptmengen aufwiesen (*cyl*-Cluster, *ytrA*-Cluster, TCS11-Cluster), konnte die Beteiligung des bisher uncharakterisierten Zweikomponentensystems 11 (kodiert durch *kin11* und *reg11*) an der erhöhten Piperacillin-Resistenz von Mutante P406 gezeigt werden (4.7). Mit dem Zweikomponentensystem 11 ist somit ein weiteres Zweikomponentensystem in *S. pneumoniae* in einen Mechanismus verwickelt, welcher zur Erhöhung der Resistenz gegen ein β -Lactam-Antibiotikum führt. Guenzi et al. (1994) konnten bereits eine Beteiligung des Zweikomponentensystems CiaRH an der Resistenz gegen das β -Lactam Cefotaxim nachweisen (1.2).

Eine globale Transkriptomanalyse der Deletionsmutante P406 Δ *kin11reg11* zeigte zudem, daß sich die Transkriptmengen des *cyl*-Clusters und des *ytrA*-Clusters wohl in Abhängigkeit des TCS11-Clusters ändern, womit es sich bei den Effekten auf diese Cluster um einen sekundären Effekt infolge erhöhter Transkriptmengen des TCS11-Clusters handelte (4.8). Die Transkriptmengen der ersten vier Gene des TCS11-Clusters (*smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11*) wurden durch die Deletion der Gene *kin11* und *reg11* zwar im Vergleich zu P406 wieder erniedrigt, waren jedoch im Vergleich zu R6 immer noch erhöht (4.8).

Die Ursache der erhöhten Transkriptmengen des TCS11-Clusters in P406 musste durch die chromosomale Veränderung upstream des TCS11-Cluster verursacht sein (4.6). Eine Sequenzierung dieses Bereichs zeigte, daß putative Terminatorstrukturen durch den kompletten Austausch des upstream des TCS11-Cluster im Genom von R6 liegenden intergenen Bereichs gegen mehrere tRNA-Gene entfernt wurden. Durch den Austausch des intergenen Bereiches wurde die Transkription des TCS11-Clusters, ausgehend von Promotoren des upstream des TCS11-Clusters liegenden tRNA-Genclusters oder ausgehend von Promotoren der eingefügten tRNA-Gene vermutlich verstärkt und führte so zu den höheren Transkriptmengen in P406. Die upstream des TCS11-Clusters in P406 nunmehr vorhandenen tRNA-Gene waren auch an ihrem ursprünglichen Ort im Genom von R6 noch vorhanden, womit es sich um eine Verdopplung dieser Gene handelte (4.6). Wie dieser Austausch dieses intergenen Bereichs mechanistisch funktioniert, bzw. warum gerade ein Teil dieser tRNA-Gene verdoppelt wurde, war aus einer Sequenzanalyse der involvierten Bereiche nicht zu ersehen.

Die Aufgabe von Zweikomponentensystemen wie Kin11/Reg11 oder CiaRH besteht meist in der Regulation der Transkription bestimmter Gene infolge sich verändernder Umweltbedingungen (1.3). Folglich war davon auszugehen, daß die Resistenzerhöhung gegen Piperacillin in P406 nicht Folge der höheren Menge von Kin11 und Reg11 war, sondern in einer veränderten Transkription der durch Kin11/Reg11 regulierten Gene begründet war. Aufgrund der Struktur des TCS11-Clusters im Genom von R6 bestand die Möglichkeit, daß die direkt upstream von *kin11* und *reg11* kodierten Gene der putativen Membranproteine Smp11A und Smp11B und des putativen ABC-Transporters Nbp11/Msp11 durch Kin11/Reg11 reguliert werden. Eine Regulation von direkt benachbarten Genen durch das entsprechende Zweikomponentensystem wurde bereits öfter beschrieben (Mascher et al., 2006c und Referenzen) und konnte auch im vorliegenden Fall für die upstream von *kin11* und *reg11* im Genom vorhandenen Gene *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11* bestätigt werden (4.10).

Auch die Deletion von *nbp11* durch das Ersetzen mit der Janus-Kassette führte zur Erniedrigung der in P406 beobachteten Piperacillin-Resistenz auf das Niveau des Parentalstamms von P406 (4.9), womit der durch *nbp11* und *msp11* kodierte ABC-Transporter an der Resistenz-Erhöhung beteiligt wäre. Jedoch konnte aufgrund der nunmehr anstelle von *nbp11* vorhandenen Resistenzkassette inmitten des TCS11-Clusters ein Effekt auf die Expression der downstream liegenden Gene nicht ausgeschlossen werden (4.9).

Zudem besitzt P406 im Genom Mutationen in *cpoA*, *pbp2b* und *pbp2x*, welche alle zu einer Resistenzhöhung führen (1.6). Um die Beteiligung des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 oder von den putativen Membranproteinen Smp11A und Smp11B an einem Resistenzmechanismus gegen Piperacillin zu bestätigen und um auszuschließen, daß die anderen Mutationen in P406 hierbei involviert sind, war es unverzichtbar, die Beteiligung an der Piperacillin-Resistenz im Wildtyp R6 nachzuweisen.

Durch den Austausch des Promotors P_{11.1} upstream des TCS11-Clusters (4.10.2; 4.10.5) in R6 und in der Deletionsmutante R6 Δ *kin11reg11*, gegen zwei verschieden starke, konstitutive Promotoren konnte zweifelsfrei gezeigt werden, daß eine isolierte Überexpression der Gene *smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11* ausreichend ist, um im Wildtyp *S. pneumoniae* R6 zur höheren Resistenz gegen Piperacillin zu führen (4.10.10).

Ein ABC-Transporter als Resistenzdeterminante gegen ein β -Lactam-Antibiotikum wurde bisher in Gram-positiven Bakterien nur selten beschrieben. So konnte in *Corynebacterium glutamicum* mit TetAB ein ABC-Exporter identifiziert werden, welcher neben einer Tetracyclin-Resistenz auch zu einer Resistenz gegen das β -Lactam Oxacillin führt, deren Ursache jedoch unaufgeklärt blieb (Tauch et al., 1999). In Gram-negativen Bakterien hingegen wurden solche Transporter bereits beschrieben (Nishino et al., 2003). Die Beteiligung von Nbp11/Msp11 an der Piperacillin-Resistenz in *S. pneumoniae* führte zu der Vermutung, daß der zugrunde liegende Mechanismus nicht in einem von Nbp11/Msp11 vermittelten Transport von Piperacillin besteht.

Die molekulargenetische Charakterisierung des TCS11-Clusters führte zur Entwicklung eines vorläufigen Modells zur Regulation und zur putativen Funktion der im TCS11-Cluster kodierten Proteine, woraus sich auch Hinweise auf den zur Resistenz gegen Piperacillin führenden Mechanismus ergaben. Hierbei zeigte sich, daß CpoA und die im TCS11-Cluster kodierten Proteine womöglich beide in die Regulation der Glycolipidzusammensetzung der Cytoplasmamembran oder in die TA-Biosynthese involviert sein könnten (5.4).

5.3 Molekulargenetische Charakterisierung des TCS11-Clusters

5.3.1 Die Regulation des TCS11-Clusters

Promotoren und Operonstruktur

Im Rahmen der molekulargenetischen Charakterisierung des TCS11-Clusters konnte gezeigt werden, daß die Transkription der Gene im TCS11-Cluster ausgehend von den beiden kartierten Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ erfolgt (Abbildung 5.4). Die Aktivität von Promotor $P_{11.1}$ wird hierbei direkt durch phosphorylierten Reg11 des TCS11 reguliert. Promotor $P_{11.2}$ unterliegt einer Regulation, welche nicht direkt abhängig von TCS11 ist.

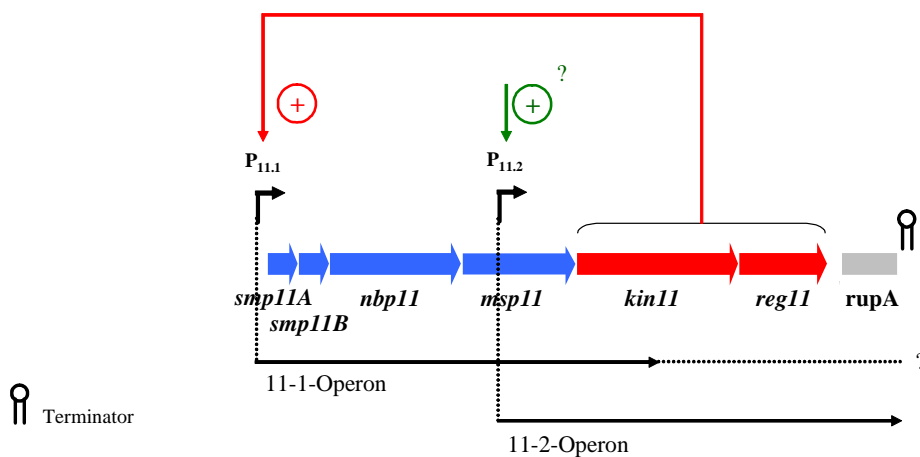


Abbildung 5.4: Transkriptionseinheiten und Promotoren des TCS11-Clusters. Gene des TCS11-Clusters wurden als blaue und rote Blockpfeile dargestellt. Blaue Blockpfeile: Gene des 11-1-Operons; rote Blockpfeile: Gene des 11-2-Operons. Die Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ wurden als gebogene, schwarze Pfeile dargestellt. Schwarze Pfeile zeigen die Transkripte des 11-1- und 11-2-Operons. Die Zugehörigkeit von *kin11* und *reg11* zum 11-1-Operon ist unklar (gepunktete Linie). +: $P_{11.1}$ unterliegt einer positiven Regulation durch das Zweikomponentensystem 11. +: $P_{11.2}$ unterliegt einer noch unbekannt Regulation, welche nicht direkt vom TCS11 abhängt. *smp11A* und *smp11B*: Small membrane proteins 11A und 11B; *nbp11*: Nucleotide binding protein 11; *msp11*: membrane spanning protein 11; *kin11*: Histidin-Kinase 11; *reg11*: Response-Regulator 11. *rupA*: Kopie eines repetitiven Elements von *Streptococcus pneumoniae*.

Das TCS11-Cluster besteht folglich aus den beiden überlappenden Operons 11-1 und 11-2. Die Gene der putativen Membranproteine Smp11A, und Smp11B, sowie die Gene des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 sind im 11-1-Operon organisiert, wobei die Zugehörigkeit der Gene des TCS11 (*kin11* und *reg11*) zum 11-1-Operon nicht gezeigt werden konnte. Entweder wurde die bei den gegebenen Wachstumsbedingungen schwache Transkription ausgehend von $P_{11.1}$ in diesem Bereich terminiert oder es handelte sich bei dem in den Northern-Analysen zur Bestimmung des Transkripts des 11-1-Operons detektierten Signal (4.10.4) um ein Abbauprodukt eines Transkripts, welches ursprünglich alle Gene des TCS11-Clusters umfasste. Im Bereich des *kin11*-Gens konnten jedoch keine putativen Terminatorstrukturen gefunden werden. Zudem wird die Transkription ausgehend von Promotor $P_{11.2}$ im Bereich des *kin11*-Gens nicht terminiert. Beides spricht dafür, daß es sich eher um ein Abbauprodukt des von $P_{11.1}$ ausgehenden Transkripts handelte. Bis zur Klärung der Frage, ob und unter welchen Umständen ein Transkript existiert, welches alle Gene des TCS11-Clusters beinhaltet, kann jedoch nicht von einer Autoregulation des Zweikomponentensystems 11 gesprochen werden. Die Deletion des Promotors $P_{11.2}$ in Deletionsmutante R6 Δ *msp11* zeigte jedoch keinen Effekt auf die Aktivität von Promotor $P_{11.1}$. Dies bedeutet, daß obwohl keine

Transkription von *kin11* und *reg11* ausgehend von P_{11.2} stattfinden kann, Kin11- und Reg11-Protein zugegen ist um eine Transkription der Gene des 11-1-Operons ausgehend von P_{11.1} zu gewährleisten. Da keine weiteren Promotoren innerhalb des TCS11-Clusters unter diesen Wachstumsbedingungen kartiert werden konnten, kann dies nur bedeuten, daß ein Transkript, welches alle Gene des TCS11-Clusters trägt, existiert.

kin11, *reg11* und das repetitive Element *rupA* werden ausgehend von P_{11.2} als eigene Transkriptionseinheit transkribiert (11-2-Operon). Der Sinn eines eigenen Promotors von *kin11* und *reg11* liegt offensichtlich in der Aufrechterhaltung der Funktionalität des Zweikomponentensystems 11. Da Promotor P_{11.2} keiner direkten Regulation durch das TCS11 unterliegt, ist die Transkription der Gene *kin11* und *reg11* unabhängig von der Aktivität des TCS gewährleistet. Hierdurch wird die Transkription der Gene des 11-1-Operons im Fall einer Aktivierung des TCS11 durch den entsprechenden Stimulus der Histidin-Kinase Kin11 und somit die Funktion des TCS11-Clusters sichergestellt.

Regulation der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2}

Bei der Regulation von Promotor P_{11.1} handelt es sich um eine direkte positive Regulation durch das TCS11 (Abbildung 5.4), was sowohl durch EMSA-Assays mit aufgereinigtem His₆Reg11 und einem P_{11.1}-tragenden DNA-Fragment, sowie durch Bestimmung der Promotor-Aktivität von P_{11.1} in R6, R6Δ*kin11*, R6Δ*reg11* und R6Δ*kin11reg11* gezeigt werden konnte. In R6Δ*kin11*, R6Δ*reg11* und R6Δ*kin11reg11* war im Vergleich zu R6 keine Aktivität von P_{11.1} mehr messbar, was auch bedeutete, daß die Aktivität von P_{11.1} zumindest unter diesen Wachstumsbedingungen von keinem anderen transkriptionellen Regulator abhängig ist. Die Transkription ausgehend von Promotor P_{11.1} wird durch die Interaktion von phosphoryliertem Response-Regulator Reg11 mit der für die Bindung von phosphoryliertem Reg11 essentiellen DNA-Sequenz ATGACA(2)TGTCAT(8-9)GTGACA reguliert. Diese essentielle Sequenz wurde an keiner weiteren Stelle im Genom von *S. pneumoniae* R6 zu 100 % konserviert gefunden. Mit ähnlichen, bis zu 60 % konservierten Sequenzen konnte keine Interaktion mit phosphoryliertem- oder unphosphoryliertem His₆Reg11 in EMSA-Assays beobachtet werden. Das TCS11 scheint folglich lediglich die Gene des 11-1-Operons zu regulieren. Solche Zweikomponentensysteme, welche nur einen ABC-Transporter oder nur wenige sonstige Gene regulieren, wurden bereits mehrfach beschrieben (BceRS, Ohki et al., 2003; YxdJK, Joseph et al., 2004). Jedoch besteht die Möglichkeit, daß das TCS11 trotzdem noch weitere Gene durch Bindung von phosphoryliertem Response-Regulator Reg11 reguliert. Dies kann erst vollständig ausgeschlossen werden, wenn durch eine Mutagenese jedes einzelnen Nukleotids der essentiellen DNA-Sequenz ATGACA(2)TGTCAT(8-9)GTGACA die zur Interaktion mit phosphoryliertem Reg11 notwendigen Nukleotide identifiziert wurden und eine erneute Suche nach der resultierenden Sequenz, sowie entsprechende EMSA-Assays mit phosphoryliertem Reg11 durchgeführt wurden. Die essentielle DNA-Sequenz wurde in einem Vergleich zwischen den DNA-Sequenzen des Bereichs von Promotor P_{11.1}, des putativen Promotors P_{yvf} des TCS11-ähnlichen *yvfRSTU*-Clusters aus *B. subtilis* und des vermutlich in *B. subtilis* durch das Zweikomponentensystem YvfTU regulierten Promotors P_{des} identifiziert. Die Tatsache, daß von allen drei Promotor-tragenden Fragmenten in EMSA-Assays mit phosphoryliertem Reg11 eine Interaktion gezeigt werden konnte (4.10.6.2) und immer nur eine der drei Teilsequenzen der essentiellen DNA-Sequenz maximal zwei im Vergleich zur Sequenz in R6 veränderte Nukleotide aufweist, läßt jedoch vermuten, daß die identifizierte essentielle DNA-Sequenz mit der zur Interaktion von phosphoryliertem Reg11 notwendigen DNA-Bindestelle zumindest sehr ähnlich oder gar identisch ist.

Die Aktivität von Promotor P_{11.2} unterliegt zwar ebenfalls einer Regulation, was die Bestimmung der Aktivität in verschiedenen Deletionsmutanten von Genen des TCS11-

Clusters zeigte, jedoch handelt es sich bei dieser Regulation nicht um eine direkt vom Zweikomponentensystem 11 abhängige Regulation durch Bindung von phosphoryliertem- oder unphosphoryliertem Response-Regulator Reg11. Es konnte weder eine Bindung von phosphoryliertem- oder unphosphoryliertem His₆Reg11 an Promotor P_{11.2} in EMSA-Assays beobachtet, noch die zur Bindung von phosphoryliertem Reg11 notwendige DNA-Sequenz im Bereich von P_{11.2} gefunden werden. Dies zeigte, daß ein unbekannter transkriptioneller Regulator in die Aufrechterhaltung der Funktionalität des TCS11-Clusters durch Regulation der Transkription der Gene *kin11* und *reg11* involviert ist.

Die Aktivität des Zweikomponentensystems 11 ist abhängig von der Funktion der putativen Membranproteine Smp11A und Smp11B

Aufgrund der Organisation des für die Stimulus-Perzeption verantwortlichen N-Terminus der Histidin-Kinase Kin11 konnte Kin11 als intramembran-perzipierende Histidin-Kinase klassifiziert werden. Solche Kinasen reagieren auf einen Stimulus, welcher in oder mit der Membran assoziiert aufkommt (Mascher et al., 2006c). Alle bekannten, durch das TCS11 regulierten Gene kodieren für putative Membranproteine (Smp11AB, Msp11) oder für mit der Membran assoziierte Proteine (Nbp11). Da keine weiteren Gene identifiziert werden konnten, welche durch Bindung von phosphoryliertem Reg11 an die essentielle DNA-Sequenz reguliert werden, wurde vermutet, daß die Gene des 11-1-Operons die einzigen, durch phosphoryliertes Reg11 regulierten Gene darstellen. Es wurde weiterhin spekuliert, daß die im 11-1-Operon kodierten Proteine an der Stimulus-Perzeption von Kin11 beteiligt sein könnten. Ähnliche Beteiligungen wurden z.B. im Fall des ABC-Transporter-Zweikomponentensystem-Clusters BceRSAB in *B. subtilis* (Ohki et al., 2003) bereits beschrieben. Durch den Nachweis der Bindung von phosphoryliertem Reg11 an Promotor P_{11.1} konnte P_{11.1} als Indikator für die Aktivität (den Phosphorylierungsstatus) des TCS11 verwendet werden. Die Bestimmung der Aktivität des durch das TCS11 direkt regulierten Promotors P_{11.1} in verschiedenen Deletionsmutanten der Gene des 11-1-Operons, sowie die gemeinsame, isolierte Überexpression dieser Gene zeigte, daß die Aktivität von Kin11 und folglich die Phosphorylierung von Reg11 von der Funktion des im 11-1-Operon kodierten ABC-Transporters Nbp11/Msp11 und insbesondere von den beiden putativen Membranproteinen Smp11A und Smp11B abhängig ist.

Die gemeinsame, isolierte Überexpression der Gene des 11-1-Operons führte zu einem Verlust der Aktivität von P_{11.1}. Die Deletion von Nbp11 oder Msp11 führte zu einer Verdopplung der Aktivität von P_{11.1}, was bedeuten könnte, daß eine Anhäufung oder eine Abnahme des vom ABC-Transporter transportierten unbekanntes Substrats direkt den Stimulus von Kin11 darstellte (4.10.8.2.3). Die beiden weiteren im 11-1-Operon kodierten Proteine bestehen auf den ersten Blick lediglich aus je zwei Transmembrandomänen, womit es sich bei Smp11A und Smp11B vermutlich um putative Membranproteine handelt. Eine Funktion als Substratbindeproteine des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 wäre aufgrund der gemeinsamen Organisation der Gene im 11-1-Operon denkbar. Die isolierte Deletion von *smp11A* führte jedoch zu einer 7-fachen Erhöhung der Aktivität von P_{11.1}. Wäre Smp11A das Substratbindeprotein des ABC-Transporters, so wäre auch hier, wie schon im Fall der Deletion der anderen Proteine des ABC-Transporters (Nbp11 und Msp11) nur eine annähernde Verdopplung der Aktivität von P_{11.1} zu erwarten, da alle drei Deletionen zu einem Ausfall der Transportfunktion führen sollten. Die isolierte Deletion von *smp11B* oder die Doppeldeletion von *smp11A* und *smp11B* hingegen hatte lediglich wieder einen 1,9-fachen Anstieg der Aktivität von P_{11.1} zur Folge. Diese Ergebnisse sprachen für eine andere Funktion der putativen Membranproteine Smp11A und Smp11B als die von Substratbindeproteinen des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 oder zumindest für eine weitere Funktion.

Für Smp11A und Smp11B wurde aus diesen Resultaten in einem Modell spekuliert, daß sie für die Weiterleitung des Stimulus an die Histidin-Kinase Kin11 durch Interaktion von Smp11B mit Kin11 beteiligt sein müssen (Abbildung 5.5). Eine solche Modifikation der Kinase-Aktivität durch Membran-gebundene Proteine wurde beispielsweise im Fall der Histidin-Kinase YycG und der mit ihr interagierenden Proteine YycI und YycH in *B. subtilis* bereits beschrieben (Szurmant et al., 2007a und 2007b). Diese Interaktion müsste aufgrund der Klassifizierung von Kin11 als Histidin-Kinase, welche einen mit der Cytoplasmamembran assoziierten Stimulus perzipiert, die direkte Folge einer Bindung von Smp11A mit einer unbekanntem, in oder in Assoziation mit der Cytoplasmamembran vorkommenden, Substanz sein. Diese Substanz könnte eventuell das unbekanntes Substrat des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 selbst darstellen. Vorstellbar wäre auch, daß es sich um eine Substanz handelt, deren Konzentration mit der Konzentration des unbekanntes Substrats des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 korreliert ist, oder daß die Substanz einen Precursor oder einen Metaboliten des Substrats von Nbp11/Msp11 darstellt. Zu dieser Annahme führten folgende Überlegungen:

- Die Promotor-Aktivitäten von $P_{11.1}$ in den verschiedenen Deletionsmutanten sprechen eindeutig für verschiedene Funktionen von Smp11A und Smp11B.
- Da es sich bei Smp11A und Smp11B vermutlich um Membranproteine handelt, wäre eine Interaktion mit Kin11 möglich.
- Die Effekte auf die Aktivität des Zweikomponentensystems 11 infolge der Deletionen von *smp11A*, *smp11B* oder *smp11AB* weisen auf eine Interaktion von Smp11B mit Kin11 hin.
- Es existieren zahlreiche plausible Möglichkeiten eines Modells zur Interaktion von Smp11A, Smp11B und Kin11 unter Beteiligung einer mit dem unbekanntes Substrat von Nbp11/Msp11 in Bezug stehenden Substanz.
- Aufgrund der Beobachtung, daß in Abwesenheit beider Proteine ($R6\Delta smp11AB$) keine nennenswerte Aktivitätserhöhung von $P_{11.1}$ stattfindet, entfallen alle Möglichkeiten, welche infolge einer ausbleibenden, gleichzeitigen Interaktion beider Membranproteine (gleichgültig ob in An- oder Abwesenheit eines Substrats) mit Kin11 zur Aktivierung des TCS11 führen würden.
- Weiterhin können aufgrund der Erhöhung der $P_{11.1}$ -Aktivität in $R6\Delta smp11A$ alle Modelle ausgeschlossen werden, welche eine gemeinsame Interaktion von Smp11A und Smp11B mit Kin11 (gleichgültig ob in An- oder Abwesenheit eines Substrats) zur Aktivierung des TCS11 annehmen.
- Aufgrund der Beobachtung, daß in Abwesenheit von Smp11A ($R6\Delta smp11A$) eine 7-fache Aktivitätserhöhung von $P_{11.1}$ eintritt, entfallen alle Möglichkeiten, welche eine Interaktion von Smp11A (gleichgültig ob mit oder ohne gebundenes Substrat) mit Kin11 zur Aktivierung des TCS11 voraussetzen.
- Es kann vorausgesetzt werden, daß eine mit Smp11A und/oder Smp11B direkt oder indirekt interagierende unbekanntes Substanz beteiligt ist. Ein plausibles resultierendes Modell zur Funktion von Smp11A und Smp11B wurde in Abbildung 5.5 dargestellt.

Es ist unklar, ob es sich bei dem ABC-Transporter Nbp11/Msp11 um einen Importer oder Exporter handelt. Vorstellbar wäre aufgrund der Gemeinsamkeiten (4.10.1) von Nbp11/Msp11 und dem BceAB-Transporter in *B. subtilis* auch, daß es sich um einen Transporter handelt, welcher eine Substanz von einem Monolayer der Cytoplasmamembran in den anderen Monolayer befördert (Bernard et al., 2007). Zudem ist unklar, ob Smp11A die unbekanntes Substanz innerhalb der Cytoplasmamembran, bzw. auf cytosolischer- oder extracytosolischer Seite der Cytoplasmamembran bindet. Smp11A und Smp11B könnten jedoch auf die beiden in Abbildung 5.5 gezeigten Arten, mit oder ohne der unbekanntes Substanz einen Komplex bilden.

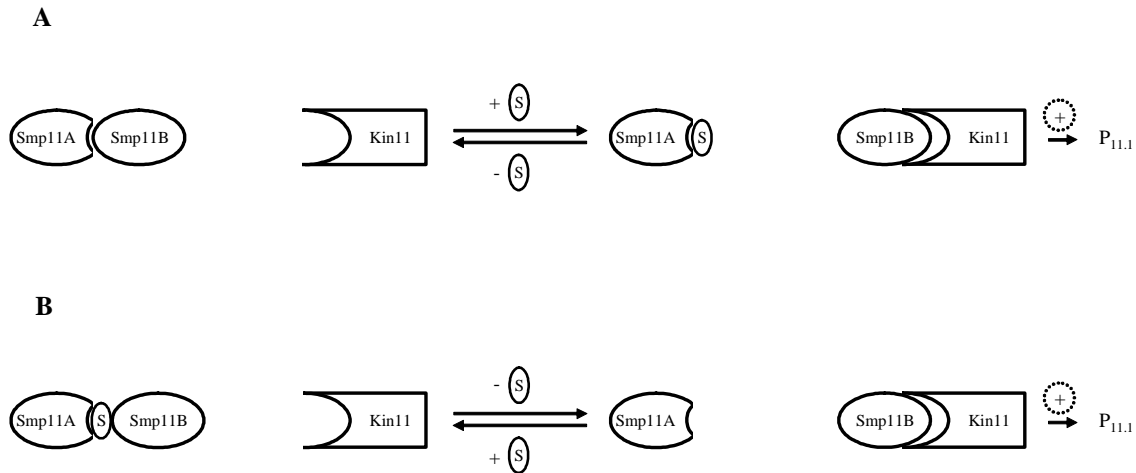


Abbildung 5.5: Modell zur Interaktion von Smp11A, Smp11B und Kin11 in *S. pneumoniae* R6. Dargestellt wurden zwei mögliche Mechanismen A und B unter Beteiligung von Smp11A und einer unbekannt Substanz (S), welche zur Interaktion von Smp11B und Kin11 in der Cytoplasmamembran führen könnten. A: In Abwesenheit der unbekannt Substanz liegen Smp11A und Smp11B als Komplex vor. Mit steigender Konzentration der unbekannt Substanz dissoziieren Smp11A und Smp11B. Die Interaktion von Smp11B und Histidin-Kinase Kin11 führt zur Aktivierung des Zweikomponentensystems 11 und somit zur Erhöhung der Aktivität von $P_{11.1}$ (gekennzeichnet durch +). B: In Anwesenheit der unbekannt Substanz liegen Smp11A und Smp11B mit dieser zusammen als Komplex vor. Mit abnehmender Konzentration der unbekannt Substanz dissoziieren Smp11A und Smp11B. Die Interaktion von Smp11B und Histidin-Kinase Kin11 führt zur Aktivierung des Zweikomponentensystems 11 und somit zur Erhöhung der Aktivität von $P_{11.1}$.

Smp11A und Smp11B würden somit entweder bei Zunahme (A in Abbildung 5.5) der Konzentration der unbekannt Substanz dissoziieren oder bei Abnahme (B in Abbildung 5.5) der Konzentration der unbekannt Substanz dissoziieren. Das infolge der Dissoziation von Smp11A und Smp11B nun frei vorliegende Smp11B würde in beiden Fällen den Stimulus für Kin11 durch Interaktion mit Kin11 weiterleiten. Im Folgenden werden aus Gründen der besseren Übersicht die Zusammenhänge und die Regulation der einzelnen im TCS11-Cluster kodierten Proteine unter der Annahme, daß es sich bei Nbp11/Msp11 um einen Importer handelt, diskutiert. Alle gefolgerten Zusammenhänge wären jedoch ebenfalls denkbar, wenn angenommen würde, daß Nbp11/Msp11 eine Export-Funktion besitzen würde.

Der Sinn einer Übertragung des Stimulus an die Histidin-Kinase Kin11 durch ein solches System könnte in einer Feinabstimmung der Aktivität des TCS11 bestehen: So wäre einerseits vorstellbar, daß durch dieses System starke Schwankungen der Aktivität der Histidin-Kinase Kin11 infolge einer sich ändernden Konzentration der unbekannt Substanz verhindert werden. Dies könnte erreicht werden, indem die Aktivität von Kin11 erst bei Interaktion mit mehreren Smp11B-Proteinen steigt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Transkriptomanalysen von $R6\Delta smp11A$ und $R6\Delta msp11_3$ (4.10.9.1), sowie des Vergleichs der Aktivitäten von Promotor $P_{11.2}$ in den Deletionsmutanten einzelner Gene des TCS11-Clusters (4.10.8.2.3) und $R6\Delta kin11reg1IP_{vegW}$ (4.10.10.4), und der Tatsache, daß in nahe verwandten Streptococceen keine zu Smp11A und Smp11B homologen Proteine kodiert sind (4.10.1), könnte jedoch auch vermutet werden, daß die beiden Membranproteine Smp11A und Smp11B der Perzeption eines zweiten Stimulus für die Histidin-Kinase Kin11 dienen. Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß in $R6\Delta smp11B$ oder $R6\Delta smp11AB$, beides Deletionsmutanten, in welchen Smp11B keinen Stimulus an Kin11 geben kann, die Aktivität von Promotor $P_{11.1}$ leicht steigt, anstatt wie erwartet zu sinken. Bei diesem zweiten Stimulus könnte es sich um eine mit der den eigentlichen Stimulus von Kin11 vermittelnden Substanz sehr eng verwandte Substanz handeln, welche nur in *S. pneumoniae* vorkommt.

Möglicherweise stellt diese Substanz einen Metaboliten der den eigentlichen Stimulus vermittelnden Substanz dar. Ein solcher Metabolit könnte beispielsweise die LTA von *S. pneumoniae* mit ihren im Vergleich zu anderen Streptococcen, bzw. anderen Gram-positiven Bakterien außergewöhnlichen Repeating Units (1.4), oder das in der Cytoplasmamembran von anderen Gram-positiven Bakterien nicht vorkommende Glycolipid GalGlcDAG darstellen.

Eine Beteiligung von zusätzlichen Membranproteinen an der Stimulus-Perception von Histidin-Kinasen wurde bereits beschrieben (Ohki et al., 2003; Szurmant et al., 2007a; Szurmant et al., 2007b). In keinem der bisher beschriebenen Fälle handelt es sich um reine Membranproteine, wie im Fall der relativ kleinen putativen Membranproteine Smp11A oder Smp11B. Die Art der beschriebenen beteiligten Proteine zeigt jedoch eine klare Assoziation mit dem Ort, an dem der Stimulus der Histidin-Kinase aufkommt (extracytosolisch, im Periplasma, cytosolisch; Szurmant et al., 2007b). Auf Smp11A und Smp11B übertragen würde dies aufgrund der Tatsache, daß sie lediglich aus zwei Transmembrandomänen bestehen bedeuten, daß sie mit einer unbekannt Substanz innerhalb der Membran interagieren würden.

Die Aktivität von $P_{11.1}$ ist in der exponentiellen Wachstumsphase sehr gering (~6 β GU; 4.10.3). Lediglich am Übergang von exponentieller- zu stationärerer Wachstumsphase erfolgt eine kurzzeitige Erhöhung auf ~20 β GU, gefolgt von einem Abfall auf ~10 β GU in der stationären Phase. Ein Stimulus für Kin11 scheint folglich natürlicherweise in der Übergangsphase von exponentieller- zu stationärer Phase vorzuliegen. Das System pendelt sich jedoch in der stationären Phase recht schnell wieder auf einen Wert nahe dem Ausgangszustand (gemessen an der Aktivität von $P_{11.1}$ und im Vergleich zur Aktivität in der exponentiellen Phase) ein. Aus den generell geringen Aktivitäten von $P_{11.1}$ und der relativ kurzen Phase, in dem das System aktiver wird, kann zumindest gefolgert werden, daß es einer sehr genauen und abgestimmten Regulation bedarf.

Die Aktivität von Promotor $P_{11.2}$ ist abhängig von Histidin-Kinase Kin11

Durch die Bestimmung der Aktivität des Promotors $P_{11.2}$ in Deletionsmutanten einzelner Gene des TCS11-Clusters konnte gezeigt werden, daß die Aktivität des Promotors $P_{11.2}$ reguliert wird. Es existiert jedoch keine direkte Regulation des Promotors $P_{11.2}$ durch das TCS11. Die Regulation erfolgt somit über einen noch unbekannt regulatorischen Mechanismus. Die Regulation von Promotor $P_{11.2}$ durch diesen Mechanismus ist jedoch trotzdem beeinflusst von Faktoren, welche mit dem TCS11-Cluster zusammenhängen.

Die beobachtete Erhöhung der Aktivität von $P_{11.2}$ in verschiedenen Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters kann nur von der An- oder Abwesenheit von Kin11 selbst abhängen. Der unbekannt regulatorische Mechanismus muß somit die Anwesenheit von Kin11, oder vielmehr die Menge von Kin11 in der Cytoplasmamembran über einen Sensor-Mechanismus perzipieren, denn:

- Die Aktivität von $P_{11.2}$ wird nur infolge einer *kin11*-Deletion erhöht (*R6 Δ kin11*, *R6 Δ kin11reg11*). Diese Erhöhung der Aktivität von $P_{11.2}$ kann nicht durch den Ausfall der Transkription der Gene des 11-1-Operons verursacht werden, denn sowohl die Deletion von *kin11* oder *reg11*, als auch die Deletion von *kin11* und *reg11* führen dazu, daß die Gene im 11-1-Operon nicht mehr exprimiert werden.
- Aus den gleichen Gründen kann auch keine Abhängigkeit von dem unbekannt, durch Nbp11/Msp11 transportierten Substrat oder der unbekannt, durch Smp11A und/oder Smp11B gebundenen Substanz vorhanden sein. Selbst wenn vorausgesetzt würde, daß ein Transport unter den gegebenen Wachstumsbedingungen nicht notwendig ist, so dürfte kein Unterschied bezüglich des Effekts auf $P_{11.2}$ in den drei Deletionsmutanten *R6 Δ kin11*, *R6 Δ reg11* und *R6 Δ kin11reg11* zu verzeichnen sein.

- Dieser Effekt auf $P_{11,2}$ kann nicht durch weitere, von phosphoryliertem Reg11 regulierten Genen (induzierte oder reprimierte Gene) abhängen, denn in diesem Fall müsste der Effekt in $R6\Delta kin11$, $R6\Delta reg11$ und $R6\Delta kin11reg11$ zu beobachten sein. Zudem war diese Möglichkeit durch das Fehlen von weiteren, zur Bindung von phosphoryliertem Reg11 essentiellen Sequenzen im Genom von R6 eher unwahrscheinlich.

- Dieser Effekt auf $P_{11,2}$ kann auch nicht durch weitere unbekannte Gene, welche eventuell durch die Bindung von unphosphoryliertem Reg11 unter der Regulation von TCS11 stehen, hervorgerufen werden. In diesem Fall müsste die Aktivitäts-Erhöhung von $P_{11,2}$, unabhängig davon, ob es sich um induzierte- oder reprimierte Gene handelt, nur in $R6\Delta kin11$ zu beobachten sein.

Da es in R6 vermutlich keine Situation gibt, in welcher, wie im Fall von $R6\Delta kin11reg11$ oder $R6\Delta kin11$ absolut keine Histidin-Kinase Kin11 vorhanden ist, sollte ein zur Perzeption von Kin11 befähigter Sensor-Mechanismus eventuell über ein Sensor-Protein SP zwischen einem Smp11B-Kin11-Komplex und freier Kin11 unterscheiden können (vgl. Abbildung 5.5) und so die Aktivität von $P_{11,2}$ über den unbekanntem regulatorischen Mechanismus regulieren (Abbildung 5.6). Der Mechanismus wäre wiederum für beide Möglichkeiten der Interaktion von Smp11A und Smp11B denkbar (Fall A und B in Abbildung 5.6).

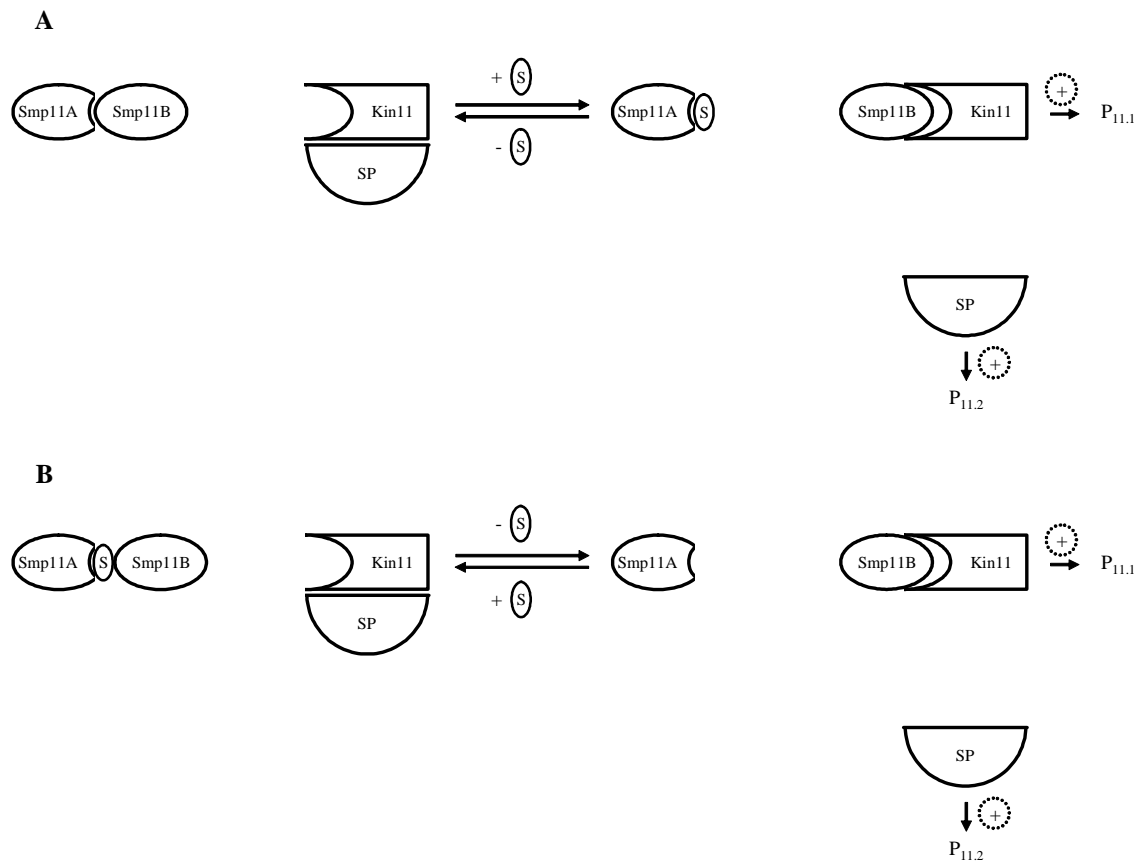


Abbildung 5.6: Modell zur Rolle eines Kin11-perzipierenden Sensor-Proteins SP des unbekanntem regulatorischen Mechanismus an $P_{11,2}$. A: SP und Histidin-Kinase Kin11 interagieren, wenn kein oder nur eine geringe Menge der von Smp11A gebundenen unbekanntem Substanz zugegen ist. Ist S hingegen in größerer Menge vorhanden, so führt die Interaktion von Smp11B und Histidin-Kinase Kin11 zur Aktivierung des Zweikomponentensystems 11 und somit zur Erhöhung der Aktivität von $P_{11,1}$. Die Interaktion von Kin11 und Smp11B hat jedoch auch zur Folge, daß Kin11 nicht mehr von SP perzipiert wird und SP die Erhöhung der Aktivität von $P_{11,2}$ über einen unbekanntem Mechanismus bewirkt. B: SP und Kin11 interagieren, wenn eine genügend große Menge der unbekanntem Substanz vorhanden ist. Ist S hingegen nicht in ausreichender Menge vorhanden, so führt die Interaktion von Smp11B und Histidin-Kinase Kin11 zur Aktivierung des Zweikomponentensystems 11 und somit zur Erhöhung der Aktivität von $P_{11,1}$. Auch hier dissoziieren SP und Kin11 und SP vermittelt nun die Erhöhung der Aktivität von $P_{11,2}$. +: Induktion des Promotors.

Ein solches Protein, welches mit dem cytosolischen Teil einer Histidin-Kinase interagiert, in die Regulation von Genen involviert ist und nicht den mit der Histidin-Kinase assoziierten Response-Regulator darstellt, wurde im Fall des mit der Histidin-Kinase NblS in *Synechococcus sp.* PCC 7942 interagierenden SipA-Proteins beschrieben (Espinosa et al., 2006).

Eine Alternative zur Perzeption der Anwesenheit von Kin11 durch den unbekanntem regulatorischen Mechanismus, welcher die Aktivität von P_{11.2} reguliert, würde ein Einfluß der mRNA des 11-2-Operons darstellen. Insbesondere die unbekanntem Funktion des mit 441 Nukleotiden sehr großen 5'-untranslatierten Bereichs dieses Operons bedarf auch in diesem Zusammenhang noch der Aufklärung.

Eine Überwachung der Menge von Kin11 in der Cytoplasmamembran durch den unbekanntem regulatorischen Mechanismus stellt eine Möglichkeit dar, die Expression von Kin11 und indirekt auch Reg11 und somit die Funktionalität des Zweikomponentensystems 11 sicher zu stellen. Somit wäre eine minimal notwendige Menge an Kin11 und auch Reg11 unabhängig vom Phosphorylierungsstatus der Histidin-Kinase Kin11 stets vorhanden.

Die Aktivität von P_{11.2} ist möglicherweise abhängig von einer durch Nbp11/Msp11 transportierten Substanz oder auch von den Membranproteinen Smp11A und Smp11B

Obwohl der unbekanntem regulatorische Mechanismus an P_{11.2} direkt von der Anwesenheit von Kin11 abhängig ist, was zwangsläufig eine primäre Unabhängigkeit von der Anwesenheit der im 11-1-Operon kodierten Proteine bedeutet (siehe oben), beeinflussen die Funktionen der im 11-1-Operon kodierten Proteine die Regulation der Aktivität von P_{11.2}.

Dies konnte einerseits durch die Bestimmung der Aktivität des Promotors P_{11.2} in den Deletionsmutanten der einzelnen Gene des TCS11-Clusters und andererseits aus dem Effekt der gemeinsamen, isolierten Überexpression der Gene des 11-1-Operons in Abwesenheit von Kin11 und Reg11 auf die Aktivität von P_{11.2} gefolgert werden:

In R6Δ*smp11A* kommt es neben einer Erhöhung der Aktivität von P_{11.1} auch zu einer Erhöhung der Aktivität von P_{11.2}. Diese Erhöhung findet nicht statt, wenn *smp11AB* oder nur *smp11B* deletiert werden (4.10.8.2.3).

Die Erhöhung der Aktivität von P_{11.2} infolge einer *kin11*-Deletion (R6Δ*kin11* und R6Δ*kin11reg11*) kann aufgehoben werden, wenn die Gene des 11-1-Operons (*smp11A*, *smp11B*, *nbp11* und *msp11*) gemeinsam isoliert überexprimiert werden (R6Δ*kin11reg11P_{vegW}*; 4.10.10.4).

Ein Problem bei der Deutung dieser Effekte stellt der Einfluß des von Nbp11/Msp11 vermittelten Transports auf den unbekanntem regulatorischen Mechanismus an P_{11.2} dar. Einerseits hat die Deletion von *nbp11* oder *msp11* keinen Effekt auf die Aktivität von P_{11.2}, wobei jedoch unklar ist, inwiefern unter den verwendeten Wachstumsbedingungen ein Transport überhaupt notwendig ist. Andererseits werden *nbp11* und *msp11* sowohl in R6Δ*smp11A* (infolge der Induktion von P_{11.1}), als auch in R6Δ*kin11reg11P_{vegW}* überexprimiert, womit ein Effekt des ABC-Transporters auf die Aktivität von P_{11.2} nicht auszuschliessen ist. Jedoch führt die *smp11A*-Deletion zur Aktivitäts-Erhöhung und die gemeinsame, isolierte Überexpression aller im 11-1-Operon kodierten Proteine zur Kompensation einer Erhöhung der P_{11.2}-Aktivität infolge fehlender Kin11 (R6Δ*kin11reg11P_{vegW}*). Der einzige, bezüglich des Einflusses auf den regulatorischen Mechanismus an P_{11.2} relevante Unterschied zwischen den beiden Stämmen R6Δ*smp11A* und R6Δ*kin11reg11P_{vegW}* besteht wahrscheinlich in der An- oder Abwesenheit von Smp11A. Ohne die Kenntnis darüber, ob Nbp11/Msp11 alleine ein Substrat transportieren kann, oder ob Smp11A als Substratbindeprotein fungieren muß, kann jedoch keine sichere Aussage über die Folgen einer *smp11A*-Deletion auf den Transport des unbekanntem Substrats von

Nbp11/Msp11 und somit keine sichere Aussage bezüglich eines Effekts dieses Transports auf die $P_{11.2}$ -Aktivität getroffen werden.

Denkbar wäre bezüglich des Einflusses auf den regulatorischen Mechanismus an $P_{11.2}$ und in Anlehnung an das in Abbildung 5.5 dargestellte Modell, daß lediglich das Verhältnis von nicht miteinander interagierendem Smp11A und Smp11B zu miteinander interagierendem Smp11A und Smp11B eine Rolle spielt. Smp11A müsste hierbei zumindest die in Abbildung 5.5 gezeigte Rolle als Bindeprotein einer unbekannt Substanz besitzen, wobei diese Substanz auch das Substrat des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 darstellen könnte. Für den unbekannt regulatorischen Mechanismus würde dies zusätzlich zur vermuteten Perzeption der Anwesenheit von Kin11 in der Cytoplasmamembran, bedeuten, daß er ebenso zwischen miteinander interagierendem Smp11A und Smp11B und nicht miteinander interagierendem Smp11A und Smp11B durch Perzeption des Smp11A/Smp11B-Komplexes diskriminieren kann. Anhand eines solchen Modells ließen sich die beobachteten Effekte auf die Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ in den einzelnen Deletionsmutanten und der isolierten Überexpression der im 11-1-Operon kodierten Proteine zwar alle erklären, jedoch erscheint es eher unwahrscheinlich, daß der unbekannt regulatorische Mechanismus befähigt ist, sowohl Kin11 als auch einen Smp11AB-Komplex zu perzipieren.

Eine plausible und einfachere Erklärung für die Effekte auf den an Promotor $P_{11.2}$ regulierenden Mechanismus wäre, daß Smp11A tatsächlich als Substratbindeprotein des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 fungiert. In $R6\Delta smp11A$ könnte somit kein Transport des unbekannt Substrats stattfinden, wobei gleichzeitig durch den in Abbildung 5.5 dargestellten Mechanismus Kin11 mit Smp11B interagiert. Die Interaktion von Kin11 und Smp11B führt jedoch dazu, dass das vermutete Sensor-Protein des unbekannt regulatorischen Mechanismus an $P_{11.2}$ kein Kin11 mehr perzipiert und somit $P_{11.2}$ induziert wird (Abbildung 5.6). Die gemeinsame, isolierte Überexpression der im 11-1-Operon kodierten Proteine in $R6\Delta kin11regIIP_{vegW}$ zeigte, dass im Gegensatz zu $R6\Delta kin11$ oder $R6\Delta kin11regI1$, trotz Abwesenheit von Kin11 die Erhöhung der Aktivität von $P_{11.2}$ ausbleibt. Ein Transport des unbekannt Substrats durch Nbp11/Msp11 unter Beteiligung von Smp11A als Substratbindeprotein sollte in $R6\Delta kin11regIIP_{vegW}$ möglich sein. Somit könnte gefolgert werden, dass die Zu- oder Abnahme der Konzentration des unbekannt Substrats (je nachdem ob Nbp11/Msp11 einen Importer oder Exporter darstellt) die in $R6\Delta kin11regI1$ oder $R6\Delta kin11$ beobachtete Erhöhung der Aktivität von Promotor $P_{11.2}$ infolge der Abwesenheit von Kin11 in $R6\Delta kin11regIIP_{vegW}$ verhindert. Das Substrat des ABC-Transporters wirkt folglich als Antagonist zur durch den Sensor-Mechanismus vermittelten Erhöhung der Aktivität von $P_{11.2}$. In Abbildung 5.7 wurde diese Funktion des Substrats unter der Annahme, daß es sich im Fall des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 um einen Importer handelt, dargestellt.

Die in Abbildung 5.7 gezeigte Hemmung könnte durch eine direkte Interaktion mit einem unbekannt transkriptionellen Regulator, welcher die Aktivität von $P_{11.2}$ reguliert, vermittelt werden.

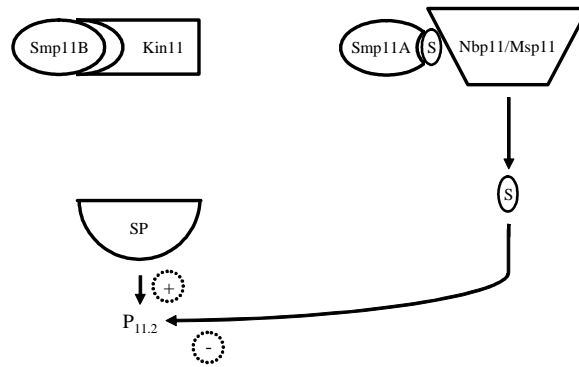


Abbildung 5.7: Modell zum putativen Einfluß des von Nbp11/Msp11 transportierten unbekannten Substrats auf die Aktivität von P_{11.2}. Infolge der Anwesenheit des durch den ABC-Transporter Nbp11/Msp11 transportierten unbekannten Substrats (S) im Cytosol erfolgt eine Hemmung der durch das Sensor-Protein (SP) des unbekannten regulatorischen Mechanismus vermittelten Induktion von Promotor P_{11.2}. Würde für Nbp11/Msp11 eine Exporter-Funktion angenommen, so würde die Abwesenheit des unbekannten Substrats eine Induktion von P_{11.2} durch den unbekannten regulatorischen Mechanismus verhindern (nicht gezeigt).

Mögliche Modelle zur Regulation des TCS11-Clusters

Unter Berücksichtigung der in den Abbildungen 5.5, 5.6 und 5.7 dargestellten Zusammenhänge lässt sich ein Modell zur transkriptionellen Regulation der Gene im TCS11-Cluster, sowie zu den Interaktionen aller beteiligten Proteine erstellen. Anhand dieses Modells könnten nahezu alle beobachteten Effekte auf die Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} erklärt werden. Lediglich die leichten Erhöhungen der Aktivität von Promotor P_{11.1} infolge der Deletion von *smp11B* und *smp11AB* sind aus diesem Modell nicht direkt ableitbar. Die Zusammenhänge hätten wiederum, sowohl unter der Annahme, daß der ABC-Transporter Nbp11/Msp11 einen Importer darstellt, als auch unter der Annahme einer Exporter-Funktion für Nbp11/Msp11 Bestand. In Abbildung 5.8 wurde dieses Modell dargestellt. Der ABC-Transporter Nbp11/Msp11 wurde hier zur besseren Übersicht erneut nur als Importer dargestellt.

Das Modell würde einen effektiven Kontrollmechanismus zur Überwachung der Konzentration einer Substanz innerhalb der Cytoplasmamembran darstellen, vorausgesetzt Smp11A bindet hierbei die unbekannte Substanz in der Cytoplasmamembran.

Das aus den im TCS11-Cluster kodierten Proteinen bestehende System könnte sich *in vivo* in drei verschiedenen Zuständen befinden, welche direkt abhängig von der Konzentration der unbekannten Substanz in oder an der Cytoplasmamembran wären:

I. Das System befindet sich überwiegend in einem Zustand, in dem die in der Cytoplasmamembran vorhandene Menge an Smp11A, Smp11B, Nbp11 und Msp11 ausreichend ist, um die unbekannte Substanz effektiv aus der Membran in das Cytosol zu transportieren, oder bei einer bestimmten Konzentration zu halten (I, grün hinterlegt in Abbildung 5.8). Das System befindet sich folglich in einem Gleichgewichtszustand, in dem der Komplex aus Smp11A und Smp11B dissoziiert, wenn Smp11A die Substanz bindet und dem ABC-Transporter Nbp11/Msp11 zuführt. Nach erfolgtem Transport der unbekannten Substanz in das Cytosol komplexieren Smp11A und Smp11B wieder und schließen somit den Kreislauf. Die im Cytosol vorhandene Menge der unbekannten Substanz würde, eventuell als ein Effektor des unbekannten transkriptionellen Regulators (vereinfacht dargestellt durch das Sensor-Protein SP) die Induktion von P_{11.2} durch diesen Regulator verhindern.

II. Das System befindet sich in einem Zustand, in dem die in der Cytoplasmamembran vorhandene Menge an Smp11A, Smp11B, Nbp11 und Msp11 nicht ausreichend ist, um die unbekannte Substanz effektiv aus der Membran in das Cytosol zu transportieren, oder bei einer bestimmten Konzentration zu halten (II, blau hinterlegt in Abbildung 5.8). In diesem Fall würde vermehrt freies Smp11B auftreten, welches durch Interaktion mit Kin11 den Stimulus an Kin11 weiterleitet und so zunächst zur Dissoziation von Kin11 und Sensor-Protein SP, sowie zur Autophosphorylierung (Aktivierung) von Kin11 führt. Kin11 würde im Anschluß Reg11 phosphorylieren, was zur Bindung von phosphoryliertem Reg11 an die identifizierte DNA-Sequenz im Bereich des Promotors $P_{11.1}$ führt. Die hierdurch ausgelöste Expression der im 11-1-Operon kodierten Proteine Smp11A, Smp11B, Nbp11 und Msp11 führt zu einer erhöhten Transportkapazität in Bezug auf die unbekannte Substanz. Ist diese Kapazität ausreichend, um die cytosolische Konzentration der unbekanntes Substanz soweit zu erhöhen, sodaß die Wirkung des nun ebenfalls vermehrt frei vorliegenden Sensor-Proteins SP quantitativ kompensiert werden kann, kehrt das System nach der Wiederherstellung der notwendigen Konzentration der unbekanntes Substanz in der Cytoplasmamembran wieder in Zustand I zurück. Somit erfolgt keine, oder nur eine kurzzeitige Erhöhung der Aktivität von $P_{11.2}$ durch den unbekanntes transkriptionellen Regulator.

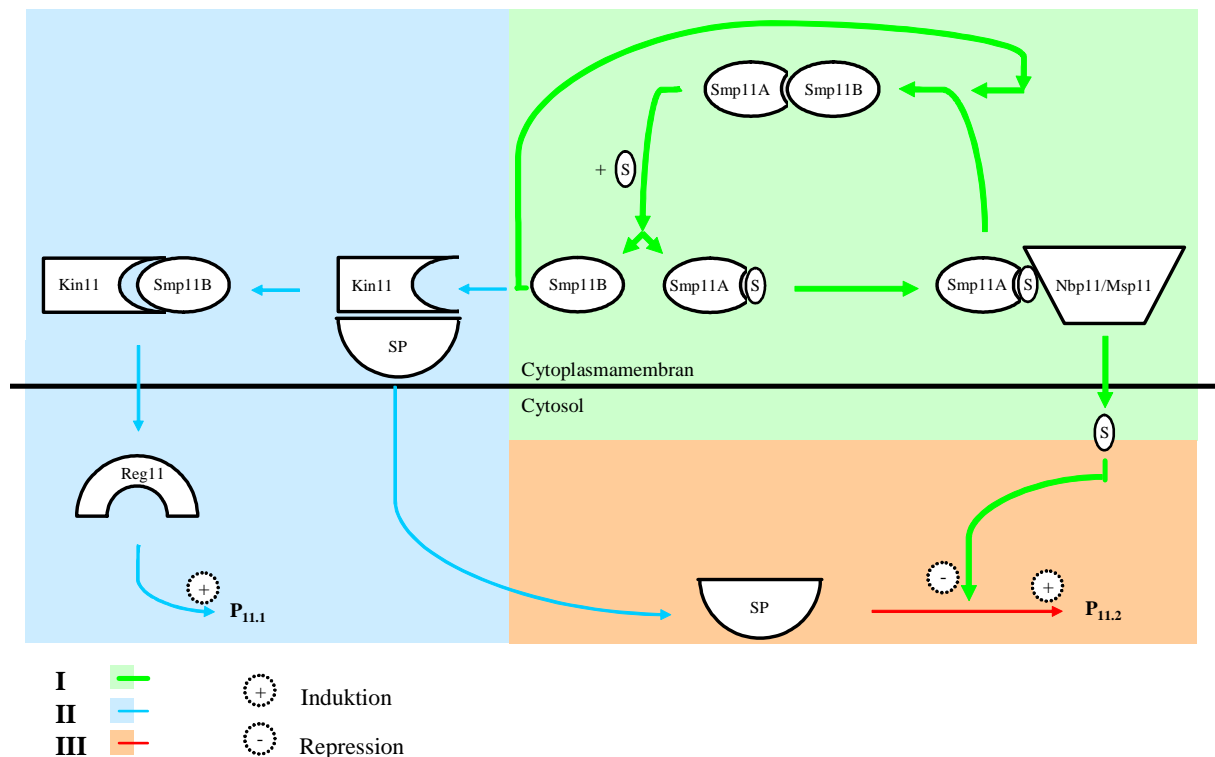


Abbildung 5.8: Modell zur Regulation des TCS11-Clusters. Dargestellt wurden die aufgrund der beobachteten Effekte auf die Aktivitäten der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ gefolgerten Funktionen und Interaktionen der im TCS11-Cluster kodierten Proteine. Der ABC-Transporter Nbp11/Msp11 wurde als Importer dargestellt. Das dargestellte System kann demnach drei Zustände annehmen. I. Mechanismus bei ausreichendem Transport des unbekanntes Substrats durch Nbp11/Msp11 (grün). II. Mechanismus bei erhöhtem Bedarf eines Transports (blau und grün). III. Mechanismus bei ungenügendem Transport durch I und II (orange). Nähere Erläuterungen im Text.

III. Das System befindet sich in einem Zustand, in dem auch die Erhöhung der Expression der im 11-1-Operon kodierten Proteine Smp11A, Smp11B, Nbp11 und Msp11 durch die Aktivierung des Zweikomponentensystems Kin11/Reg11 nicht ausreichend ist, um die unbekanntes Substanz effektiv aus der Membran in das Cytosol zu transportieren, oder bei einer bestimmten Konzentration zu halten (III, orange hinterlegt in Abbildung 5.8). Folge

hiervon ist die Akkumulation von freiem, cytosolischem Sensor-Protein SP. Die in das Cytosol transportierte Menge der unbekannt Substanz genügt jedoch nicht, um die Wirkung von SP quantitativ zu kompensieren. SP kann nun die Aktivität des Promotors $P_{11.2}$ und somit die Expression von *Kin11* und *Reg11* erhöhen. Die nun größere Menge von *Kin11* und *Reg11* führt zu einer noch stärkeren Induktion von $P_{11.1}$ und folglich zu einer noch größeren Menge an *Smp11A*, *Smp11B*, *Nbp11* und *Msp11*. Das System befindet sich nun in einem Zustand maximaler (Transport-) Aktivität. Dieser Zustand sollte so lange anhalten, bis die erforderliche Konzentration der unbekannt Substanz in der Cytoplasmamembran wieder vorliegt. *Smp11B* und *Smp11A* komplexieren, *Kin11* und *Smp11B* dissoziieren, *Kin11* komplexiert mit SP und die cytosolische Konzentration der unbekannt Substanz ist nun wieder hoch genug, um die Wirkung des verbleibenden freien SP zu kompensieren. Die Aktivität der beiden Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ sinkt folglich und das System kehrt wieder in den Ausgangszustand zurück.

Würde für den ABC-Transporter *Nbp11/Msp11* eine Exporter-Funktion angenommen, so müsste dieses Modell lediglich in drei Punkten modifiziert werden: Das System würde die Konzentration der unbekannt Substanz in der Cytoplasmamembran nicht durch einen aktiven Transport von überschüssigen Mengen aus der Membran in das Cytoplasma regulieren, sondern durch einen aktiven Transport vom Cytosol in die Cytoplasmamembran hinein. Zudem müssten *Smp11A* und *Smp11B* nicht in Abwesenheit, bzw. geringen Konzentrationen der Substanz, sondern in Anwesenheit der unbekannt Substanz, zusammen mit dieser einen Komplex bilden, welcher in Abwesenheit oder bei zu geringer Konzentration dieser Substanz dissoziiert und somit letztendlich die entsprechenden Effekte auf die beiden Promotoren des TCS11-Clusters hervorruft. Zusätzlich würde sich der Einfluss der unbekannt Substanz im Cytoplasma auf den unbekannt transkriptionellen Regulator an Promotor $P_{11.2}$ in der Art verändern, daß durch die Anwesenheit dieser Substanz keine Aufhebung des induktiven Effekts des Regulators auf $P_{11.2}$ erfolgen würde, sondern vielmehr die Anwesenheit im Cytoplasma eine Voraussetzung für diesen induktiven Effekt wäre. Da das von *Nbp11/Msp11* transportierte Substrat noch nicht identifiziert ist, lässt sich momentan jedoch nicht abschätzen, welche Annahme bezüglich der Funktion des ABC-Transporters *Nbp11/Msp11* zutreffend ist.

Die Deletion des putativen Substratbindeproteins *Smp11A* ($R6\Delta smp11A$) würde laut diesem Modell zu einer dem Zustand III entsprechenden Situation führen. Es liegt nur freies *Smp11B* vor, was zur beobachteten Induktion von $P_{11.1}$ führt. Da zudem durch die Deletion des Substratbindeproteins kein Substrat von *Nbp11/Msp11* transportiert werden kann, entfällt die durch das Substrat vermittelte Hemmung des unbekannt regulatorischen Mechanismus an $P_{11.2}$, wodurch die Aktivität von $P_{11.2}$ erhöht wird.

Der durch den ABC-Transporter vermittelte Transport wird in den Deletionsmutanten $R6\Delta smp11AB$, $R6\Delta nbp11$, $R6\Delta msp11$, $R6\Delta msp11_3$, $R6\Delta msp11_5$, $R6\Delta kin11$, $R6\Delta reg11$ und $R6\Delta kin11reg11$ ebenfalls unterbunden. Jedoch unterscheiden sich diese Deletionsmutanten bezüglich des Effekts auf das System erheblich.

In $R6\Delta kin11$, $R6\Delta reg11$ und $R6\Delta kin11reg11$ werden weder *Smp11A* und *Smp11B*, noch der ABC-Transporter *Nbp11/Msp11* exprimiert. Die Hemmung durch das Substrat von *Nbp11/Msp11* auf den unbekannt regulatorischen Mechanismus entfällt in allen drei Deletionsmutanten. Lediglich in $R6\Delta kin11$ und $R6\Delta kin11reg11$ findet jedoch auch eine Induktion von $P_{11.2}$ statt, da nur hier das unbekannt Sensor-Protein SP aufgrund der Deletion von *kin11* in ungebundener Form vorliegt und einen Effekt ausüben kann.

In $R6\Delta nbp11$, $R6\Delta msp11$, $R6\Delta msp11_3$ und $R6\Delta msp11_5$ sollte ebenfalls kein Transport des unbekannt Substrats durch *Nbp11/Msp11* mehr möglich sein. Laut dem vorgeschlagenen Modell hätte die Unterbindung des Transports eine Sättigung von *Smp11A* und somit eine

Akkumulation von freiem Smp11B zur Folge. Freies Smp11B würde durch Interaktion mit Kin11 letztendlich auch zur Induktion von $P_{11.1}$ führen. Jedoch ist die Aktivitätserhöhung von $P_{11.1}$ in $R6\Delta nbp11$ doppelt so hoch wie im Fall der drei verschiedenen Deletionen von *msp11*. In $R6\Delta nbp11$ entfällt lediglich die Energetisierung des Transports durch das ATP-Bindeprotein Nbp11. Im Gegensatz zu $R6\Delta msp11$, $R6\Delta msp11_5$ und $R6\Delta msp11_3$ ist jedoch noch funktionsfähiges Msp11 vorhanden. Die Permease Msp11 könnte folglich Substrat-gebundenes Smp11A binden und so dazu führen, daß im Vergleich zu den verschiedenen Deletion von *msp11* ein größerer Teil von Smp11B in freier Form vorliegt. Folge hiervon wäre die beobachtete stärkere Induktion von $P_{11.1}$ in $R6\Delta nbp11$. Die Inaktivierung von *msp11* selbst führt zwar auch zur Unterbindung des Transports, jedoch führt hier die Abwesenheit von Msp11 dazu, daß kein zusätzliches, Substrat-gebundenes Smp11A aus dem Kreislauf durch Bindung an Msp11 entfernt wird. Die ausbleibende Erhöhung des Promotors $P_{11.2}$ in den Deletionsmutanten $R6\Delta nbp11$, $R6\Delta msp11$ und $R6\Delta msp11_5$ zeigt eventuell, daß unter den gegebenen Wachstumsbedingungen die infolge dieser Deletionen erhöhte Expression von Smp11A ausreichend ist, um den ausfallenden Transport des Substrats über eine Bindung des Substrats an Smp11A zu kompensieren. Der Stimulus zur Aktivierung des Systems scheint am Übergang zur stationären Phase natürlicherweise vorzuliegen. Jedoch scheint auch hier ein Transport des unbekanntes Substrats, gemessen an der geringen Aktivitäts-Erhöhung von Promotor $P_{11.1}$ nur begrenzt notwendig zu sein. Da Promotor $P_{11.2}$ in dieser Phase des Wachstums jedoch keinen signifikanten Anstieg der Aktivität zeigt, muß aufgrund des vorgeschlagenen Modells davon ausgegangen werden, das im Cytosol genügend Substrat vorhanden ist, um eine Induktion von $P_{11.2}$ durch den unbekanntes regulatorischen Mechanismus zu verhindern.

Die Deletionsmutante $R6\Delta msp11_3$ zeigt hingegen auch einen starken induktiven Effekt auf Promotor $P_{11.2}$. Dies liegt jedoch wahrscheinlich in der unbekanntes Funktion des 5'-untranslatierten Bereichs des Transkriptes des 11-2-Operons begründet, welcher in dieser Deletionsmutante durch die Deletion von *msp11* ebenfalls deletiert wurde. Folge dieser Deletion ist ein Abfall der Transkriptmenge von *kin11*. Aufgrund der in $R6\Delta msp11_3$ geringeren Transkriptmenge von *kin11* muß angenommen werden, daß weniger Kin11-Protein vorhanden ist. Aufgrund des im vorgeschlagenen Modell gefolgerten Mechanismus zur Regulation von $P_{11.2}$ führt dies, ähnlich wie im Fall der Deletion von *kin11*, aufgrund einer im Vergleich zur Konzentration des unbekanntes Substrats im Cytoplasma hohen Konzentration des unbekanntes SP-Proteins zur Induktion von $P_{11.2}$. Andererseits muß Kin11 einen höheren Phosphorylierungsstatus besitzen, was die Erhöhung der Aktivität von $P_{11.1}$ erklären würde. Diese höhere Aktivität von Kin11 wird wiederum durch die geringere Menge von Kin11 im Vergleich zu freiem Smp11B und der damit verbundenen Stimulierung von Kin11 infolge der Interaktion mit freiem Smp11B verursacht.

Das vorgeschlagene Modell basiert auf den Aktivitäten der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ in den verschiedenen Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters. Letztendlich muß es jedoch als ein vorläufiger Ansatz zur Beschreibung der Zusammenhänge angesehen werden, da es die leichte Erhöhung der Aktivität von $P_{11.1}$ in $R6\Delta msp11B$ oder $R6\Delta msp11AB$ nicht hinreichend erklären kann. Zwar sind mit dem vorgeschlagenen Modell die meisten Effekte auf die beiden Promotoren des TCS11-Cluster zu deuten, jedoch fehlen einige wichtige Erkenntnisse, welche zur Beurteilung dieses Modells unverzichtbar sind. In nahe verwandten Streptococccen sind keine Homologe zu Smp11A oder Smp11B vorhanden. Ein Transport des Substrats und auch die Perzeption des Stimulus durch die entsprechende Histidin-Kinase scheint zumindest in diesen Organismen auch ohne diese Proteine möglich zu sein. Das Substrat könnte im Vergleich zu diesen Organismen in *Streptococcus pneumoniae* modifiziert vorliegen. In diesem Zusammenhang könnte, wie bereits vermutet, die Aufgabe von Smp11A und Smp11B auch darin bestehen, die Perzeption eines zweiten Stimulus durch die Histidin-Kinase Kin11

zu ermöglichen. Die Tatsache, daß die Aktivität von $P_{11.1}$ in $R6\Delta smp11B$ oder $R6\Delta smp11AB$ leicht steigt, anstatt wie erwartet zu sinken, zeigt, daß Kin11 in der Lage ist, auch ohne Smp11B einen Stimulus, genauso wie dies in anderen Streptococcen zu funktionieren scheint, zu perzipieren. Hierbei könnte es sich um einen Metaboliten der Substanz, welche in den nahe verwandten Streptococcen den Stimulus für die Kin11-Homologe darstellt, handeln. Als mögliche Kandidaten für beide Stimuli kämen hier vor dem Hintergrund des zu $R6\Delta cpoA$ nahezu identischen Phänotyps der Deletionsmutanten einzelner Gene des TCS11-Clusters und der postulierten physiologischen Funktion von CpoA die verschiedenen Glycolipide der Cytoplasmamembran und die Precursor der Lipoteichonsäuren bzw. ihres Lipidankers in *Streptococcus pneumoniae* in Betracht (5.4). Das vorgeschlagene Modell würde durch diese Annahme dahingehend beeinflusst, daß nicht die von Smp11A gebundene Substanz durch Nbp11/Msp11 transportiert würde, sondern eventuell nur eine Vorstufe dieser Substanz, welche im Anschluß an den Transport modifiziert werden müsste. Hierfür könnten auch die Ergebnisse der globalen Transkriptomanalysen der Deletionsmutanten $R6\Delta smp11A$ und $R6\Delta msp11_3$ sprechen. Beide Transkriptome zeigten Veränderungen, welche zum überwiegenden Teil die gleichen Gene betreffen. Allerdings stellen die Effekte auf die Transkriptmengen dieser Gene in $R6\Delta smp11A$ bis auf drei Ausnahmen genau die gegenteiligen Effekte als die in $R6\Delta msp11_3$ dar. Würde nun, wie im vorgeschlagenen Modell angenommen, sowohl in $R6\Delta smp11A$, als auch in $R6\Delta msp11_3$ lediglich der Transport der unbekanntes Substanz ausfallen, so könnten diese gegenteiligen Effekte auf die Transkriptmengen nur schwer erklärt werden. Wenn jedoch Smp11A einen direkten Metaboliten der transportierten Substanz binden würde, und würde die von Nbp11/Msp11 transportierte Substanz zugleich den Precursor darstellen, so wären diese Effekte im Transkriptom erklärbar. Die Deletion von Smp11A suggerierte dem System die Abwesenheit des Metaboliten, obwohl er wahrscheinlich in genügender Menge vorhanden ist. Folge hiervon ist die im Modell beschriebene Aktivierung beider Promotoren des TCS11-Clusters zur Steigerung der Transportkapazität für den Precursor. Dies führt letztendlich zu einem Überangebot des Precursors oder des Metaboliten. Die Inaktivierung von *msp11* in $R6\Delta msp11_3$, welche gleichzeitig zwar ebenfalls die Aktivierung beider Promotoren zur Folge hat, führt jedoch zum Ausfall des Transports des Precursors und so zu genau dem gegenteiligen Effekt, welcher auch im Transkriptom von $R6\Delta msp11_3$ im Vergleich zu $R6\Delta smp11A$ zu beobachten ist. Zudem müsste für Nbp11/Msp11 eher eine Exporter-Funktion angenommen werden und es wäre wahrscheinlicher, daß der Effekt des unbekanntes regulatorischen Mechanismus an $P_{11.2}$ nicht durch ein von Nbp11/Msp11 transportiertes Substrat beeinflusst wird. Der Effekt auf $P_{11.2}$ könnte demnach eventuell doch, wie bereits erwähnt, durch die Fähigkeit des postulierten Sensor-Proteins SP, zusätzlich zu Kin11 auch einen Komplex von Smp11A und Smp11B zu perzipieren, beeinflusst werden. Das vorgeschlagene Modell würde sich folglich wie in Abbildung 5.9 dargestellt ändern.

Sowohl freie, nicht mit Smp11B komplexierte Kin11, als auch ein Komplex von Smp11A, Smp11B und S2 würde laut diesem Modell durch das unbekanntes Sensor-Protein SP perzipiert. Nur wenn Kin11 und der Smp11AB-S2-Komplex nicht zur Bindung mit SP zur Verfügung stehen, erfolgt eine Aktivierung von Promotor $P_{11.2}$ (orange hinterlegt in Abbildung 5.9). Zudem würde Nbp11/Msp11 einen Exporter darstellen, welcher den Precursor S1 der unbekanntes, durch Smp11A perzipierten Substanz S2 transportiert. S1 müsste in S2 umgewandelt werden. Diese Modifikationen beruhen auf den im Vergleich zur *cpoA*-Deletion sehr ähnlichen phänotypischen Effekten einzelner Deletionen von Genen des TCS11-Clusters und damit auf der vermuteten Funktion von CpoA bei der Synthese der Glycolipide, sowie der damit verbundenen Effekte auf die Lipoteichonsäuren. Zudem beruhen sie auf der Tatsache, daß in $R6\Delta cpoA$, $R6\Delta smp11A$ und $R6\Delta msp11_3$ meist die Transkriptmengen der gleichen Gene verändert sind und auf der Beobachtung, daß in

$R6\Delta smp11B$ und $R6\Delta smp11AB$ eine leichte Erhöhung der Aktivität von Promotor $P_{11.1}$ zu beobachten ist.

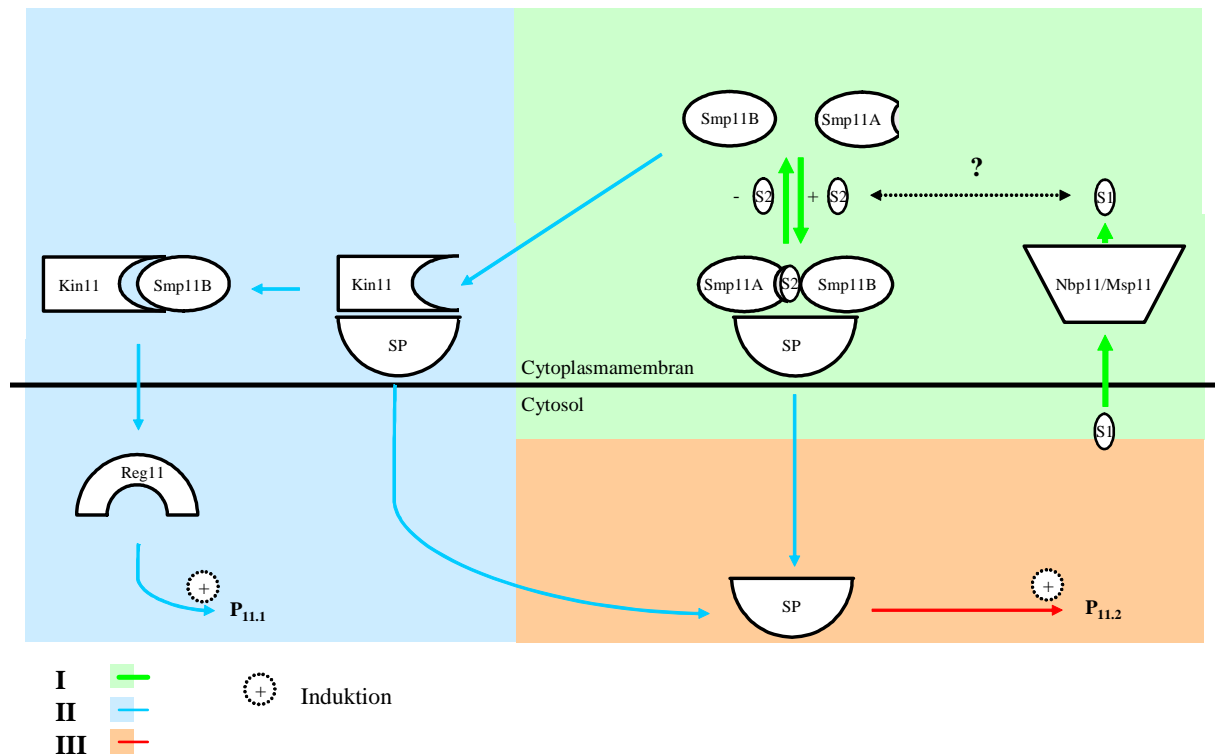


Abbildung 5.9: Alternatives Modell zur Regulation des TCS11-Clusters. Dargestellt wurden die aufgrund der beobachteten Effekte auf die Aktivitäten der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ und der Transkriptomanalysen von $R6\Delta smp11A$ und $R6\Delta smp11_3$ gefolgerten Funktionen und Interaktionen der im TCS11-Cluster kodierten Proteine. Der ABC-Transporter Nbp11/Msp11 wurde als Exporter dargestellt. Das dargestellte System kann demnach drei Zustände annehmen. I. Mechanismus bei ausreichendem Transport der unbekannten Substanz S1 (Precursor von S2) durch Nbp11/Msp11 (grün). II. Mechanismus bei erhöhtem Bedarf eines Transports (blau und grün). III. Mechanismus bei ungenügendem Transport durch I und II (orange). Nähere Erläuterungen im Text. Das Modell nimmt eine vermutete Umwandlung der unbekannten Substanz S1 zu S2 (gekennzeichnet durch ?) an und setzt die Perzeption von S1 und S2 als Stimulus von Kin11 voraus (Die Perzeption von S1 als Stimulus durch Kin11 wurde aus Übersichtsgründen nicht dargestellt).

Dieses modifizierte Modell würde zwar die Deutung nahezu aller Effekte auf Promotoren und die Effekte im Transkriptom zulassen, jedoch müssen für dieses Modell viele, nur auf Hinweisen basierende Annahmen gemacht werden, welche noch der experimentellen Verifizierung bedürfen.

5.3.2 Die Funktion der 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche der mRNA des 11-2-Operons

Verschiedene Deletionsmutanten des 5'- bzw. des 3'-untranslatierten Bereichs der mRNA des 11-2-Operons führten teilweise zu erheblichen Effekten auf die Aktivität der Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$. Für diese Bereiche der mRNA könnten sowohl Funktionen, welche die mRNA-Stabilität beeinflussen, als auch Funktionen, welche die Translation der auf der mRNA kodierten Proteine beeinflussen, angenommen werden. In beiden Bereichen finden sich Sequenzen, welche durch entsprechende Faltung der mRNA Strukturen mit großer Ähnlichkeit zu mRNA-Strukturen in anderen Bakterien oder in Eukaryonten ausbilden, von

denen bereits nachgewiesen wurde, daß sie sowohl die mRNA-Stabilität, als auch die Translation beeinflussen.

Der 5'-untranslatierte Bereich der mRNA

Die Deletion des 5'-untranslatierten Bereichs der mRNA des 11-2-Operons führte zur Erhöhung der Aktivität der Promotoren P_{11.1} und P_{11.2} in der resultierenden Deletionsmutante R6Δ*msp11_3*. Auslöser hierfür war, wie eine Quantifizierung des *kin11*-Transkriptes in R6Δ*msp11_3* zeigte, eine verringerte Menge des *kin11*-Transkriptes (4.10.8.2.4). Die Deletion des 5'-untranslatierten Bereichs hatte also eine Destabilisierung der mRNA zur Folge. In Neisserien existiert ein Mechanismus, welcher in die posttranskriptionelle Regulation der Menge bestimmter mRNAs involviert ist. Hier führen mit den Genen kotranskribierte repetitive Elemente durch die Ausbildung von Hairpin-Strukturen und je nach Lage auf der mRNA zur Stabilisierung oder zur Destabilisierung der mRNA (Mazzone et al., 2001; deGregorio et al., 2002; deGregorio et al., 2003). Die Hairpin-Strukturen besitzen in ihrem Stamm und in ihrem Loop Sequenzen, welche sie der Degradation durch RNase III zuführen. Diese NEMIS-Elemente zeigen eine hohe Homologie zu den in *S. pneumoniae* vorkommenden rup-Elementen (Mazzone et al., 2001). Für die rup-Elemente wurde bisher keine Funktion beschrieben (Oggioni & Claverys, 1999). Rup-Elemente (*rupA*, *rupB1*, *rupB2* und *rupC*) bilden jedoch anscheinend eine den NEMIS-Elementen sehr ähnliche Hairpin-Struktur aus (Mazzone et al., 2001). Eventuell besitzen sie in *S. pneumoniae* eine ähnliche Funktion wie in Neisserien. Der 5'-untranslatierte Bereich der mRNA des 11-2-Operons besitzt eine Sequenz, welche eine den *rupA*-Elementen aus *S. pneumoniae* oder den NEMIS-Elementen aus Neisserien sehr ähnliche Struktur ausbilden könnte. Diese Struktur wurde durch Faltung der mRNA unter Verwendung der entsprechenden Funktion auf <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/> erhalten und in Abbildung 5.10 im Vergleich zur Sekundärstruktur des *rupA*-Elements und des NEMIS-Elements dargestellt.

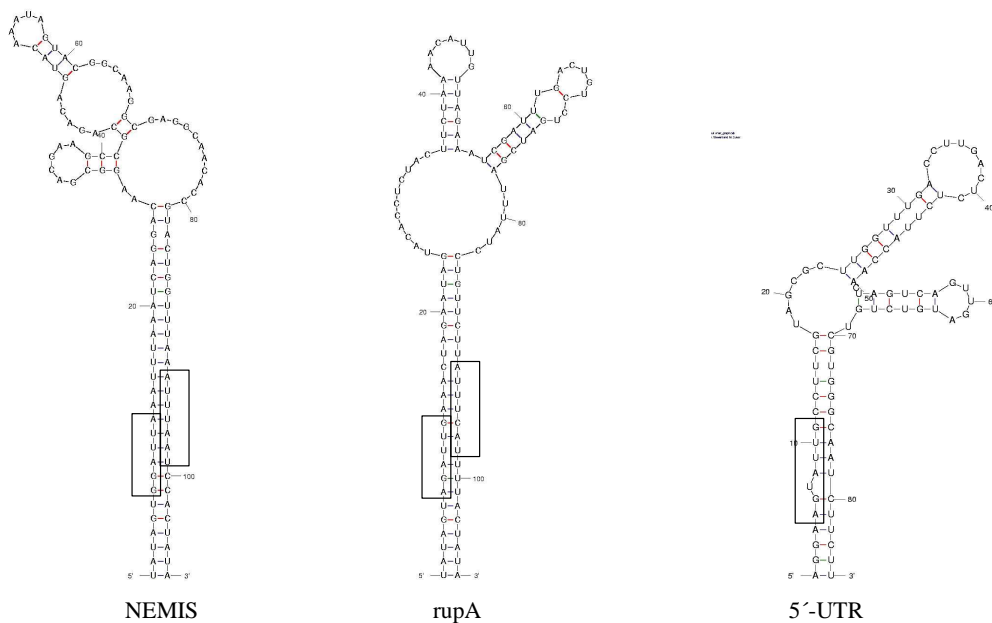


Abbildung 5.10: Vergleich der Sekundärstruktur von NEMIS-Elementen, des *rupA*-Elements und eines Teils des 5'-untranslatierten Bereichs (5'-UTR) der mRNA des 11-2-Operons. Dargestellt wurden die nach Faltung der mRNA auf <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/> erhaltenen Sekundärstrukturen. Umrandete Sequenzen geben den konservierten Bereich der RNase III-Prozessierungsstelle in NEMIS-Elementen in *Neisseria meningitidis* an (Mazzone et al., 2001). Die Sequenz der Sekundärstruktur des *rupA*-Elements entspricht der Sequenz der Kopie dieses Elements im 3'-untranslatierten Bereich des 11-2-Operons in *S. pneumoniae*.

Auffällig sind vor allem die Ähnlichkeiten im Bereich des Stamms der Hairpin-Struktur. In NEMIS-Elementen liegt in den in Abbildung 5.10 umrandeten Sequenzen die Stelle, welche für die Prozessierung durch RNase III in Neisserien verantwortlich ist. Eventuell könnte diese rupA-ähnliche Sekundärstruktur im 5'-untranslatierten Bereich der mRNA des 11-2-Operons einen regulatorischen Effekt, ähnlich derer der NEMIS-Elemente besitzen. Ohne weitere Kenntnisse über die Funktion von rup-Elementen in *S. pneumoniae* stellt dies jedoch lediglich eine Vermutung dar.

Alternativ könnte die untranslatierte Leadersequenz eine Rolle bei der Translationsregulation von *kin11*, beispielsweise durch das Vorhandensein eines Riboswitches, spielen (Barrick et al., 2004 und Referenzen). Dies würde jedoch nicht die verringerte Transkriptmenge von *kin11* in R6 Δ *msp11_3* erklären.

Der 3'-untranslatierte Bereich der mRNA

Im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA des 11-2-Operons konnte unmittelbar downstream des *reg11*-Gens ein Bereich identifiziert werden, welcher ähnlich gut konserviert zu sein schien, wie das *reg11*-Gen selbst. Zudem konnte von der weiter downstream liegenden Kopie des rupA-Elements gezeigt werden, daß es mit *kin11* und *reg11* kotranskribiert wird.

Die Deletion des 39bp umfassenden konservierten Bereichs downstream des *reg11*-Gens hatte eine erhebliche Erhöhung der Aktivität des Promotors P_{11.1} zur Folge. In dieser Deletionsmutante (R6 Δ inter) konnte jedoch keine verringerte Transkriptmenge von *kin11* beobachtet werden, was eine Erklärung dieses Effekts auf P_{11.1}, ähnlich wie im Fall von R6 Δ *msp11_3* geliefert hätte. Anscheinend wurde durch die Deletion ein Mechanismus verändert, welcher, da er offensichtlich keinen Effekt auf die mRNA-Menge hatte, nur noch auf translationeller Ebene oder bei der Transkriptionsinitiation involviert sein konnte. Effekte von 3'-untranslatierten Bereichen der mRNA auf die Translationsinitiation sind jedoch nur aus Eukaryonten beschrieben (Preiss & Hentze, 1999; Sachs & Varani, 2000). So konnten beispielsweise Sampath et al. (2003) zeigen, daß die Ausbildung einer bestimmten Hairpin-Struktur im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA, welche das Ceruloplasmin-Gen trägt, zur Bindung eines unbekanntes Protein-Komplexes führt und die Translation des Gens verhindert. Eine dieser sogenannten GAIT-Struktur (gamma-interferon activated inhibitor of translation) sehr ähnliche Sekundärstruktur der mRNA wurde unter Verwendung der Motiv-Suchfunktion auf <http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/index.html> innerhalb der ersten 39 Nukleotide downstream des *reg11*-Gens identifiziert (Abbildung 5.11).

Die dargestellte Sekundärstruktur der mRNA in Abbildung 5.11 erfüllt alle von Sampath et al. (2003) bestimmten Anforderungen eines GAIT-Elements, außer daß der innere Loop im vorliegenden Fall nicht asymmetrisch wäre und daß eines der Watson-Crick-Basenpaare im Stamm durch eine G-U-Paarung ersetzt wäre. Da jedoch unklar ist, inwiefern diese Struktur innerhalb der mRNA des 11-2-Operons ausgebildet wird und da bisher keine solchen Strukturen und Mechanismen in Prokaryonten beschrieben wurden, bleibt fraglich inwiefern dies eine Erklärung für den beobachteten Phänotyp von R6 Δ inter und für den Effekt auf Promotor P_{11.1} darstellen könnte.

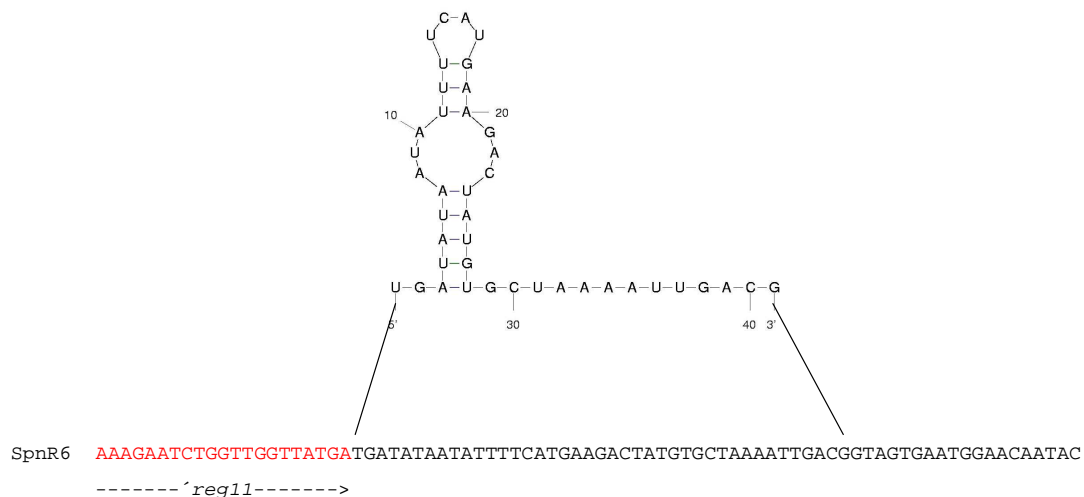


Abbildung 5.11: Putative Sekundärstruktur der mRNA downstream des *reg11*-Gens in *S. pneumoniae* R6. Die Nukleotidsequenz des 3'-Endes des *reg11*-Gens, sowie der 39 deletierten Nukleotide downstream von *reg11* in R6Δinter wurden in Großbuchstaben dargestellt. 'reg11': 3'-Ende von *reg11* (rot dargestellte Nukleotide). Die in R6Δinter deletierten Nukleotide wurden schwarz dargestellt. Die mRNA-Sekundärstruktur wurde durch Faltung der mRNA unter Verwendung der entsprechenden Funktion auf <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/> erhalten.

Von einer downstream des in Abbildung 5.10 gezeigten Bereichs liegenden Kopie des *rupA*-Elements konnte gezeigt werden, daß sie mit *kin11* und *reg11* kotranskribiert wird. Die Anwesenheit von *rupA* auf dem Transkript könnte zu dessen Stabilisierung führen. Diese Vermutung legte die Bestimmung der Aktivität von Promotor P_{11,2} und die Bestimmung der Transkriptmenge von *kin11* in der Deletionsmutante R6Δ*rup* nahe. Trotz steigender Aktivität des Promotors P_{11,2} war keine Veränderung der Transkriptmenge von *kin11* zu beobachten. Ein Effekt dieser Art konnte für die in Neisserien bekannten-, und zu *rupA* homologen NEMIS-Elemente bereits gezeigt werden (Mazzone et al., 2001). Da jedoch in *S. pneumoniae* über die Funktion der *rup*-Elemente noch keine Erkenntnisse vorliegen, kann ein solcher Effekt auf die mRNA-Stabilität nur vermutet und diese Resultate nur als Hinweis auf die eventuelle Funktion gewertet werden.

5.3.3 Der Response-Regulator Reg11 besitzt in unphosphoryliertem Zustand ebenfalls einen regulatorischen Effekt

Das vorgeschlagene Modell zur Regulation des TCS11-Clusters und zur Interaktion der einzelnen Proteine ermöglicht die Erklärung der Effekte auf die Promotoren des TCS11-Clusters. In Bezug auf die phänotypischen Effekte der Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters scheinen die beobachteten Effekte auf die Autolyse oder die Generationszeit ebenfalls erklärbar zu sein. Ist der durch Smp11A, Smp11B, Nbp11 und Msp11 gebildete Kreislauf durch die Inaktivierung einer Komponente gestört, so stellt sich laut vorgeschlagenem Modell in jedem Fall ein Ungleichgewicht zwischen Smp11A und Smp11B bzw. eine mehr oder weniger ausgeprägte Akkumulation des unbekanntes Substrats ein. Dies manifestiert sich in einem ebenso mehr oder weniger ausgeprägten Phänotyp. Wird durch die Deletion von *reg11*, bzw. *kin11* und *reg11* die Expression sämtlicher Komponenten des Systems verhindert (die im 11-1-Operon kodierten Proteine Smp11A, Smp11B, Nbp11 und Msp11), so existiert auch kein deregulierter Transport der unbekanntes Substanz und es zeigt sich kein phänotypischer Effekt im Vergleich zu R6.

Das Modell versagt jedoch auf den ersten Blick bei der Deutung der phänotypischen Unterschiede zwischen den Deletionsmutanten *R6 Δ kin11*, *R6 Δ reg11* und *R6 Δ kin11reg11*. Alle drei Deletionsmutanten hätten den Ausfall der Transkription der Gene des 11-1-Operons zur Folge. Jedoch zeigt nur *R6 Δ kin11* einen Phänotyp in Bezug auf die Autolyse, die maximale Zelldichte und die Generationszeit.

Der ausgeprägte Wachstums- und Lysephänotyp von *R6 Δ kin11* im Vergleich zu *R6 Δ reg11* oder *R6 Δ kin11reg11* liegt offensichtlich in der Fähigkeit des Response-Regulators Reg11 begründet, in unphosphoryliertem Zustand mit einer weiteren, noch uncharakterisierten DNA-Bindestelle zu interagieren und so die Transkription von Zielgenen zu regulieren.

Der Unterschied von *R6 Δ kin11* im Vergleich zu *R6 Δ reg11* und *R6 Δ kin11reg11* besteht in der im Vergleich zu R6 erhöhten Transkription des isoliert vorliegenden *reg11*-Gens. Reg11 liegt in *R6 Δ kin11* eindeutig unphosphoryliert vor, denn hierfür war die fehlende Aktivität von P_{11.1} in *R6 Δ kin11* der direkte Beweis. Ein Effekt infolge einer ausfallenden Regulation von weiteren Genen, welche Reg11 in phosphoryliertem Zustand zusätzlich regulieren könnte, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. In diesem Fall müsste die Deletion von *kin11* und die Doppeldeletion von *kin11* und *reg11* den gleichen Effekt verursachen. Diese Möglichkeit war zudem durch die Tatsache, daß keine weiteren der zur Bindung von phosphoryliertem Reg11 notwendigen essentiellen DNA-Sequenzen im Genom von R6 gefunden werden konnten eher unwahrscheinlich.

Die Fähigkeit der Regulation von Genen durch Reg11 in unphosphoryliertem Zustand bedingt, daß noch eine weitere DNA-Bindestelle, welche eine von der im Promotor-Bereich von P_{11.1} abweichende Sequenz besitzt, existiert. Eine solche Bindestelle könnte durch eine Analyse der Promotorregionen von Genen, welche eine veränderte Transkriptmenge in *R6 Δ kin11* zeigen, eventuell identifiziert werden. Response-Regulatoren, welche sowohl in phosphoryliertem-, als auch in unphosphoryliertem Zustand in der Lage sind, die Transkription verschiedener Gene zu regulieren, wurden bereits beschrieben. Beispielsweise ist der Response-Regulator DegU des Zweikomponentensystems DegSU aus *B. subtilis*, welcher zur Gruppe der NarL-Regulatoren zählt, hierzu befähigt (Tsukahara & Ogura, 2008). In phosphoryliertem Zustand bindet DegU an ein Direct Repeat und in unphosphoryliertem Zustand bindet DegU an ein Inverted Repeat in der Promotor-Region regulierter Gene.

In dem vorgeschlagenen Modell würde ein unphosphoryliert vorliegender Regulator Reg11 einem Zustand entsprechen, in dem kein Transport des unbekanntes Substrats notwendig ist. Nur dann sollte Reg11 quantitativ in unphosphorylierter Form vorliegen. Dies bedeutet auch, daß wenn eine maximale Abweichung des Systems vom Normzustand in Bezug auf die Phosphorylierung von Reg11 vorliegt (hier künstlich herbeigeführt in *R6 Δ smg11A*, *R6 Δ msp11_3* oder *R6 Δ kin11*), die gleichen und vor allem ausgeprägtesten phänotypischen Veränderungen in Bezug auf Generationszeit und maximale Zelldichte auftreten.

5.4 Hinweise zur physiologischen Funktion des TCS11-Clusters

Hinweise zur physiologischen Funktion des TCS11-Clusters in *S. pneumoniae* R6 waren vor dem Nachweis der Beteiligung an einem Mechanismus zur Piperacillin-Resistenz praktisch nicht vorhanden. Lediglich Throup et al. (2000) zeigten in einem Maus-Modell zur Infektion, daß das Zweikomponentensystem 11 wohl nicht zur Virulenz von *S. pneumoniae* beiträgt. Auch von den zu den Proteinen im TCS11-Cluster genetisch vergleichbar angeordneten Homologen in publizierten Genomen anderer Gram-positiver Bakterien ist bis heute keines charakterisiert worden. Der einzige Hinweis auf durch ein dem Zweikomponentensystem 11 homologes System regulierte Gene stammt aus einer Arbeit von Kobayashi et al (2001). Das dem Zweikomponentensystem 11 homologe Zweikomponentensystem YvfTU aus *B. subtilis*,

welches in einem dem TCS11-Cluster in *S. pneumoniae* genetisch ähnlich organisierten Cluster kodiert ist (*yvfRSTU*), scheint in der Lage zu sein, zusätzlich zu den Genen des *yvfRSTU*-Clusters die Transkription eines für eine Membranlipid-Desaturase kodierenden Gens (*des*) zu regulieren. Diese Membranlipid-Desaturase ist in der Lage, Doppelbindungen in die Fettsäuren von Membranphospholipiden bei niedrigen Temperaturen einzufügen (Beranova et al., 2008 und Referenzen). Jedoch wurde die Regulation des *des*-Gens durch YvfTU bisher nicht überprüft. Phosphorylierter Response-Regulator Reg11 war in der Lage, sowohl an ein den Promotor P_{des} tragendes-, als auch an ein den Promotor P_{yvf} tragendes DNA-Fragment zu binden. Nur hierdurch konnten auch die zur Bindung von phosphoryliertem Reg11 essentiellen DNA-Sequenzen im Promotor-Bereich von $P_{11.1}$ identifiziert werden. Jedoch ist im Genom von *S. pneumoniae* keine vergleichbare Desaturase kodiert. Trotzdem konnte diese Beobachtung als ein eventueller Hinweis auf die physiologische Funktion des TCS11-Clusters in *S. pneumoniae* gedeutet werden. Im Rahmen der genetischen Charakterisierung des TCS11-Clusters ergaben sich zahlreiche Hinweise, welche einen Einfluss des TCS11-Clusters auf die Zusammensetzung der Cytoplasmamembran oder einer assoziierten Struktur nahelegten.

Kin11 konnte einer Gruppe von Histidin-Kinasen zugeordnet werden, welche aufgrund der Struktur ihrer Sensor-Domäne offensichtlich einen mit der Cytoplasmamembran assoziierten Stimulus perzipiert. Zudem bestehen die beiden putativen Membranproteine Smp11A und Smp11B lediglich aus zwei vorhergesagten Transmembrandomänen und sind offensichtlich an der Stimulus-Perzeption von Kin11 beteiligt. In allen bereits beschriebenen Fällen einer Beteiligung von zusätzlichen Membranproteinen bei der Stimulus-Perzeption von Histidin-Kinasen handelt es sich um solche Proteine, welche anhand ihrer vorhandenen Domänen einen klaren Bezug zum Ort, an welchem die perzipierte Substanz vorkommt, erkennen lassen (extracytosolisch, im Periplasma, cytosolisch; Szurmant et al., 2007b). Da es sich bei Smp11A und Smp11B anscheinend um reine Membranproteine ohne cytosolische- oder extracytosolische Domäne handelt, wurde gefolgert, daß sie den Stimulus für Kin11 innerhalb der Membran perzipieren und an Kin11 weiterleiten könnten. Eine Beteiligung an der Stimulus-Perzeption von Kin11 konnte durch die Bestimmung der Promotor-Aktivität von $P_{11.1}$ in den Deletionsmutanten $R6\Delta smp11A$, $R6\Delta smp11B$ und $R6\Delta smp11AB$ abgeleitet werden.

Ein weiterer Hinweis auf eine Regulation von Membran-assoziierten Komponenten durch die im TCS11-Cluster kodierten Proteine zeigte der Effekt auf die Transkription der an der Teichonsäurebiosynthese beteiligten Gene des *licI*-Operons. Es konnte gezeigt werden, daß die Überexpression der im 11-1-Operon kodierten Proteine Smp11A, Smp11B, Nbp11 und Msp11, abhängig von der Stärke ihrer Überexpression entweder eine erhöhte- oder eine fast komplett ausbleibende Transkription der Gene des *licI*-Operons ausgehend von Promotor $P_{1_{spr1149}}$ zur Folge hat (4.11.3). Lipoteichonsäuren sind in *S. pneumoniae* nach einem neueren Modell durch den Glycolipidanker GlcDAG in der Cytoplasmamembran verankert (5.1.2). Die Deletionsmutanten der einzelnen Gene des TCS11-Clusters zeigen einen dem von $R6\Delta cpoA$ vergleichbaren Phänotyp. Es wurde vermutet, daß das TCS11-Cluster in Anlehnung an die wahrscheinliche Funktion von CpoA bei der Synthese von Glycolipiden und den damit verbundenen Effekt auf die Lipoteichonsäuren eventuell eine regulatorische Funktion bezüglich der Zusammensetzung dieser, mit der Cytoplasmamembran assoziierten Komponenten wahrnimmt. Gestützt wurde diese Hypothese durch die Ergebnisse der globalen Transkriptomanalyse der Deletionsmutanten $R6\Delta smp11A$, $R6\Delta msp11_3$ und $R6\Delta cpoA$. Die bezüglich ihrer Transkriptmenge veränderten Gene in den Transkriptomen dieser Deletionsmutanten stimmten in großen Teilen überein. Neben dem in *B. subtilis* gezeigten Effekt des zu Kin11/Reg11 homologen Zweikomponentensystems YvfTU auf die Transkription eines Desaturase-Gens, welches Fettsäuren von Membranlipiden modifiziert, ist dies ein weiterer Hinweis auf eine mit Membranlipiden verbundenen Funktion des TCS11-

Clusters. Zwar ist in *S. pneumoniae* keine homologe Desaturase, welche bei niedrigen Temperaturen Doppelbindungen in die Fettsäuren von Phospholipiden einfügt kodiert, jedoch existieren bereits Hinweise in Gram-positiven Bakterien, daß diese Organismen neben der Modifizierung von Fettsäuren in Phospholipiden auch mit einer veränderten Zusammensetzung ihrer Glycolipide auf Umweltreize wie beispielsweise Temperaturschwankungen reagieren (Jorasch et al., 1998; Kiriukhin et al., 2001).

In Gram-positiven Bakterien wurde bis heute kein Zweikomponentensystem beschrieben, welches in die Regulation der Zusammensetzung der Glycolipide der Cytoplasmamembran involviert ist. Lediglich Zweikomponentensysteme, welche die D-Alanylierung der mit einem Glycolipid in der Cytoplasmamembran verankerten Lipoteichonsäuren regulieren, konnten in *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus agalactiae* beschrieben werden (Poyart et al., 2001; Koprivnjak et al., 2006). Diese Systeme stellen jedoch keine funktionell homologen Systeme oder Cluster zum TCS11-Cluster in *S. pneumoniae* dar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß die physiologische Funktion des TCS11-Clusters sehr eng mit der Funktion von CpoA verknüpft ist. Genauere Aussagen hierzu lassen sich jedoch erst nach einer Überprüfung der für CpoA vermuteten physiologischen Funktion bei der Synthese der Glycolipide in *S. pneumoniae* treffen. Die Überlegungen zu einem Modell der Regulation des TCS11-Clusters zeigen zumindest, daß das durch die im TCS11-Cluster kodierten Proteine gebildete System effektiv in der Lage sein könnte, die Zusammensetzung verschiedener, Membran-assoziiierter Komponenten, wie beispielweise Glycolipide oder Lipoteichonsäuren zu regulieren. So könnte das Zweikomponentensystem 11 beispielweise, basierend auf dem alternativen Modell zur Regulation des TCS11-Clusters (Abbildung 5.9) in der Lage sein, über die Proteine Smp11A und Smp11B die Anwesenheit von an das Glycolipid GlcDAG-gebundenen Repeating Units der Lipoteichonsäuren zu perzipieren. Diese stellten folglich die unbekannte Substanz S2 dar. Den weiteren Stimulus (S1) für Kin11 würde das unmodifizierte, zum zweiten Glycolipid GalGlcDAG im Verhältnis 1:100 vorkommende GlcDAG darstellen, was gleichzeitig, wie gefordert, den Precursor des mit den Repeating Units verknüpften GlcDAG darstellte.

In Bezug auf die durch die im 11-1-Operon des TCS11-Clusters kodierten Proteine vermittelte Resistenz gegen Piperacillin kann momentan nur vermutet werden, daß es sich hierbei um einen Mechanismus handelt, welcher entweder dem vorgeschlagenen Mechanismus im Fall der Resistenzhöhung durch die Deletion von *cpoA* sehr ähnlich oder aber mit diesem Mechanismus identisch ist (5.1.2). Diese Vermutung basiert auf den identischen Phänotypen einer *cpoA*-Deletionsmutante und verschiedenen Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters, sowie der die überwiegend gleichen Gene betreffenden Effekte in den Transkriptomen dieser Mutanten. Vorausgesetzt, die Überlegungen zum Mechanismus der Resistenzhöhung gegen Piperacillin im Fall der Deletionsmutante R6 Δ *cpoA* wären zutreffend, so müsste die zur Resistenzhöhung führende Überexpression der Gene des 11-1-Operons auch eine Verschiebung des Verhältnisses der beiden Glycolipide GlcDAG und GalGlcDAG, oder eine veränderte Menge von Lipoteichonsäuren zur Folge haben. Dies wäre der Fall, wenn das Zweikomponentensystem 11 tatsächlich GlcDAG als Stimulus S1 und dessen mit Repeating Units der Lipoteichonsäuren verknüpftes Derivat als Stimulus S2 perzipieren würde. Die isolierte Überexpression der Gene des 11-1-Operons hätte eine Anreicherung von GlcDAG, genauso wie im Fall von R6 Δ *cpoA*, zur Folge. Dies wäre selbstverständlich nur dann möglich, wenn Nbp11/Msp11 einen Exporter darstellen würde. Nbp11/msp11 konnte den Unterfamilien N_7a (für Nbp11) und M_7c (für Msp11) der von Quentin & Fichant (2000) erstellten Klassifizierung zugeordnet werden. Bei diesen Unterfamilien für ATPasen und Permeasen handelt es sich um putative Exporter ohne Substratbindepoteine, wie im Fall von BceAB. Zumindest erscheint eine solche Hypothese aufgrund dieser Zuordnung möglich zu sein.

5.5 Ausblick

CpoA

Die vorgeschlagene physiologische Funktion von CpoA scheint aufgrund der biochemischen Charakterisierung von Edman et al. (2003) und den beschriebenen Effekten einer *cpoA*-Deletion sehr wahrscheinlich. Dies müsste nunmehr durch die Bestimmung der Zusammensetzung der Membranlipide in $R6\Delta cpoA$ überprüft werden. Von besonderem Interesse wäre hierbei das Verhältnis der beiden Hauptglycolipide GlcDAG und GalGlcDAG der Zellmembran von *S. pneumoniae*, welche normalerweise im Verhältnis von 1:100 vorliegen (Brundish et al., 1965a und 1965b). Zudem könnte hierdurch überprüft werden, inwiefern CpoA die einzige Glykosyltransferase darstellt, welche zur Umwandlung von GlcDAG in GalGlcDAG in *S. pneumoniae* befähigt ist. Würde sich die vermutete Funktion von CpoA hierdurch bestätigen lassen, so hätte dies auch erheblichen Einfluß auf die weitere Vorgehensweise in Bezug auf die weitere Charakterisierung der Funktion des TCS11-Clusters. In jedem Fall würden solche Erkenntnisse dazu beitragen, die nahezu unaufgeklärte Synthese von Glycolipiden in *S. pneumoniae* zu verstehen. Zudem könnten hierdurch erstmals Einblicke in die Rolle der beiden Hauptglycolipide von *S. pneumoniae* bei der Ausprägung der Eigenschaften der Cytoplasmamembran erlangt werden. Durch den beobachteten Effekt auf die Resistenz gegen Piperacillin in $R6\Delta cpoA$ und den zwangsläufig vorhandenen Effekt auf die Lipoteichonsäuren erscheint eine Aufklärung dieser Funktionen lohnenswert zu sein.

TCS11-Cluster

Im Fall des TCS11-Clusters konnte durch die genetische- und die phänotypische Charakterisierung erstmals ein Bezug zu einer eventuellen physiologischen Funktion hergestellt werden. Offensichtlich ist das TCS11-Cluster an den gleichen, oder zumindest eng miteinander verbundenen, Membran-assoziierten Vorgängen wie auch CpoA beteiligt. Im Genom vieler Gram-positiver Bakterien ist ein dem TCS11-Cluster homologes und meist in der gleichen genetischen Organisation angeordnetes Cluster kodiert. Da in keinem dieser Organismen bislang Erkenntnisse zu Regulation oder Funktion vorliegen, würde die Charakterisierung des TCS11-Clusters in *S. pneumoniae* eine Erstbeschreibung der physiologischen Funktion darstellen. Die durch die genetische- und phänotypische Charakterisierung erhaltenen Daten sowie deren Interpretation, stellen nunmehr die Basis einer Beschreibung zur Verfügung. Auf molekulargenetischer Ebene stellt die Identifizierung von Genen, welche durch unphosphorylierten Response-Regulator Reg11 reguliert werden, sowie die Identifizierung der entsprechenden DNA-Bindestelle eines der wichtigsten Ziele dar. Eventuell könnte die beschriebene oder vorhergesagte Funktion der regulierten Gene eine genauere Aussage zur Funktion des TCS11-Clusters erlauben. Solche Gene könnten beispielsweise durch die Transkriptomanalyse der hergestellten Deletionsmutante $R6\Delta kin11$ identifiziert werden. Zudem müssten die Effekte der Deletionen der Gene des TCS11-Clusters auf die Promotoren $P_{11.1}$ und $P_{11.2}$ durch eine Komplementation der deletierten Gene überprüft werden.

Auf Proteinebene müsste zunächst verifiziert werden, inwiefern Smp11A und Smp11B miteinander und Smp11B mit Kin11 interagieren können. Zudem wäre eine Charakterisierung des ABC-Transporters Nbp11/Msp11 bezüglich seiner Funktion als Exporter oder Importer unverzichtbar. Ohne jedoch den Stimulus von Kin11 zu kennen, dürfte sich dies als schwer durchführbar erweisen.

Sollte sich für CpoA bestätigen, daß es maßgeblich an der Synthese des Glycolipids GalGlcDAG beteiligt ist, so könnte die Bestimmung der Zusammensetzung der Glycolipide in ausgewählten Deletionsmutanten der Gene des TCS11-Clusters klären, ob das TCS11-Cluster ebenfalls an der Synthese oder der Regulation dieser Komponenten beteiligt ist. Auch könnte

eine Bestimmung der WTA- und LTA-Menge in diesen Deletionsmutanten eventuell zeigen, ob das TCS11-Cluster in der Regulation der Synthese von Teichonsäuren eine Rolle spielt. Promotor P_{11.1} könnte zudem als Indikator für den Phosphorylierungsstatus und damit für die Aktivität von Histidin-Kinase Kin11 in einem Screening verschiedener Substanzen verwendet werden. Getestet werden könnten vor allem solche Substanzen, welche unter dem Verdacht stehen, einen potentiellen Stimulus für Kin11 darzustellen. Zu testen wären insbesondere Phospholipide und Glycolipide, sowie verschiedene Precursor von Teichonsäuren oder Lipoteichonsäuren selbst. In jedem Fall sollten aufgrund der Tatsache, daß das TCS11-Cluster an einem Mechanismus zur Resistenz gegen Piperacillin beteiligt ist und da dieses Cluster in Gram-positiven Bakterien weit verbreitet zu sein scheint, weitere Untersuchungen zur Funktion des TCS11-Clusters durchgeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P. and Trieu-Cuot, P. (2002). Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **43**: 1–14.

Aguilar, P. S., Lopez, P. and de Mendoza, D. (1999). Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the delta5 desaturase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181** (22): 7028-33.

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

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410

Archibald, A. R., Baddiley, J. and Heptinstall, S. (1973). The alanine ester content and magnesium binding capacity of walls of *Staphylococcus aureus* H grown at different pH values. *Biochim. Biophys. Acta.* **291** (3): 629-34.

Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E. G., Margalit, H. and Altuvia, S. (2001). Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr. Biol.* **11** (12): 941-50.

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

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1990). Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates and Wiley - John Wiley and Sons, New York.

Avery, O. T. and Dubos, R. (1931). The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcus in mice. *J. Exp. Med.* **54**: 73-89.

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

Barrick, J. E., Corbino, K. A., Winkler, W. C., Nahvi, A., Mandal, M., Collins, J., Lee, M., Roth, A., Sudarsan, N., Jona, I., Wickiser, J. K. and Breaker, R. R. (2004). New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101** (17): 6421-6.

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

- Bensing, B. A., Meyer, B.J. and 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** (15): 7794-9.
- Beranová, J., Jemioła-Rzemińska, M., Elhottová, D., Strzałka, K. and Konopásek, I. (2008).** Metabolic control of the membrane fluidity in *Bacillus subtilis* during cold adaptation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778** (2): 445-53.
- Berg, S., Edman, M., Li, L., Wikström, M., Wieslander, A. (2001).** Sequence properties of the 1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase from *Acholeplasma laidlawii* membranes. Recognition of a large group of lipid glycosyltransferases in eubacteria and archaea. *J. Biol. Chem.* **276** (25): 22056-63.
- Bernard, R., Guiseppi, A., Chippaux, M., Foglino, M. and Denizot, F. (2007).** Resistance to bacitracin in *Bacillus subtilis*: unexpected requirement of the BceAB ABC transporter in the control of expression of its own structural genes. *J. Bacteriol.* **189** (23): 8636-42.
- Bethe, G., Nau, R., Wellmer, A., Hakenbeck, R., Reinert, R. R., Heinz, H. P. and Zysk, G. (2001).** The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **205** (1): 99-104.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* **7**: 1513-1542
- Booth, M. C., Bogie, C. P., Sahl, H. G., Siezen, R. J., Hatter, K. L. and Gilmore, M. S. (1996).** Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol. Microbiol.* **21** (6): 1175-84.
- Boyd, D. A., Cvitkovitch, D. G., Bleiweis, A. S., Kiriukhin, M. Y., Debabov, D. V., Neuhaus, F. C. and Hamilton, I. R. (2000).** Defects in D-alanyl lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *J. Bacteriol.* **182**: 6055–6065.
- Boyle-Vavra, S., Yin, S. and Daum, R. S. (2006).** The VraS/VraR two-component regulatory system required for oxacillin resistance in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **262** (2): 163-71.
- Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**: 248-254
- Briese, T. and Hakenbeck, R. (1983).** Interaction between choline and the N-acetylmuramyl-L-alanine-amidase of *Streptococcus pneumoniae*. In: The target of penicillin, R. Hakenbeck, J. V. Höltje and H. Labischinski, eds. (Berlin New York, Walter de Gruyter), pp. 173-178.
- Briese, T. and Hakenbeck, R. (1985).** Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur. J. Biochem.* **146**, 417-427.

- Brundish, D. E., Shaw, N. and Baddiley, J. (1965a).** The glycolipids from a rough strain of *Pneumococcus* type I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**: 308-11.
- Brundish, D. E., Shaw, N. and Baddiley, J. (1965b).** The Glycolipids from the Non-Capsulated Strain of *Pneumococcus* I-192R, A.T.C.C. 12213. *Biochem. J.* **97**: 158-165.
- Busch, W. and Saier, M. H. Jr. (2002).** The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37** (5): 287-337.
- Campbell, H. A. and Kent, C. (2001).** The CTP:phosphocholine cytidyltransferase encoded by the *licC* gene of *Streptococcus pneumoniae*: cloning, expression, purification, and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* **1534** (2-3): 85-95.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Santana, O. and Quinto, C. (1996).** The role of the *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. *Gene.* **173** (2): 183-7.
- Chai Y, Chu F, Kolter R, Losick R. (2008).** Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **67** (2): 254-63.
- Claverys, J. P. and Havarstein, L. S. (2002).** Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Biosci.* **7**: 1798-814.
- Claverys, J. P., Prudhomme, M. and Martin, B. (2006).** Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 451-75.
- Coburn, P. S. and Gilmore, M. S. (2003).** The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell. Microbiol.* **5** (10): 661-9.
- Collins, L. V., Kristian, S. A., Weidenmaier, C., Faigle, M., Van Kessel, K. P., Van Strijp, J. A., Götz, F., Neumeister, B. and Peschel, A. (2002).** *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J. Infect. Dis.* **186**: 214–219.
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Hénard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martín, B., Wells, J. and 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):1071-86.
- Damjanovic, M., Kharat, A. S., Eberhardt, A., Tomasz, A. and Vollmer, W. (2007).** The essential *tacF* gene is responsible for the choline-dependent growth phenotype of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **189** (19): 7105-11.
- Denapaite, D., Chi, F., Maurer, P., Nolte, P. and Hakenbeck, R. (2007).** Mechanisms of Penicillin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Targets, Gene Transfer and Mutations. In *Molecular Biology of Streptococci* (ed R. Hakenbeck and S. Chhatwal), Horizon Bioscience, Wymondham, U.K.
- De Gregorio, E., Abrescia, C., Carlomagno, M. S. and Di Nocera, P. P. (2002).** The abundant class of nemis repeats provides RNA substrates for ribonuclease III in *Neisseriae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1576** (1-2): 39-44.

- De Gregorio, E., Abrescia, C., Carlomagno, M. S. and Di Nocera, P. P. (2003).** Ribonuclease III-mediated processing of specific *Neisseria meningitidis* mRNAs. *Biochem. J.* **374** (3): 799-805.
- De Gregorio, E., Silvestro, G., Petrillo, M., Carlomagno, M. S. and Di Nocera, P. P. (2005).** Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence repeats in yersiniae: genomic organization and functional properties. *J. Bacteriol.* **187** (23): 7945-54.
- De Gregorio, E., Silvestro, G., Venditti, R., Carlomagno, M. S. and Di Nocera, P. P. (2006).** Structural organization and functional properties of miniature DNA insertion sequences in *yersiniae*. *J. Bacteriol.* **188** (22): 7876-84.
- de Saizieu, A., Gardès, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T. J., Keck, W., Amrein, K. E. and Lange, R. (2000).** Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J. Bacteriol.* **182** (17): 4696-703.
- Di Guilmi, A. M., Mouz, N., Andrieu, J. P., Hoskins, J., Jaskunas, S. R., Gagnon, J., Dideberg, O. and Vernet T. (1998).** Identification, purification, and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a. *J. Bacteriol.* **180** (21): 5652-9.
- Dowhan, W. (1997).** Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 199-232.
- Draing, C., Pfitzenmaier, M., Zummo, S., Mancuso, G., Geyer, A., Hartung, T. and von Aulock, S. (2006).** Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **281** (45): 33849-59.
- Dudoit, S., Yang, Y. H., Speed, T. P. and Callow, M. J. (2002).** Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica* **12**: 111-139.
- Dutta, R. and Inouye, M. (1996).** Reverse phosphotransfer from OmpR to EnvZ in a kinase-/phosphatase+ mutant of EnvZ (EnvZ.N347D), a bifunctional signal transducer of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**: 1424-1429.
- Edman, M., Berg, S., Storm, P., Wikström, M., Vikström, S., Ohman, A. and Wieslander, A. (2003).** Structural features of glycosyltransferases synthesizing major bilayer and nonbilayer-prone membrane lipids in *Acholeplasma laidlawii* and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **278** (10): 8420-8.
- Espinosa, J., Fuentes, I., Burillo, S., Rodríguez-Mateos, F. and Contreras, A. (2006).** SipA, a novel type of protein from *Synechococcus sp.* PCC 7942, binds to the kinase domain of NblS. *FEMS Microbiol. Lett.* **254** (1): 41-7.
- Fischer, W. (1994).** Lipoteichoic acids and lipoglycans. In: Bacterial Cell Wall, Ghuysen, J. M. and Hakenbeck, R., eds. Elsevier Science B.V., Amsterdam. pp. 199-215.
- Fischer, W. (1997).** Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. *Microb. Drug Resist.* **3**: 309-325.

- Fischer, W. (2000).** Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. In: *Streptococcus pneumoniae* molecular biology and mechanisms of disease, Tomasz, A. (ed). Mary Ann Liebert, Inc., New York, NY. pp. 155-177.
- Franklin, T. J. and Snow, G. A. (1989).** Biochemistry of antimicrobial action, 4th ed., Chapman and Hall, London, Great Britain.
- Fränkel, A. (1886a).** Die Mikrococcen der Pneumonie. *Zeitschrift für klinische Medicin*, Berlin, **10**: 426-449. *Zeitschrift für klinische Medicin*, Berlin, **11**: 437-458.
- Fränkel, A. (1886b).** Bakteriologische Mitteilungen. *Zeitschrift für klinische Medizin*, **10**: 401-461.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. and Greenberg, E. P. (1994).** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176** (2): 269-75.
- García, J. L., Sánchez-Puelles, J. M., García, P., López, R., Ronda, C. and García, E. (1986).** Molecular characterization of an autolysin-defective mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137** (2): 614-9.
- García, J. L., García, E. and López, R. (1987).** Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **149** (1): 52-6.
- García, J. L., Sanchez-Beato, A. R., Medrano, F. J. and Lopez, R. (1998).** Versatility of choline-binding domain. *Microb. Drug. Resist.* **4**: 25-36.
- Ghuysen, J. M. (1991).** Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 37-67.
- Gilmore, M. S., Segarra, R. A., Booth, M. C., Bogie, C. P., Hall, L. R. and Clewell, D. B. (1994).** Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* **176** (23): 7335-44.
- Giudicelli, S. and Tomasz, A. (1984).** Attachment of Pneumococcal Autolysin to Wall Teichoic Acids, an Essential Step in Enzymatic Wall Degradation. *J. Bacteriol.* **158** (3): 1188-1190.
- Goebel, W. F. and Adams, M. H. (1943).** The immunological properties of the heterophile antigen and somatic polysaccharide of *Pneumococcus*. *J. Exp. Med.* **77**: 435-448.
- Gosink, K. K., Mann, E. R., Guglielmo, C., Tuomanen, E. I. and Masure, H. R. (2000).** Role of Novel Choline Binding Proteins in Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68** (10): 5690-5695.
- Gosink, K. and Tuomanen E. (2000).** *Streptococcus pneumoniae*: invasion and inflammation. In: Gram positive pathogens (ed V.A. Fischetti), ASM press, Washington, USA.

- Grebe, T. and Hakenbeck, R. (1996).** Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 829-834.
- Grebe, T., Paik, J. and Hakenbeck, R. (1997).** A Novel Resistance Mechanism against β -Lactams in *Streptococcus pneumoniae* Involves CpoA, a Putative Glycosyltransferase. *J. Bacteriol.* **179** (10): 3342-3349.
- Grebe, T. and Stock, J. B. (1999).** The histidine protein kinase superfamily. *Adv. Microb. Physiol.* **41**: 139-227.
- Griffith, F. (1928).** The significance of pneumococcus types. *J. Hyg.* **27**: 113-159.
- Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F. and Peschel, A. (2001).** Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* **69**: 3423–3426.
- Guenzi, E., Gasc, A. M. and Hakenbeck, R. (1994).** A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **12**: 505-515.
- Guilfoile, P. G. and Hutchinson, C. R. (1991).** A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88** (19): 8553-7.
- Guiral, S., Mitchell, T. J., Martin, B. and Claverys, J. P. (2005).** Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102** (24): 8401-2.
- Hakenbeck, R., Martin, C., Dowson, C. and Grebe T. (1994).** Penicillin-binding protein 2b of *Streptococcus pneumoniae* in piperacillin-resistant laboratory mutants. *J. Bacteriol.* **176** (17): 5574-7.
- Halfmann, A., Hakenbeck, R. and Brückner, R. (2007a).** A new integrative reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **268**: 217-224.
- Halfmann, A., Kovács, M., Hakenbeck, R. and 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): 110-26.
- Halfmann, A. (2008).** Identifizierung des Regulons des Zwei-Komponenten systems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Hammerschmidt, S. (2007).** Pneumococcal Virulence Factors and Adhesion Proteins Targeting the Host. In: *Molecular Biology of Streptococci* (ed R. Hakenbeck and S. Chhatwal), Horizon Bioscience, Wymondham, U.K.
- Håvarstein, L. S., Coomaraswamy, G. and Morrison, D. A. (1995).** An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** (24): 11140-4.

Håvarstein, L. S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C. and Claverys, J. P. (2006). New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol. Microbiol.* **59** (4): 1297-307.

Hiraoka, S., Matsuzaki, H. and Shibuya, I. (1993). Active increase in cardiolipin synthesis in the stationary growth phase and its physiological significance in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **336** (2): 221-4.

Höltje, J. V. and Tomasz, A. (1975). Biological effects of lipoteichoic acids. *J. Bacteriol.* **124** (2): 1023-7.

Hoskins, J., Alborn, W. E. Jr., Arnold, J., Blaszcak, 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): 5709-17.

Hotchkiss, R. D. (1952). Induction of penicillin resistance by transformation. *Bull N. Y. Acad. Med.*, **28** (5): 346-8

Hughes, A. H., Hancock, I. C. and Baddiley, J. (1973). The function of teichoic acids in cation control in bacterial membranes. *Biochem. J.* **132**: 83-93.

Jacob, F. and Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**: 318-56.

Job, V., Di Guilmi, A. M., Martin, L., Vernet, T., Dideberg, O. and Dessen, A. (2003). Structural studies of the transpeptidase domain of PBP1a from *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **59** (6): 1067-9.

Joseph, P., Guiseppi, A., Sorokin, A. and Denizot, F. (2004). Characterization of the *Bacillus subtilis* YxdJ response regulator as the inducer of expression for the cognate ABC transporter YxdLM. *Microbiology* **150** (8): 2609-17.

Jung, K. and Altendorf, K. (1998). Truncation of amino acids 12-128 causes deregulation of the phosphatase activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273** (28): 17406-10.

Kamberov, E. S., Atkinson, M. R., Chandran, P. and Ninfa, A. J. (1994). Effect of mutations in *Escherichia coli glnL (ntrB)*, encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. *J. Biol. Chem.* **269** (45): 28294-9.

Kaufman, B., Kundig, D., Distler, J. and Roseman, S. (1965). Enzymatic synthesis and structure of two glycolipids from type XIV *Pneumococcus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**: 312-8.

- Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E. and Håvarstein, L. S. (2005).** Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J. Bacteriol.* **187** (13): 4338-45.
- Kiriukhin, M. Y., Debabov, D. V., Shinabarger, D.L. and Neuhaus, F. C. (2001).** Biosynthesis of the glycolipid anchor in lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* RN4220: role of YpfP, the diglucosyldiacylglycerol synthase. *J. Bacteriol.* **183** (11): 3506-14.
- Kislak, J. W., Razavi, L. M. B., Daly, A. K. and Finland M. (1965).** Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am. J. Med. Sci.* **250**: 261-68.
- Klugman, K.P. (1990).** Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 171-96.
- Kobayashi, K., Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Ogasawara, N., Tanaka, T. and Fujita, Y. (2001).** Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *J. Bacteriol.* **183** (24): 7365-70.
- König, A., Reinert, R.R. and Hakenbeck, R. (1998).** *Streptococcus mitis* with unusually high level resistance to beta-lactam antibiotics. *Microb. Drug Resist.* **4** (1): 45-9.
- Koprivnjak, T., Mlakar, V., Swanson, L., Fournier, B., Peschel, A. and Weiss, J. P. (2006).** Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188** (10): 3622-30.
- Kovács, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R. and 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): 5797-805.
- Lacks, S. and Hotchkiss, R. D. (1960).** A study of the genetic material determining an enzyme in Pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta.* **39**: 508-18.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Laible, G. and Hakenbeck, R. (1987).** Penicillin-binding proteins in β -lactam-resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **1** (3): 355-363.
- Lambert, P. A., Hancock, I. C. and Baddiley, J. (1975).** Influence of Alanine Ester Residues on the Binding of Magnesium Ions to Teichoic Acids. *Biochem. J.* **151**: 671-676
- Lange, R., Wagner, C., de Saizieu, A., Flint, N., Molnos, J., Stieger, M., Caspers, P., Kamber, M., Keck, W. and Amrein, K. E. (1999).** Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **237** (1): 223-34.
- 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. and Goulian, M. (2007). Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annu. Rev. Genet.* **41**: 121-45

LeBlanc, D. J., Lee, L. N. and Inamine, J.M. (1991). Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35** (9): 1804-10.

Lefevre, J. C., Claverys, J. P. and Sicard, A. M. (1979). Donor deoxyribonucleic acid length and marker effect in pneumococcal transformation. *J. Bacteriol.* **138** (1): 80-6.

Limpert, E., Stahel, W. A. and Abbt, M. (2001). Log-normal Distributions across the Sciences: Keys and Clues. *Bioscience* **51** (5): 341-352.

Lindblom, G., Brentel, I., Sjölund, M., Wikander, G. and Wieslander, A. (1983). Phase equilibria of membrane lipids from *Acholeplasma laidlawii*: importance of a single lipid forming nonlamellar phases. *Biochemistry.* **25** (23): 7502-10.

Lindblom, G. and Rilfors, L. (1992). Nonlamellar phases formed by membrane lipids. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **41**: 101-25.

Lindblom, G., Hauksson, J. B., Rilfors, L., Bergenståhl, B., Wieslander, A. and Eriksson P. O. (1993). Membrane lipid regulation in *Acholeplasma laidlawii* grown with saturated fatty acids. Biosynthesis of a triacylglycerolipid forming reversed micelles. *J. Biol. Chem.* **268** (22): 16198-207.

Locher, K. P. (2004). Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14** (4): 426-31.

Lopez, R. and García, E. (2004). Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 553-580.

Maes, M. and Messens, E. (1992). Phenol as grinding material in RNA preparations. *Nucleic Acids Res.* **20** (16): 4374.

Marciszewski, M. (2007). Der Response-Regulator Reg11 des regulatorischen Zwei-Komponenten-Systems 11 von *Streptococcus pneumoniae*: Bindung an ausgewählte Promotoren und die Transkriptionskontrolle. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.

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

Martin, B., Alloing, G., Méjean, V. and Claverys, J.P. (1987). Constitutive expression of erythromycin resistance mediated by the *ermAM* determinant of plasmid pAM beta 1 results from deletion of 5' leader peptide sequences. *Plasmid.* **18** (3): 250-3.

- Martínez, B., Fernández, M., Suárez, J. E. and Rodríguez, A. (1999).** Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology*. **145** (11): 3155-61.
- Mascher, T., Zähler, D., Merai, M., Balmelle, N., de Saizieu, A.B. and Hakenbeck, R. (2003).** The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J. Bacteriol.* **185** (1): 60-70.
- Mascher, T., Heintz, M., Zähler, D., Merai, M. and 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 β -Lactam Resistance. *J. Bacteriol.* **188** (5): 1959-1968.
- Mascher, T. (2006b).** Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **264** (2): 133-44.
- Mascher, T., Helman, J. D. and Udden, G. (2006c).** Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine-Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70** (4): 910-38.
- Mazzone, M., De Gregorio, E., Lavitola, A., Pagliarulo, C., Alifano, P. and Di Nocera, P. P. (2001).** Whole-genome organization and functional properties of miniature DNA insertion sequences conserved in pathogenic *Neisseriae*. *Gene* **278** (1-2): 211-22.
- McKessar, S. J. and Hakenbeck, R. (2007).** The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* **189** (4): 1342-50.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. pp 352-355,
- Mitchell, T. J., Alexander, J. E., Morgan, P. J. and Andrew, P. W. (1997).** Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **26**: 62S-71S.
- Morath, S., Geyer, A. and Hartung, T. (2001).** Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J. Exp. Med.* **193**: 393-397.
- Moreillon, P., Markiewicz, Z., Nachman, S. and Tomasz A. (1990).** Two Bactericidal Targets for Penicillin in Pneumococci: Autolysis-Dependent and Autolysis-Independent Killing Mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 33-39.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O. and Vernet, T. (2003).** Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* **50** (3): 845-55.
- Mullis, K. B. and Faloona, F.A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-50.
- Musher, D. M., Breiman, R. F. and Tomasz A. (2000).** *Streptococcus pneumoniae*: at the threshold of the 21 century. In *Streptococcus pneumoniae*, Mary Ann Liebert, Larchmont, USA.

- Neufeld, F., and Schnitzer, R., in Kolle, W. and von Wassermann, A. (1928).** Handbuch der pathogenen Microorganismen, Jena, Gustav Fischer, 3rd edition, (Kolle, W., Kraus, R., and Uhlenhuth, P.), 1928, 4, Liefg. **17**: 926.
- Neuhaus, F. C., Baddiley, J. (2003).** A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67** (4): 686-723.
- Newton, C. R. and Graham, A. (1994).** PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2. Aufl., Heidelberg.
- Nishino, K., Yamada, J., Hirakawa, H., Hirata, T. and Yamaguchi, A. (2003).** Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to beta-lactams. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **47** (9): 3030-3.
- Nouaille, S., Commissaire, J., Gratadoux, J. J., Ravn, P., Bolotin, A., Gruss, A., Le Loir, Y. and Langella, P. (2004).** Influence of lipoteichoic acid D-alanylation on protein secretion in *Lactococcus lactis* as revealed by random mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1600–1607.
- Novak, R., Cauwels, A., Charpentier, E. and Tuomanen, E. (1999).** Identification of a *Streptococcus pneumoniae* Gene Locus Encoding Proteins of an ABC Phosphate Transporter and a Two-Component Regulatory System. *J. Bacteriol.* **181** (4): 1126-1133.
- Oggioni, M. R. and Claverys, J. P. (1999).** Repeated extragenic sequences in prokaryotic genomes: a proposal for the origin and dynamics of the RUP element in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **145** (10): 2647-53.
- Ohki, R., Giyanto, Tateno, K., Masuyama, W., Moriya, S., Kobayashi, K. and Ogasawara, N. (2003).** The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **49** (4): 1135-44.
- Ottolenghi, E., Hotchkiss, R. D. (1962).** Release of genetic transformation agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J. Exp. Med.* **116** (4): 491-519.
- Pao, G. M. and Saier, M. H. Jr. (1995).** Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. *J. Mol. Evol.* **40** (2): 136-54.
- Parkinson, J. S. (1993).** Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**: 857-871.
- Pasteur, L., Chamberland, C., Roux, E., Thuillier, L. (1881).** Sur la rage. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, Paris, **92**: 1259-1260.
- Patel, S. and Latterich, M. (1998).** The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* **8** (2): 65-71.
- Paterson, G. K., Blue, C. E. and Mitchell, T. J. (2006).** Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Med. Microb.* **55**: 355–363

- Perego, M., Hanstein, C., Welsh, K. M., Djavakhishvili, T., Glaser, P. and Hoch, J. A. (1994).** Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell* **79** (6): 1047-55.
- Perego, M. and Hoch, J. A. (1996).** Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1549-1553.
- Perego, M. (1998).** Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. *Trends. Microbiol.* **6** (9): 366-70.
- 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. and Morrison, D. A. (2004).** Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol. Microbiol.* **51** (4): 1051-70.
- Poyart, C., Lamy, M. C., Boumaila, C., Fiedler, F. and Trieu-Cuot, P. (2001).** Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **183** (21): 6324-34.
- Preiss, T. and Hentze, M. W. (1999).** From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9** (5): 515-21.
- Quentin, Y. and Fichant, G. (2000).** ABCdb: an ABC transporter database. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2** (4): 501-4.
- Rigali, S., Derouaux, A., Giannotta, F. and Dusart, J. (2002).** Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J. Biol. Chem.* **277** (15): 12507-15.
- Sachs, A. B. and Varani, G. (2000).** Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat. Struct. Biol.* **7** (5): 356-61.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K.B. and Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239** (4839): 487-91.
- Salles, C., Creancier, L., Claverys, J. P. and Mejean, V. (1992).** The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **20**: 6103
- Sambrock, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning, a laboratory manual (2nd ed.), CSH Press, New York.
- Sánchez, C., Hernández de Rojas, A., Martínez, B., Argüelles, M. E., Suárez, J. E., Rodríguez, A. and Mayo, B. (2000).** Nucleotide sequence and analysis of pBL1, a bacteriocin-producing plasmid from *Lactococcus lactis* IPLA 972. *Plasmid.* **44** (3): 239-49. [Click here to read](#)

- Sanchez-Beato, A. R., Lopez, R. and Garcia, J. L. (1998).** Molecular characterization of PcpA: a novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol.* **164**: 207–214.
- Sebert, M. E., Palmer, L. M., Rosenberg, M. and 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** (8): 4059-67.
- Seo, H. S., Cartee, R. T., Pritchard, D. G. and Nahm, M. H. (2008).** A new model of pneumococcal lipoteichoic acid structure resolves biochemical, biosynthetic, and serologic inconsistencies of the current model. *J. Bacteriol.* **190** (7): 2379-87.
- Sicard, A. M. (1964).** A New Synthetic Medium for *Diplococcus pneumoniae*, and its Use for the Study of Reciprocal Transformations at the AmiA Locus. *Genetics* **50**: 31-44.
- Smith, G. E. and Summers, M. D. (1980).** The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzoyloxymethyl-paper. *Anal. Biochem.* **109** (1): 123-9.
- Song, J. H., Ko, K. S., Lee, J. Y., Baek, J. Y., Oh, W. S., Yoon, H. S., Jeong, J. Y. and Chun, J. (2005).** Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Mol. Cells.* **19** (3): 365-74.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98** (3): 503-17.
- Spizizen, J. (1958).** Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus subtilis* by Deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44** (10): 1072-8.
- Steinmoen, H., Teigen, A. and Håvarstein, L. S. (2003).** Competence-induced cells of *Streptococcus pneumoniae* lyse competence-deficient cells of the same strain during cocultivation. *J. Bacteriol.* **185**: 7176-7183.
- Sternberg, G. M. (1882).** A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. Johns Hopkins University. *Studies from the biological laboratory*, **2** (2): 183-200.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J. and Stock, A. M. (1989).** Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 450-490.
- Stock, J. B., Surette, M. G. and Park, P. (1995).** Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanisms of catalysis, p. 25-52. In Hoch, J. A. and Silhavy, T. J. (ed.), Two-component signal transduction. ASM Press, Washington, D. C.
- Strominger, J. L., Izaki, K., Matsubashi, M. and Tipper, D. J. (1967).** Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reactions. *Fed. Proc.* **26**: 9-22.
- Stüber, D., Matile, H., and Garotta, G. (1990).** System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope

mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *Immunological Methods*, Lefkovitz, I. and Pernis, B., eds., vol. IV, Academic Press, New York: 121-152

Sung, C.K., Li, H., Claverys, J. P. and Morrison, D. A. (2001). An *rpsL* cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (11): 5190-6.

Szurmant, H., Mohan, M. A., Imus, P. M. and Hoch, J. A. (2007a). YycH and YycI interact to regulate the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189** (8): 3280-9.

Szurmant, H., White, R. A. and Hoch, J. A. (2007b). Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17** (6): 706-15.

Tauch, A., Kriefft, S., Pühler, A. and Kalinowski, J. (1999). The *tetAB* genes of the *Corynebacterium striatum* R-plasmid pTP10 encode an ABC transporter and confer tetracycline, oxytetracycline and oxacillin resistance in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters* **173** (1): 203-209

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. and Fraser, C. M. (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science.* **293** (5529): 498-506.

Thomas, P.S. (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**: 5201-5205.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* **25**: 4876-4882

Throup, J. P., Koretke, K. K., Bryant, A. P., Ingraham, K. A., Chalker, A. F., Ge, Y., Marra, A., Wallis, N. G., Brown, J. R., Holmes, D. J., Rosenberg, M., Burnham, M. K. R. (2000). A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **35**: 566-576.

Tillet, W. S., Goebel, W. F. and Avery, O. T. (1930). Chemical and immunological properties of a species-specific carbohydrate of pneumococci. *J. Exp. Med.* **52**: 895-900.

Tomasz, A. (1968). Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of *Pneumococcus*: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **59** (1): 86-93.

Tomasz, A., Albino, A. and Zanati, E. (1970). Multiple Antibiotic Resistance in a Bacterium with Suppressed Autolytic System. *Nature* **227**: 138-140.

Tomasz, A. and Westphal, M. (1971). Abnormal Autolytic Enzyme in a Pneumococcus with Altered Teichoic Acid Composition. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Vol. **68** (11): 2627-2630.

Tomasz, A., McDonnell, M., Westphal, M. and Zanati, E. (1975). Coordinated incorporation of nascent peptidoglycan and teichoic acid into pneumococcal cell walls and conservation of peptidoglycan during growth. *J. Biol. Chem.* **250** (1): 337-41.

Tsukahara, K. and Ogura, M. (2008). Promoter selectivity of the *Bacillus subtilis* response regulator DegU, a positive regulator of the *fla/che* operon and *sacB*. *BMC Microbiol.* **8**: 8.

Vollmer, W. (2007). Structure and Biosynthesis of the Pneumococcal Cell Wall. In *Molecular Biology of Streptococci* (ed R. Hakenbeck and S. Chhatwal), Horizon Bioscience, Wymondham, U.K.

Volz, K. and Matsumura, P. (1991). Crystal structure of *Escherichia coli* CheY refined at 1.7 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **266**: 15511-15519.

Watson, D. A. and Musher, D. M. (1990). Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect. Immun.* **58**: 3135-3138.

Wecke, J., Madela, K. and Fischer, W. (1997). The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143**: 2953–2960.

Weichselbaum, A. (1886). Über die Ätiologie der acuten Lungen- und Rippenfellentzündungen. *Wiener Medizinische Jahrbücher*, (Alte Folge); **82**: 483-554.

Weidenmaier, C., J. Kokai-Kun, F., Kristian, S. A., Chanturiya, T., Kalbacher, H., Gross, M., Nicholson, G., Neumeister, B., Mond, J. J. and Peschel, A. (2004). Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat. Med.* **10**: 243–245.

Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P. and Speed, T. P. (2001). Normalization for cDNA microarray data. In *In Microarrays: optical technologies and informatics*. Volume 4266, Edited by: Bittner, M., Chen, Y., Dorsel, A., Dougherty, E. R. San Jose, CA, USA: SPIE: 2001: 141-152.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33** (1):103-19.

Yoshida, K. I., Fujita, Y. and Ehrlich, S. D. (2000). An Operon for a Putative ATP-Binding Cassette Transport System Involved in Acetoin Utilization of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182** (19): 5454-61.

Yother, J. and White, J. M. (1994). Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J. Bacteriol.* **176** (10): 2976–2985.

Yother, J., Leopold, K., White, J. and Fischer, W. (1998). Generation and Properties of a *Streptococcus pneumoniae* Mutant Which Does Not Require Choline or Analogs for Growth. *J. Bacteriol.* **180** (8): 2093–2101.

Zähler, D. (1999). Identifizierung von Zielgenen des signaltransduzierenden Zweikomponentensystems *cia* von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.

Zähler, D., Kaminski, K., van der Linden, M., Mascher, T., Merai, M. and Hakenbeck, R. (2002). The *ciaR/ciaH* regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 211-216.

Zhang, J. R., Idanpaan-Heikkila, I., Fischer, W. and Tuomanen, E. I. (1999). Pneumococcal *licD2* gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol. Microbiol.* **31** (5): 1477-88.

7. Anhang

7.1 Das Transkriptom von Mutante P106 bei einer Zelldichte von N=40

Tabelle 7.1: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in Mutante P106

| Gennummer R6 ¹⁾ | Gennummer TIGR4 ²⁾ | Gen ³⁾ | Funktion/Domänen | P-Wert | Transkriptverhältnis [Mutante/R6] ⁴⁾ |
|---|-------------------------------|--------------------------------|---|----------|---|
| <i>spr0013</i> ⁵⁾ <i>/spr1819</i> | SP2006 | <i>comX1</i> / <i>comX2</i> | alternative sigma factor <i>comX</i> | 3,34E-05 | 0,30 |
| <i>spr0020</i> ⁵⁾ | SP0018 | - | Hypothetical protein | 2,52E-06 | 0,10 |
| <i>spr0030</i> ⁵⁾ | SP0029 | - | Hypothetical protein | 5,52E-05 | 0,23 |
| <i>spr0031</i> ⁵⁾ | SP0031 | - | Hypothetical protein | 1,05E-06 | 0,20 |
| <i>spr0040</i> | SP0041 | <i>blpU</i> | Amphipathic pore-forming peptide precursor | 1,51E-06 | 0,16 |
| <i>spr0043</i> ⁵⁾ | SP0042 | <i>comA</i> | Transport ATP-binding protein ComA | 1,53E-03 | 0,46 |
| <i>spr0049</i> | SP0048 | <i>purN</i> | 5'-phosphoribosylglycinamide transformylase 1 | 8,53E-04 | 0,46 |
| <i>spr0096</i> | SP0107 | - | Hypothetical protein, LysM-domain | 5,46E-03 | 2,96 |
| <i>spr0099</i> | SP0110 | - | ABC transporter membrane-spanning permease - aa transport | 7,65E-07 | 0,06 |
| <i>spr0100</i> | SP0111 | - | ABC transporter ATP-binding protein - aa transport | 5,96E-03 | 0,48 |
| <i>spr0104</i> | SP0108 | - | Hypothetical protein, HTH-XRE-domain | 4,19E-08 | 0,49 |
| <i>spr0127</i> ⁵⁾ | SP0124 | <i>cibB</i> | competence induced bacteriocin B | 6,01E-05 | 0,22 |
| <i>spr0128</i> ⁵⁾ | SP0125 | <i>cibA</i> | competence induced bacteriocin A | 3,51E-07 | 0,11 |
| <i>spr0162</i> | SP0176 | <i>ribA</i> | Riboflavin biosynthesis; GTP-cyclohydrolase II. | 4,15E-05 | 0,40 |
| <i>spr0181</i> | - | - | orf47 protein | 2,25E-07 | 0,38 |
| <i>spr0251</i> | SP0274 | <i>polC</i> | DNA polymerase III, alpha subunit | 4,09E-04 | 0,35 |
| <i>spr0276</i> | SP0303 | <i>bglA</i> | 6-phospho-beta-glucosidase | 3,34E-05 | 0,37 |
| <i>spr0277</i> | SP0304 | - | Conserved hypothetical protein, truncation, MtN3_slv domain | 2,14E-05 | 0,34 |
| <i>spr0278</i> | SP0305 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIB component | 7,99E-07 | 0,39 |
| <i>spr0279</i> | SP0306 | <i>bglG</i> | Transcription antiterminator BglG family | 3,09E-08 | 0,43 |
| <i>spr0280</i> | SP0308 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIA component | 6,14E-04 | 0,38 |
| <i>spr0388</i> | SP0429 | - | Hypothetical protein | 4,89E-06 | 0,34 |
| <i>spr0389</i> | SP0430 | - | Hypothetical protein | 1,70E-05 | 0,38 |
| <i>spr0466</i> ⁵⁾ | SP0529 | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 1,27E-03 | 0,49 |
| <i>spr0467</i> ⁵⁾ | SP0529 | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 5,38E-05 | 0,24 |
| <i>spr0468</i> ⁵⁾ | - | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 6,63E-04 | 0,27 |
| <i>spr0469</i> ⁵⁾ | - | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 1,27E-05 | 0,12 |
| <i>spr0470</i> | SP0541 | <i>blpO</i> | Hypothetical protein | 5,21E-08 | 0,21 |
| <i>spr0471</i> | - | - | Hypothetical protein | 2,87E-07 | 0,10 |
| <i>spr0856</i> ⁵⁾ | SP0954 | <i>celA</i> | Competence protein | 1,03E-04 | 0,18 |
| <i>spr0857</i> ⁵⁾ | SP0955 | <i>celB</i> | Competence protein | 9,55E-06 | 0,22 |
| <i>spr0858</i> ⁵⁾ | SP0956 | - | Hypothetical protein | 2,68E-07 | 0,21 |
| <i>spr0859</i> ⁵⁾ | SP0957 | - | Hypothetical protein, ATP binding domain, low similarity to <i>tacH</i> of <i>B. subtilis</i> | 1,44E-07 | 0,17 |

| | | | | | |
|---------------------------------|--------|------------------------|---|----------|------|
| <i>spr0860</i> ⁵⁾ | SP0958 | - | Hypothetical protein, putative permease | 3,29E-05 | 0,37 |
| <i>spr0881</i> ⁵⁾ | SP0978 | <i>coiA</i> | Competence protein | 2,01E-04 | 0,23 |
| <i>spr0921</i> | SP1017 | <i>xyiH</i> | 4-oxalocrotonate tautomerase | 2,51E-04 | 0,31 |
| <i>spr0996</i> ⁵⁾ | SP1088 | <i>radC</i> | DNA repair protein | 4,01E-05 | 0,30 |
| <i>spr1096</i> | - | <i>metY-truncation</i> | O-acetylhomoserine sulphydrylase, truncation | 1,81E-04 | 0,42 |
| <i>spr1144</i> ⁵⁾ | SP1266 | <i>smf</i> | DNA processing Smf protein | 1,40E-10 | 0,10 |
| <i>spr1452</i> | - | - | Hypothetical protein, similar nt sequence to rup | 1,40E-03 | 0,41 |
| <i>spr1546</i> | SP1704 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate, CylA homologue | 9,03E-04 | 0,43 |
| <i>spr1547</i> | SP1705 | - | Hypothetical protein | 1,06E-05 | 0,36 |
| <i>spr1548</i> | SP1706 | - | Hypothetical protein, putative permease | 1,19E-05 | 0,43 |
| <i>spr1558</i> ^{5) 6)} | SP1714 | <i>ytrA</i> | transcription regulator <i>gntR</i> -like | 1,00E-05 | 7,47 |
| <i>spr1559</i> ^{5) 6)} | SP1715 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 2,23E-06 | 5,13 |
| <i>spr1560</i> ^{5) 6)} | SP1715 | - | Hypothetical protein, putative permease | 7,17E-07 | 4,33 |
| <i>spr1562</i> ⁵⁾ | SP1717 | <i>natA</i> | ABC transporter ATP-binding protein - Na ⁺ export | 3,37E-05 | 0,43 |
| <i>spr1574</i> | SP1927 | - | Degenerate transposase (orf1) | 8,96E-05 | 0,50 |
| <i>spr1628</i> ⁵⁾ | SP1808 | <i>pilD</i> | Type 4 prepilin peptidase | 4,04E-05 | 0,30 |
| <i>spr1724</i> ⁵⁾ | SP1540 | <i>ssbB</i> | Single-stranded DNA-binding protein | 7,66E-07 | 0,18 |
| <i>spr1755</i> | - | - | Hypothetical protein | 7,17E-08 | 0,39 |
| <i>spr1756</i> ⁵⁾ | SP1939 | <i>dinF</i> | DNA-damage-inducible protein | 3,56E-07 | 0,28 |
| <i>spr1757</i> ⁵⁾ | SP1940 | <i>recA</i> | DNA recombination/repair | 1,89E-05 | 0,31 |
| <i>spr1758</i> ⁵⁾ | SP1941 | <i>cinA</i> | Competence induced protein | 2,40E-07 | 0,16 |
| <i>spr1762</i> ⁵⁾ | SP1945 | <i>comM</i> | Hypothetical protein | 1,42E-04 | 0,46 |
| <i>spr1786</i> | SP1971 | - | Hypothetical protein | 1,22E-04 | 0,20 |
| <i>spr1829</i> ⁵⁾ | SP2016 | <i>nadC</i> | Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase | 3,19E-05 | 0,38 |
| <i>spr1831</i> | - | - | putative ATP binding domain, truncation | 1,34E-08 | 0,28 |
| <i>spr1856</i> | - | - | Hypothetical protein, putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 7,10E-08 | 0,12 |
| <i>spr1857</i> | - | - | Hypothetical protein, putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 2,90E-07 | 0,16 |
| <i>spr1858</i> ⁵⁾ | SP2047 | - | Hypothetical protein | 1,66E-06 | 0,08 |
| <i>spr1859</i> ⁵⁾ | SP2048 | - | Conserved hypothetical protein, N-terminal methylation motif | 7,52E-08 | 0,07 |
| <i>spr1861</i> ⁵⁾ | SP2050 | <i>cglD</i> | Competence protein | 1,50E-06 | 0,08 |
| <i>spr1862</i> ⁵⁾ | SP2051 | <i>cglC</i> | Competence protein | 1,96E-07 | 0,09 |
| <i>spr1863</i> ⁵⁾ | SP2052 | <i>cglB</i> | Competence protein | 5,06E-08 | 0,06 |
| <i>spr1864</i> ⁵⁾ | SP2053 | <i>cglA</i> | Competence protein | 7,14E-08 | 0,09 |
| <i>spr1913</i> | SP2103 | <i>rrmA</i> | 23S rRNA m1G745 methyltransferase | 1,17E-05 | 0,46 |
| <i>spr2006</i> ⁵⁾ | SP2201 | <i>cbpD</i> | Choline binding protein D | 1,66E-04 | 0,26 |
| <i>spr2012</i> ⁵⁾ | SP2207 | <i>comFC</i> | Involved in transformation (competence for DNA uptake) | 3,83E-07 | 0,12 |
| <i>spr2013</i> ⁵⁾ | SP2208 | <i>comFA</i> | Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases | 4,90E-06 | 0,17 |

| | | | | | |
|------------------------------|--------|-------------|--|----------|------|
| <i>spr2042</i> ⁵⁾ | SP2236 | <i>comD</i> | Histidine protein kinase | 8,01E-11 | 0,05 |
| <i>spr2043</i> ⁵⁾ | SP2237 | <i>comC</i> | Competence stimulating peptide precursor (CSP) | 6,59E-07 | 0,08 |

¹⁾ Annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); ³⁾ Bezeichnung charakterisierter Gene; ⁴⁾ Transkriptmengenverhältnis von P106 zu R6; ⁵⁾ Gene des Kompetenzregulons; ⁶⁾ Gene des *ytrA*-Clusters

7.2 Das Transkriptom von Mutante P206 bei einer Zelldichte von N=40

Tabelle 7.2: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in Mutante P206

| Gennummer R6 ¹⁾ | Gennummer TIGR4 ²⁾ | Gen ³⁾ | Funktion/Domänen | P-Wert | Transkriptverhältnis [Mutante/R6] ⁴⁾ |
|--|-------------------------------|--------------------------------|--|----------|---|
| <i>spr0013</i> ⁵⁾ / <i>spr1819</i> | SP2006 | <i>comX1</i> / <i>comX2</i> | alternative sigma factor <i>comX</i> | 2,92E-05 | 0,33 |
| <i>spr0020</i> ⁵⁾ | SP0018 | - | Hypothetical protein | 3,77E-07 | 0,14 |
| <i>spr0030</i> ⁵⁾ | SP0029 | - | Hypothetical protein | 2,49E-07 | 0,22 |
| <i>spr0031</i> ⁵⁾ | SP0031 | - | Hypothetical protein | 5,49E-10 | 0,21 |
| <i>spr0043</i> ⁵⁾ | SP0042 | <i>comA</i> | Transport ATP-binding protein ComA | 1,23E-04 | 0,25 |
| <i>spr0068</i> | SP0075 | - | Conserved hypothetical protein, truncation; PNP phosphorylase family | 1,30E-05 | 2,06 |
| <i>spr0072</i> | SP1764 | - | Conserved hypothetical protein, putative glycosyltransferase | 3,47E-06 | 0,46 |
| <i>spr0074</i> | - | - | Hypothetical protein, truncation, putative glycosyltransferase | 2,01E-04 | 0,44 |
| <i>spr0099</i> | SP0110 | - | ABC transporter membrane-spanning permease - aa transport | 2,93E-06 | 0,06 |
| <i>spr0101</i> | SP0112 | - | ABC transporter solute-binding protein - aa transport | 4,91E-05 | 0,26 |
| <i>spr0102</i> | - | <i>argG</i> | Argininosuccinate synthase | 2,23E-05 | 0,30 |
| <i>spr0104</i> | SP0108 | - | Hypothetical protein, HTH-XRE-domain | 3,40E-05 | 0,49 |
| <i>spr0105</i> | - | - | bacteriocin transporter, peptidase c39 family, truncation | 5,48E-05 | 0,46 |
| <i>spr0110</i> | SP0108 | - | Hypothetical protein | 2,98E-04 | 0,43 |
| <i>spr0128</i> ⁵⁾ | SP0125 | <i>cibA</i> | competence induced bacteriocin A | 8,25E-05 | 0,39 |
| <i>spr0157</i> | SP0159 | - | Conserved hypothetical protein, membrane protein | 4,71E-07 | 0,49 |
| <i>spr0262</i> | SP0285 | <i>adhP</i> | Alcohol dehydrogenase, propanol-preferring. | 4,82E-04 | 0,31 |
| <i>spr0264</i> | SP0287 | - | Conserved hypothetical protein, xanthine uracil permease family | 1,01E-06 | 2,00 |
| <i>spr0276</i> | SP0303 | <i>bglA</i> | 6-phospho-beta-glucosidase | 1,21E-04 | 0,46 |
| <i>spr0277</i> | SP0304 | - | Conserved hypothetical protein, truncation, MtN3_slv domain | 1,57E-05 | 0,50 |
| <i>spr0278</i> | SP0305 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIB component | 2,04E-05 | 0,27 |
| <i>spr0279</i> | SP0306 | <i>bglG</i> | Transcription antiterminator BglG family | 8,57E-05 | 0,35 |
| <i>spr0280</i> | SP0308 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIA component | 8,08E-04 | 0,50 |
| <i>spr0310</i> | SP0342 | <i>dexB</i> | Alpha, 1-6-glucosidase | 7,39E-04 | 0,44 |
| <i>spr0311</i> | - | - | Hypothetical protein | 2,76E-05 | 0,47 |
| <i>spr0388</i> | SP0429 | - | Hypothetical protein | 4,30E-08 | 0,27 |
| <i>spr0389</i> | SP0430 | - | Hypothetical protein | 2,31E-05 | 0,18 |

| | | | | | |
|------------------------------|--------|-------------|---|----------|------|
| <i>spr0441</i> | SP0499 | <i>pgk</i> | Phosphoglycerate kinase | 1,21E-06 | 0,44 |
| <i>spr0445</i> | SP0508 | - | putative type I restriction enzyme, truncation | 1,60E-05 | 2,62 |
| <i>spr0448</i> | SP0507 | - | putative type I restriction enzyme, truncation | 1,33E-03 | 0,37 |
| <i>spr0468</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 2,00E-03 | 0,45 |
| <i>spr0469</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 5,09E-04 | 0,25 |
| <i>spr0471</i> | - | - | Hypothetical protein | 9,74E-05 | 0,32 |
| <i>spr0472</i> ⁵⁾ | SP0545 | <i>blpY</i> | BlpY immunity protein | 2,27E-04 | 0,32 |
| <i>spr0473</i> ⁵⁾ | SP0546 | <i>blpZ</i> | BlpZ protein | 4,01E-04 | 0,46 |
| <i>spr0474</i> ⁵⁾ | SP0547 | <i>pncP</i> | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 3,24E-04 | 0,30 |
| <i>spr0601</i> | SP0686 | - | Conserved hypothetical protein, low similarity to lactococcin 972 immunity protein | 4,41E-04 | 0,46 |
| <i>spr0617</i> | SP0705 | - | Hypothetical protein, putative lipoprotein | 2,82E-04 | 0,46 |
| <i>spr0618</i> | SP0706 | - | Hypothetical protein | 4,86E-05 | 0,47 |
| <i>spr0786</i> | SP0883 | - | Hypothetical protein | 6,20E-07 | 0,44 |
| <i>spr0856</i> ⁵⁾ | SP0954 | <i>celA</i> | Competence protein | 2,48E-04 | 0,31 |
| <i>spr0857</i> ⁵⁾ | SP0955 | <i>celB</i> | Competence protein | 4,91E-05 | 0,45 |
| <i>spr0858</i> ⁵⁾ | SP0956 | - | Hypothetical protein | 4,47E-06 | 0,22 |
| <i>spr0859</i> ⁵⁾ | SP0957 | - | Hypothetical protein, ATP binding domain, similar to <i>tacH B. subtilis</i> | 5,83E-05 | 0,30 |
| <i>spr0881</i> ⁵⁾ | SP0978 | <i>coiA</i> | Competence protein | 1,23E-04 | 0,36 |
| <i>spr0889</i> | SP0986 | - | Conserved hypothetical protein, membrane protein | 5,10E-05 | 2,02 |
| <i>spr1049</i> | SP1162 | <i>acoC</i> | Dihydrolipoamide S-acetyltransferase | 1,80E-05 | 2,01 |
| <i>spr1050</i> | SP1163 | <i>acoB</i> | TPP-dependent acetoin dehydrogenase beta chain | 2,38E-05 | 2,05 |
| <i>spr1097</i> | SP1215 | <i>nirC</i> | Formate-nitrate transporter | 2,55E-04 | 0,28 |
| <i>spr1144</i> ⁵⁾ | SP1266 | <i>smf</i> | DNA processing Smf protein | 2,43E-05 | 0,20 |
| <i>spr1174</i> | SP1296 | - | Strong similarity to chorismate mutase; prephenate dehydratase | 2,46E-06 | 2,11 |
| <i>spr1202</i> | SP1341 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 8,30E-03 | 2,01 |
| <i>spr1292</i> | SP1437 | - | Conserved hypothetical protein, putative permease | 1,95E-04 | 2,15 |
| <i>spr1353</i> | SP1500 | <i>glnH</i> | ABC transporter substrate-binding protein - glutamine transport | 1,46E-06 | 2,44 |
| <i>spr1355</i> | SP1502 | <i>glnP</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - glutamine transport | 3,42E-08 | 2,15 |
| <i>spr1379</i> | SP1839 | - | ABC transporter, truncation | 2,57E-06 | 2,68 |
| <i>spr1380</i> | SP1840 | - | ABC transporter, truncation | 3,34E-03 | 3,21 |
| <i>spr1381</i> | - | - | ABC transporter, truncation | 6,39E-05 | 3,08 |
| <i>spr1382</i> | SP1527 | <i>aliB</i> | ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport | 5,50E-07 | 2,00 |
| <i>spr1386</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,22E-04 | 0,47 |
| <i>spr1387</i> | - | - | Hypothetical protein | 4,43E-07 | 0,42 |
| <i>spr1388</i> | SP1533 | - | Hypothetical protein, putative UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase | 1,80E-04 | 0,49 |
| <i>spr1435</i> | SP1577 | <i>apt</i> | Adenine phosphoribosyltransferase | 3,27E-06 | 0,42 |
| <i>spr1436</i> | SP1578 | - | Conserved hypothetical protein | 9,53E-04 | 0,40 |
| <i>spr1452</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,58E-06 | 0,48 |
| <i>spr1523</i> | SP1679 | - | Hypothetical protein | 3,21E-03 | 2,04 |

| | | | | | |
|-----------------------------|---------------|-------------|---|----------|------|
| <i>spr1546</i> | <i>SP1704</i> | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate, CylA homologue | 3,58E-03 | 3,01 |
| <i>spr1547</i> | <i>SP1705</i> | - | Hypothetical protein | 8,58E-05 | 2,38 |
| <i>spr1548</i> | <i>SP1706</i> | - | Hypothetical protein, putative permease | 9,84E-06 | 2,80 |
| <i>spr1549</i> | - | - | Hypothetical protein | 3,15E-04 | 2,13 |
| <i>spr1628⁵⁾</i> | <i>SP1808</i> | <i>pilD</i> | Type 4 prepilin peptidase | 2,95E-05 | 0,32 |
| <i>spr1634</i> | <i>SP1814</i> | <i>trpC</i> | Indole-3-glycerol-phosphate synthase. | 1,72E-03 | 2,01 |
| <i>spr1646</i> | <i>SP1827</i> | - | conserved hypothetical protein | 6,59E-04 | 0,41 |
| <i>spr1698</i> | <i>SP1883</i> | <i>dexS</i> | Dextran glucosidase | 1,91E-05 | 0,08 |
| <i>spr1699</i> | <i>SP1884</i> | <i>treP</i> | Phosphotransferase system, trehalose-specific IIBC component | 8,64E-06 | 0,13 |
| <i>spr1724⁵⁾</i> | <i>SP1540</i> | <i>ssbB</i> | Single-stranded DNA-binding protein | 2,80E-04 | 0,37 |
| <i>spr1755</i> | - | - | Hypothetical protein | 7,79E-06 | 0,44 |
| <i>spr1756⁵⁾</i> | <i>SP1939</i> | <i>dinF</i> | DNA-damage-inducible protein | 2,25E-08 | 0,32 |
| <i>spr1757⁵⁾</i> | <i>SP1940</i> | <i>recA</i> | DNA recombination/repair | 8,89E-06 | 0,38 |
| <i>spr1758⁵⁾</i> | <i>SP1941</i> | <i>cinA</i> | Competence induced protein | 5,39E-06 | 0,25 |
| <i>spr1762⁵⁾</i> | <i>SP1945</i> | <i>comM</i> | Hypothetical protein | 1,14E-06 | 0,35 |
| <i>spr1767⁶⁾</i> | <i>SP1950</i> | <i>cylM</i> | CylM protein, cytolytic toxin system | 8,06E-05 | 2,24 |
| <i>spr1769⁶⁾</i> | <i>SP1952</i> | <i>cylI</i> | Hypothetical protein, <i>cylI</i> immunity domain protein | 1,44E-03 | 2,57 |
| <i>spr1770⁶⁾</i> | <i>SP1953</i> | <i>cylB</i> | ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning - hemolysin secretion protein | 3,02E-04 | 2,07 |
| <i>spr1771⁶⁾</i> | <i>SP1955</i> | <i>nisP</i> | Subtilisin-like serine protease | 3,70E-06 | 2,10 |
| <i>spr1826⁵⁾</i> | <i>SP2013</i> | - | Conserved hypothetical protein, putative permease | 4,63E-06 | 0,44 |
| <i>spr1829⁵⁾</i> | <i>SP2016</i> | <i>nadC</i> | Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase | 3,05E-07 | 0,33 |
| <i>spr1831</i> | - | - | putative ATP binding domain, truncation | 6,33E-04 | 0,48 |
| <i>spr1856</i> | - | - | Hypothetical protein, putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 2,07E-05 | 0,29 |
| <i>spr1857</i> | - | - | Hypothetical protein, putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 9,08E-06 | 0,27 |
| <i>spr1858⁵⁾</i> | <i>SP2047</i> | - | Hypothetical protein | 2,11E-06 | 0,23 |
| <i>spr1859⁵⁾</i> | <i>SP2048</i> | - | Conserved hypothetical protein, N-terminal methylation motif | 4,83E-07 | 0,16 |
| <i>spr1861⁵⁾</i> | <i>SP2050</i> | <i>cglD</i> | Competence protein | 2,45E-10 | 0,18 |
| <i>spr1862⁵⁾</i> | <i>SP2051</i> | <i>cglC</i> | Competence protein | 1,87E-07 | 0,19 |
| <i>spr1863⁵⁾</i> | <i>SP2052</i> | <i>cglB</i> | Competence protein | 1,82E-08 | 0,18 |
| <i>spr1864⁵⁾</i> | <i>SP2053</i> | <i>cglA</i> | Competence protein | 1,39E-07 | 0,14 |
| <i>spr1869</i> | <i>SP2058</i> | <i>tgt</i> | tRNA-guanine transglycosylase (guanine insertion enzyme) | 1,95E-05 | 0,46 |
| <i>spr1916</i> | <i>SP2106</i> | <i>malP</i> | Maltodextrin phosphorylase | 9,34E-05 | 0,23 |
| <i>spr1917</i> | <i>SP2107</i> | <i>malM</i> | 4-alpha-glucanotransferase (amylomaltase) | 5,29E-06 | 0,15 |
| <i>spr1919</i> | <i>SP2109</i> | <i>malC</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - maltose/maltodextrin | 1,80E-03 | 0,43 |
| <i>spr1968</i> | <i>SP2162</i> | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIC component | 2,88E-05 | 0,42 |
| <i>spr1969</i> | <i>SP2163</i> | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIB component | 6,07E-04 | 0,43 |

| | | | | | |
|------------------------------|--------|---------------|---|----------|------|
| <i>spr1970</i> | SP2164 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIa component | 4,79E-04 | 0,49 |
| <i>spr1971</i> | SP2165 | <i>fucU</i> | Fucose pathway protein, function unknown | 7,31E-05 | 0,37 |
| <i>spr1972</i> | SP2166 | <i>fucA</i> | L-fuculose phosphate aldolase | 1,14E-03 | 0,41 |
| <i>spr1973</i> | SP2167 | <i>fcsK</i> | Fucose kinase | 1,84E-03 | 0,41 |
| <i>spr1987</i> | SP2183 | - | Hypothetical protein, truncation | 1,31E-03 | 2,35 |
| <i>spr1988</i> | SP2184 | <i>glpF</i> | Glycerol uptake facilitator protein | 3,15E-05 | 2,63 |
| <i>spr2006</i> ⁵⁾ | SP2201 | <i>cbpD</i> | Choline binding protein D | 1,06E-06 | 0,21 |
| <i>spr2012</i> ⁵⁾ | SP2207 | <i>comFC</i> | Involved in transformation (competence for DNA uptake) | 1,83E-08 | 0,14 |
| <i>spr2013</i> ⁵⁾ | SP2208 | <i>comFA</i> | Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases | 6,09E-07 | 0,19 |
| <i>spr2042</i> ⁵⁾ | SP2236 | <i>comD</i> | Histidine protein kinase | 4,84E-09 | 0,12 |
| <i>spr2043</i> ⁵⁾ | SP2237 | <i>comC</i> | Competence stimulating peptide precursor (CSP) | 1,88E-04 | 0,16 |
| <i>spr2045</i> ⁵⁾ | SP2239 | <i>spetra</i> | Serine protease | 8,29E-06 | 0,31 |

¹⁾ Annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); ³⁾ Bezeichnung charakterisierter Gene; ⁴⁾ Transkriptmengenverhältnis von P206 zu R6; ⁵⁾ Gene des Kompetenzregulons; ⁶⁾ Gene des *cyl*-Clusters

7.3 Das Transkriptom von Mutante P306 bei einer Zelldichte von N=40

Tabelle 7.3: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in Mutante P306

| Gennummer R6 ¹⁾ | Gennummer TIGR4 ²⁾ | Gen ³⁾ | Funktion/Domänen | P-Wert | Transkriptverhältnis [Mutante/R6] ⁴⁾ |
|---|-------------------------------|-------------------------------|---|----------|---|
| <i>spr0013</i> ⁵⁾ <i>/spr1819</i> | SP2006 | <i>comX1/</i> <i>comX2</i> | alternative sigma factor <i>comX</i> | 3,57E-05 | 0,26 |
| <i>spr0020</i> ⁵⁾ | SP0018 | - | Hypothetical protein | 1,40E-05 | 0,24 |
| <i>spr0021</i> ⁵⁾ | SP0019 | <i>purA</i> | Adenylosuccinate synthetase | 9,93E-07 | 0,50 |
| <i>spr0030</i> ⁵⁾ | SP0029 | - | Hypothetical protein | 8,36E-06 | 0,23 |
| <i>spr0031</i> ⁵⁾ | SP0031 | - | Hypothetical protein | 2,29E-06 | 0,20 |
| <i>spr0040</i> | SP0041 | <i>blpU</i> | Amphipathic pore-forming peptide precursor | 7,26E-06 | 0,35 |
| <i>spr0049</i> | SP0048 | <i>purN</i> | 5'-phosphoribosylglycinamide transformylase I | 1,87E-05 | 0,38 |
| <i>spr0098</i> | SP0109 | - | Hypothetical protein, putative bacteriocin | 1,82E-04 | 0,31 |
| <i>spr0099</i> | SP0110 | - | ABC transporter membrane-spanning permease - aa transport | 1,46E-04 | 0,27 |
| <i>spr0102</i> | - | <i>argG</i> | Argininosuccinate synthase | 1,32E-04 | 0,29 |
| <i>spr0105</i> | - | - | bacteriocin transporter, peptidase c39 family, truncation | 2,38E-04 | 0,45 |
| <i>spr0106</i> | - | - | putative bacteriocin transporter, truncation | 5,47E-05 | 0,44 |
| <i>spr0127</i> ⁵⁾ | SP0124 | <i>cibB</i> | competence induced bacteriocin B | 1,66E-09 | 0,08 |
| <i>spr0128</i> ⁵⁾ | SP0125 | <i>cibA</i> | competence induced bacteriocin A | 8,48E-11 | 0,07 |
| <i>spr0141</i> | SP0142 | - | Hypothetical protein | 2,82E-03 | 5,36 |
| <i>spr0142</i> | SP0143 | - | Hypothetical protein, CAAX amino terminal protease family protein | 3,25E-05 | 4,58 |
| <i>spr0143</i> | SP0144 | - | Hypothetical protein, CAAX amino terminal protease family protein | 1,17E-03 | 2,90 |
| <i>spr0276</i> | SP0303 | <i>bglA</i> | 6-phospho-beta-glucosidase | 2,35E-05 | 0,40 |

| | | | | | |
|---------------------------------|--------|--------------|--|----------|-------|
| <i>spr0277</i> | SP0304 | - | Conserved hypothetical protein, truncation, MtN3_slv domain | 1,42E-04 | 0,38 |
| <i>spr0288</i> | SP0318 | <i>kdgK</i> | 2-keto-3-deoxygluconate kinase | 1,94E-03 | 0,48 |
| <i>spr0388</i> | SP0429 | - | Hypothetical protein | 6,32E-08 | 0,19 |
| <i>spr0389</i> | SP0430 | - | Hypothetical protein | 1,02E-05 | 0,29 |
| <i>spr0445</i> | SP0508 | - | putative type I restriction enzyme, truncation | 1,78E-06 | 2,89 |
| <i>spr0461</i> | SP0524 | <i>blpT</i> | Hypothetical protein | 1,80E-05 | 0,42 |
| <i>spr0466</i> ⁵⁾ | SP0529 | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 2,25E-05 | 0,42 |
| <i>spr0467</i> ⁵⁾ | SP0529 | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 2,20E-05 | 0,36 |
| <i>spr0468</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 9,23E-05 | 0,40 |
| <i>spr0469</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 4,67E-08 | 0,21 |
| <i>spr0470</i> ⁵⁾ | SP0541 | <i>blpO</i> | Hypothetical protein | 9,37E-09 | 0,18 |
| <i>spr0471</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,31E-08 | 0,23 |
| <i>spr0472</i> ⁵⁾ | SP0545 | <i>blpY</i> | BlpY immunity protein | 4,04E-05 | 0,32 |
| <i>spr0473</i> ⁵⁾ | SP0546 | <i>blpZ</i> | BlpZ protein | 0,21 | -4,78 |
| <i>spr0474</i> ⁵⁾ | SP0547 | <i>pncP</i> | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 2,60E-05 | 0,34 |
| <i>spr0856</i> ⁵⁾ | SP0954 | <i>celA</i> | Competence protein | 3,93E-07 | 0,12 |
| <i>spr0857</i> ⁵⁾ | SP0955 | <i>celB</i> | Competence protein | 2,77E-06 | 0,18 |
| <i>spr0858</i> ⁵⁾ | SP0956 | - | Hypothetical protein | 1,81E-09 | 0,12 |
| <i>spr0859</i> ⁵⁾ | SP0957 | - | Hypothetical protein, ATP binding domain, similar to <i>tacH B. subtilis</i> | 3,65E-04 | 0,44 |
| <i>spr0860</i> ⁵⁾ | SP0958 | - | Hypothetical protein, putative permease | 1,55E-07 | 0,26 |
| <i>spr0881</i> ⁵⁾ | SP0978 | <i>coiA</i> | Competence protein | 9,99E-07 | 0,15 |
| <i>spr1026</i> | - | - | Hypothetical protein | 7,63E-04 | 0,49 |
| <i>spr1144</i> ⁵⁾ | SP1266 | <i>smf</i> | DNA processing Smf protein | 2,06E-07 | 0,10 |
| <i>spr1165</i> | SP1286 | <i>pyrP</i> | Uracil permease | 2,62E-05 | 0,39 |
| <i>spr1378</i> | SP1839 | - | ABC transporter, truncation | 2,45E-04 | 2,25 |
| <i>spr1379</i> | SP1839 | - | ABC transporter, truncation | 8,30E-06 | 2,52 |
| <i>spr1380</i> | SP1840 | - | ABC transporter, truncation | 2,40E-03 | 2,52 |
| <i>spr1430</i> | SP1572 | <i>dpr</i> | DNA binding protein starved cells-like peroxide resistance protein | 1,32E-03 | 2,29 |
| <i>spr1452</i> | - | - | Hypothetical protein | 2,03E-07 | 0,36 |
| <i>spr1546</i> | SP1704 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate, CylA homologue | 1,14E-03 | 3,99 |
| <i>spr1547</i> | SP1705 | - | Hypothetical protein | 1,77E-04 | 3,52 |
| <i>spr1548</i> | SP1706 | - | Hypothetical protein, putative permease | 9,18E-07 | 4,07 |
| <i>spr1549</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,64E-04 | 3,84 |
| <i>spr1558</i> ^{5) 7)} | SP1714 | <i>ytrA</i> | transcription regulator <i>gntR</i> -like | 1,94E-06 | 4,53 |
| <i>spr1559</i> ^{5) 7)} | SP1715 | ABC-NBD | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 8,21E-10 | 2,76 |
| <i>spr1560</i> ^{5) 7)} | SP1715 | ABC-MSP | Hypothetical protein, putative permease | 2,30E-06 | 2,84 |
| <i>spr1561</i> ⁵⁾ | SP1716 | <i>natB</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - Na ⁺ export | 6,22E-08 | 0,48 |
| <i>spr1562</i> ⁵⁾ | SP1717 | <i>natA</i> | ABC transporter ATP-binding protein - Na ⁺ export | 5,25E-08 | 0,47 |
| <i>spr1628</i> ⁵⁾ | SP1808 | <i>pilD</i> | Type 4 prepilin peptidase | 1,98E-05 | 0,31 |
| <i>spr1641</i> | SP1823 | <i>mgtC</i> | Mg(2+) transport ATPase/permease | 7,50E-06 | 0,46 |
| <i>spr1643</i> | SP1824 | - | ABC transporter membrane-spanning permease - unknown substrate | 1,10E-04 | 0,46 |
| <i>spr1723</i> ⁵⁾ | SP1907 | <i>groES</i> | Cochaperonin GroES | 8,32E-06 | 0,44 |
| <i>spr1724</i> ⁵⁾ | SP1540 | <i>ssbB</i> | Single-stranded DNA-binding protein | 5,68E-09 | 0,09 |
| <i>spr1755</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,63E-08 | 0,27 |
| <i>spr1756</i> ⁵⁾ | SP1939 | <i>dinF</i> | DNA-damage-inducible protein | 4,25E-07 | 0,38 |

| | | | | | |
|------------------------------|--------|---------------|---|----------|------|
| <i>spr1758</i> ⁵⁾ | SP1941 | <i>cinA</i> | Competence induced protein | 4,87E-09 | 0,18 |
| <i>spr1764</i> ⁶⁾ | SP1947 | - | Hypothetical protein | 4,49E-05 | 6,20 |
| <i>spr1766</i> ⁶⁾ | SP1949 | - | Hypothetical protein | 2,21E-04 | 2,65 |
| <i>spr1767</i> ⁶⁾ | SP1950 | <i>cylM</i> | CylM protein, cytolytic toxin system | 7,61E-05 | 3,52 |
| <i>spr1768</i> ⁶⁾ | SP1951 | - | Conserved hypothetical protein, WrbA like | 5,95E-03 | 3,79 |
| <i>spr1769</i> ⁶⁾ | SP1952 | <i>cylI</i> | Hypothetical protein, <i>cylI</i> immunity domain protein | 3,86E-04 | 3,20 |
| <i>spr1770</i> ⁶⁾ | SP1953 | <i>cylB</i> | ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning - hemolysin secretion protein | 8,24E-04 | 3,49 |
| <i>spr1771</i> ⁶⁾ | SP1955 | <i>nisP</i> | Subtilisin-like serine protease | 9,37E-06 | 2,29 |
| <i>spr1786</i> | SP1971 | - | Hypothetical protein | 1,88E-07 | 0,19 |
| <i>spr1826</i> ⁵⁾ | SP2013 | - | Conserved hypothetical protein, putative permease | 2,39E-05 | 0,49 |
| <i>spr1829</i> ⁵⁾ | SP2016 | <i>nadC</i> | Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase | 5,92E-06 | 0,33 |
| <i>spr1831</i> | - | - | putative ATP binding domain, truncation | 1,82E-09 | 0,20 |
| <i>spr1856</i> | - | - | Hypothetical protein, putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 2,67E-07 | 0,08 |
| <i>spr1857</i> | - | - | Hypothetical protein, putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 1,31E-05 | 0,26 |
| <i>spr1858</i> ⁵⁾ | SP2047 | - | Hypothetical protein | 1,84E-03 | 0,48 |
| <i>spr1859</i> ⁵⁾ | SP2048 | - | Conserved hypothetical protein, N-terminal methylation motif | 9,79E-05 | 0,31 |
| <i>spr1861</i> ⁵⁾ | SP2050 | <i>cglD</i> | Competence protein | 4,32E-09 | 0,08 |
| <i>spr1862</i> ⁵⁾ | SP2051 | <i>cglC</i> | Competence protein | 8,61E-07 | 0,32 |
| <i>spr1863</i> ⁵⁾ | SP2052 | <i>cglB</i> | Competence protein | 1,65E-06 | 0,14 |
| <i>spr1864</i> ⁵⁾ | SP2053 | <i>cglA</i> | Competence protein | 3,43E-07 | 0,11 |
| <i>spr1869</i> | SP2058 | <i>tgt</i> | tRNA-guanine transglycosylase (guanine insertion enzyme) | 2,68E-05 | 0,41 |
| <i>spr1913</i> | SP2103 | <i>rrmA</i> | 23S rRNA m1G745 methyltransferase | 1,96E-03 | 2,45 |
| <i>spr1917</i> | SP2107 | <i>malM</i> | 4-alpha-glucanotransferase (amylomaltase) | 2,40E-04 | 0,47 |
| <i>spr2012</i> ⁵⁾ | SP2207 | <i>comFC</i> | Involved in transformation (competence for DNA uptake) | 7,37E-05 | 0,29 |
| <i>spr2013</i> ⁵⁾ | SP2208 | <i>comFA</i> | Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases | 2,14E-05 | 0,32 |
| <i>spr2041</i> ⁵⁾ | SP2235 | <i>comE</i> | Response regulator | 4,97E-05 | 0,21 |
| <i>spr2042</i> ⁵⁾ | SP2236 | <i>comD</i> | Histidine protein kinase | 1,09E-05 | 0,24 |
| <i>spr2043</i> ⁵⁾ | SP2237 | <i>comC</i> | Competence stimulating peptide precursor (CSP) | 2,93E-05 | 0,24 |
| <i>spr2045</i> ⁵⁾ | SP2239 | <i>sphtra</i> | Serine protease | 1,53E-06 | 0,33 |
| <i>spr2046</i> ⁵⁾ | SP2240 | <i>spo0J</i> | Chromosome segregation protein | 4,08E-04 | 0,49 |

¹⁾ Annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); ³⁾ Bezeichnung charakterisierter Gene; ⁴⁾ Transkriptmengenverhältnis von P306 zu R6; ⁵⁾ Gene des Kompetenzregulons; ⁶⁾ Gene des *cyl*-Clusters; ⁷⁾ Gene des *ytrA*-Clusters

7.4 Das Transkriptom von Mutante P406 bei einer Zelldichte von N=40

Tabelle 7.4: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in Mutante P406

| Gennummer R6 ¹⁾ | Gennummer TIGR4 ²⁾ | Gen ³⁾ | Funktion/Domänen | P-Wert | Transkriptverhältnis [Mutante/R6] ⁴⁾ |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------|---|----------|---|
| <i>spr0013</i> ⁵⁾ | SP2006 | <i>comX1/</i> | alternative sigma factor <i>comX</i> | 7,79E-05 | 0,25 |
| <i>spr1819</i> | | <i>comX2</i> | | | |
| <i>spr0020</i> ⁵⁾ | SP0018 | - | Hypothetical protein | 4,09E-04 | 0,32 |
| <i>spr0021</i> ⁵⁾ | SP0019 | <i>purA</i> | Adenylosuccinate synthetase | 1,04E-06 | 0,40 |
| <i>spr0030</i> ⁵⁾ | SP0029 | - | Hypothetical protein | 1,32E-04 | 0,26 |
| <i>spr0031</i> ⁵⁾ | SP0031 | - | Hypothetical protein | 1,84E-06 | 0,13 |
| <i>spr0040</i> | SP0041 | <i>blpU</i> | Amphipathic pore-forming peptide precursor | 6,53E-07 | 0,30 |
| <i>spr0043</i> ⁵⁾ | SP0042 | <i>comA</i> | Transport ATP-binding protein ComA | 4,32E-03 | 0,47 |
| <i>spr0098</i> | SP0109 | - | Hypothetical protein, putative bacteriocin | 2,21E-03 | 0,47 |
| <i>spr0099</i> | SP0110 | - | ABC transporter membrane-spanning permease - aa transport | 9,20E-03 | 0,45 |
| <i>spr0102</i> | - | <i>argG</i> | Argininosuccinate synthase | 1,48E-03 | 0,45 |
| <i>spr0104</i> | SP0108 | - | Hypothetical protein, HTH-XRE-domain | 2,82E-03 | 0,49 |
| <i>spr0106</i> | - | - | putative bacteriocin transporter, truncation | 1,01E-03 | 0,46 |
| <i>spr0127</i> ⁵⁾ | SP0124 | <i>cibB</i> | competence induced bacteriocin B | 5,96E-10 | 0,11 |
| <i>spr0128</i> ⁵⁾ | SP0125 | <i>cibA</i> | competence induced bacteriocin A | 9,12E-07 | 0,13 |
| <i>spr0141</i> | SP0142 | - | Hypothetical protein | 3,02E-03 | 4,31 |
| <i>spr0142</i> | SP0143 | - | Hypothetical protein, CAAX amino terminal protease family protein | 2,11E-04 | 3,38 |
| <i>spr0143</i> | SP0144 | - | Hypothetical protein, CAAX amino terminal protease family protein | 2,67E-04 | 2,74 |
| <i>spr0276</i> | SP0303 | <i>bglA</i> | 6-phospho-beta-glucosidase | 2,85E-03 | 0,48 |
| <i>spr0277</i> | SP0304 | - | Conserved hypothetical protein, truncation, MtN3_slv domain | 1,19E-04 | 0,27 |
| <i>spr0278</i> | SP0305 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIB component | 3,00E-03 | 0,44 |
| <i>spr0282</i> | SP0310 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIC component | 1,05E-03 | 0,45 |
| <i>spr0306</i> | SP1217 | - | Hypothetical protein | 2,22E-07 | 2,56 |
| <i>spr0385</i> | SP0425 | <i>accC</i> | Biotin carboxylase (a subunit of acetyl-CoA carboxylase (ACC)) | 6,43E-05 | 0,50 |
| <i>spr0388</i> | SP0429 | - | Hypothetical protein | 7,87E-06 | 0,22 |
| <i>spr0459</i> | SP0522 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 8,27E-03 | 2,41 |
| <i>spr0467</i> ⁵⁾ | SP0529 | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 7,95E-05 | 0,40 |
| <i>spr0468</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 8,53E-04 | 0,41 |
| <i>spr0469</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 4,94E-06 | 0,35 |
| <i>spr0470</i> | SP0541 | <i>blpO</i> | Hypothetical protein | 1,18E-06 | 0,25 |
| <i>spr0471</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,79E-06 | 0,35 |
| <i>spr0472</i> ⁵⁾ | SP0545 | <i>blpY</i> | BlpY immunity protein | 1,11E-04 | 0,26 |
| <i>spr0473</i> ⁵⁾ | SP0546 | <i>blpZ</i> | BlpZ protein | 1,22E-03 | 0,48 |
| <i>spr0474</i> ⁵⁾ | SP0547 | <i>pncP</i> | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 7,09E-05 | 0,37 |
| <i>spr0496</i> | - | - | Transposase, truncation | 5,38E-07 | 2,52 |
| <i>spr1446</i> | | | | | |
| <i>spr0856</i> ⁵⁾ | SP0954 | <i>celA</i> | Competence protein | 1,82E-04 | 0,25 |
| <i>spr0857</i> ⁵⁾ | SP0955 | <i>celB</i> | Competence protein | 1,52E-03 | 0,42 |
| <i>spr0858</i> ⁵⁾ | SP0956 | - | Hypothetical protein | 8,53E-10 | 0,14 |

| | | | | | |
|------------------------------|--------|--------------|--|----------|-------|
| <i>spr0860</i> ⁵⁾ | SP0958 | - | Hypothetical protein, putative permease | 1,05E-05 | 0,37 |
| <i>spr0881</i> ⁵⁾ | SP0978 | <i>coiA</i> | Competence protein | 6,66E-04 | 0,37 |
| <i>spr1120</i> | SP1241 | <i>glnP</i> | ABC transporter membrane spanning permease - glutamine transport | 2,89E-09 | 0,36 |
| <i>spr1121</i> | SP1242 | <i>glnQ</i> | ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport | 4,22E-07 | 0,41 |
| <i>spr1144</i> ⁵⁾ | SP1266 | <i>smf</i> | DNA processing Smf protein | 7,32E-06 | 0,12 |
| <i>spr1146</i> ⁷⁾ | SP1268 | <i>licB</i> | Homologous to LicB, which regulates expression of LPS epitopes in <i>H. influenzae</i> | 3,20E-03 | 4,14 |
| <i>spr1147</i> ⁷⁾ | SP1269 | <i>pck</i> | Choline kinase | 5,16E-03 | 5,21 |
| <i>spr1149</i> ⁷⁾ | SP1271 | - | Conserved hypothetical protein, <i>ispD</i> homologue | 2,15E-03 | 7,93 |
| <i>spr1272</i> | SP1415 | <i>nagB</i> | N-acetylglucosamine-6-phosphate isomerase | 1,60E-06 | 2,56 |
| <i>spr1334</i> | SP1480 | - | Hypothetical protein | 4,25E-07 | 0,45 |
| <i>spr1345</i> | SP1492 | - | Hypothetical protein, cell wall surface anchor family protein | 8,54E-05 | 3,18 |
| <i>spr1379</i> | SP1839 | - | ABC transporter, truncation | 5,45E-06 | 2,05 |
| <i>spr1423</i> | SP1565 | - | Conserved hypothetical protein, putative dihydrodipicolinate reductase | 4,91E-06 | 0,47 |
| <i>spr1440</i> | SP1586 | - | Conserved hypothetical protein, putative RNA-helicase | 6,12E-05 | 0,43 |
| <i>spr1452</i> | - | - | Hypothetical protein | 2,75E-06 | 0,43 |
| <i>spr1562</i> ⁵⁾ | SP1717 | <i>nata</i> | ABC transporter ATP-binding protein - Na ⁺ export | 6,29E-07 | 0,46 |
| <i>spr1628</i> ⁵⁾ | SP1808 | <i>pilD</i> | Type 4 prepilin peptidase | 1,92E-04 | 0,33 |
| <i>spr1701</i> | SP1792 | - | Degenerate transposase (orf1) | 1,93E-07 | 0,39 |
| <i>spr1723</i> ⁵⁾ | SP1907 | <i>groES</i> | Cochaperonin GroES | 1,04E-04 | 0,50 |
| <i>spr1724</i> ⁵⁾ | SP1540 | <i>ssbB</i> | Single-stranded DNA-binding protein | 5,17E-07 | 0,09 |
| <i>spr1755</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,92E-06 | 0,29 |
| <i>spr1756</i> ⁵⁾ | SP1939 | <i>dinF</i> | DNA-damage-inducible protein | 1,17E-08 | 0,29 |
| <i>spr1757</i> ⁵⁾ | SP1940 | <i>recA</i> | DNA recombination/repair | 1,08E-04 | 0,38 |
| <i>spr1758</i> ⁵⁾ | SP1941 | <i>cinA</i> | Competence induced protein | 1,44E-08 | 0,22 |
| <i>spr1763</i> ⁶⁾ | SP1946 | <i>plcR</i> | Transcriptional activator, <i>xre</i> family | 1,29E-03 | 2,22 |
| <i>spr1764</i> ⁶⁾ | SP1947 | - | Hypothetical protein | 3,13E-06 | 4,90 |
| <i>spr1766</i> ⁶⁾ | SP1949 | - | Hypothetical protein | 1,92E-03 | 2,47 |
| <i>spr1767</i> ⁶⁾ | SP1950 | <i>cylM</i> | CylM protein, cytolytic toxin system | 2,33E-04 | 3,57 |
| <i>spr1768</i> ⁶⁾ | SP1951 | - | Conserved hypothetical protein, WrbA like | 3,40E-05 | 4,81 |
| <i>spr1769</i> ⁶⁾ | SP1952 | <i>cylI</i> | Hypothetical protein, <i>cylI</i> immunity domain protein | 6,40E-04 | 3,93 |
| <i>spr1770</i> ⁶⁾ | SP1953 | <i>cylB</i> | ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning - hemolysin secretion protein | 2,28E-08 | 3,72 |
| <i>spr1771</i> ⁶⁾ | SP1955 | <i>nisP</i> | Subtilisin-like serine protease | 2,15E-05 | 2,87 |
| <i>spr1772</i> ⁶⁾ | SP1956 | - | Hypothetical protein, membrane protein, truncation | 8,03E-04 | 2,22 |
| <i>spr1773</i> ⁶⁾ | SP1957 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 4,29E-04 | 2,78 |
| <i>spr1786</i> | SP1971 | - | Hypothetical protein | 3,38E-05 | 0,26 |
| <i>spr1814</i> ⁸⁾ | SP2000 | <i>rr11</i> | Response regulator 11, <i>luxR</i> type | 3,00E-05 | 13,85 |
| <i>spr1815</i> ⁸⁾ | SP2001 | <i>hk11</i> | Histidine kinase 11 | 7,76E-12 | 22,36 |
| <i>spr1816</i> ⁸⁾ | SP2002 | - | Conserved hypothetical protein, putative permease | 1,12E-10 | 18,41 |
| <i>spr1817</i> ⁸⁾ | SP2003 | - | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 3,48E-09 | 12,13 |

| | | | | | |
|------------------------------|--------|--------------|---|----------|------|
| <i>spr1818</i> ⁸⁾ | SP2005 | - | Hypothetical protein, putative membrane protein | 1,32E-05 | 7,89 |
| <i>spr1826</i> ⁵⁾ | SP2013 | - | Conserved hypothetical protein, putative permease | 6,75E-06 | 0,43 |
| <i>spr1829</i> ⁵⁾ | SP2016 | <i>nadC</i> | Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase | 3,84E-04 | 0,40 |
| <i>spr1831</i> | - | - | putative ATP binding domain, truncation | 1,03E-06 | 0,21 |
| <i>spr1856</i> | - | - | Hypothetical protein, putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 1,75E-05 | 0,15 |
| <i>spr1857</i> | - | - | Hypothetical protein, putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 1,03E-04 | 0,26 |
| <i>spr1858</i> ⁵⁾ | SP2047 | - | Hypothetical protein | 5,51E-04 | 0,30 |
| <i>spr1859</i> ⁵⁾ | SP2048 | - | Conserved hypothetical protein, N-terminal methylation motif | 2,21E-04 | 0,28 |
| <i>spr1861</i> ⁵⁾ | SP2050 | <i>cglD</i> | Competence protein | 5,08E-07 | 0,08 |
| <i>spr1862</i> ⁵⁾ | SP2051 | <i>cglC</i> | Competence protein | 1,28E-06 | 0,27 |
| <i>spr1863</i> ⁵⁾ | SP2052 | <i>cglB</i> | Competence protein | 6,73E-07 | 0,09 |
| <i>spr1864</i> ⁵⁾ | SP2053 | <i>cglA</i> | Competence protein | 6,12E-09 | 0,08 |
| <i>spr1914</i> | SP2104 | - | Hypothetical protein | 1,40E-09 | 8,62 |
| <i>spr1933</i> | SP1115 | <i>rgg</i> | Positive transcriptional regulator of glucosyltransferase and Spp phenotype | 9,43E-07 | 2,66 |
| <i>spr1936</i> | SP2127 | <i>tktC</i> | Putative transketolase c-terminal section | 2,68E-07 | 2,25 |
| <i>spr1937</i> | SP2128 | <i>tktN</i> | Putative transketolase n-terminal section | 6,65E-06 | 2,49 |
| <i>spr1938</i> | SP2129 | - | PTS EIIc component | 7,72E-05 | 2,05 |
| <i>spr1939</i> | SP2130 | - | PTS EIIb component | 1,44E-05 | 2,61 |
| <i>spr1953</i> | SP2145 | - | Conserved hypothetical protein, putative alpha-1,2-mannosidase | 9,26E-03 | 2,67 |
| <i>spr2006</i> ⁵⁾ | SP2201 | <i>cbpD</i> | Choline binding protein D | 4,56E-04 | 0,31 |
| <i>spr2012</i> ⁵⁾ | SP2207 | <i>comFC</i> | Involved in transformation (competence for DNA uptake) | 6,13E-05 | 0,19 |
| <i>spr2013</i> ⁵⁾ | SP2208 | <i>comFA</i> | Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases | 3,99E-04 | 0,34 |
| <i>spr2016</i> | - | - | Transposase, uncharacterized, truncation | 2,25E-03 | 2,20 |
| <i>spr2041</i> ⁵⁾ | SP2235 | <i>comE</i> | Response regulator | 4,90E-07 | 0,14 |
| <i>spr2042</i> ⁵⁾ | SP2236 | <i>comD</i> | Histidine protein kinase | 1,03E-05 | 0,13 |
| <i>spr2043</i> ⁵⁾ | SP2237 | <i>comC</i> | Competence stimulating peptide precursor (CSP) | 1,18E-04 | 0,19 |

¹⁾ Annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); ³⁾ Bezeichnung charakterisierter Gene; ⁴⁾ Transkriptmengenverhältnis von P406 zu R6; ⁵⁾ Gene des Kompetenzregulons; ⁶⁾ Gene des *cyl*-Clusters; ⁷⁾ Gene des *lic1*-Operons; ⁸⁾ Gene des TCS11-Clusters

7.5 Das Transkriptom der Mutante P506 bei einer Zelldichte von N=40

Tabelle 7.5: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in Mutante P506

| Gennummer R6 ¹⁾ | Gennummer TIGR4 ²⁾ | Gen ³⁾ | Funktion/Domänen | P-Wert | Transkriptverhältnis [Mutante/R6] ⁴⁾ |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------|--|----------|---|
| <i>spr0013</i> ⁵⁾ | SP2006 | <i>comX1/</i> | alternative sigma factor <i>comX</i> | 5,91E-06 | 0,29 |
| <i>spr1819</i> | | <i>comX2</i> | | | |
| <i>spr0020</i> ⁵⁾ | SP0018 | - | Hypothetical protein | 7,70E-05 | 0,29 |
| <i>spr0026</i> ⁵⁾ | SP0024 | - | Conserved hypothetical protein, putative carbonic anhydrase | 3,76E-04 | 2,36 |
| <i>spr0030</i> ⁵⁾ | SP0029 | - | Hypothetical protein | 4,47E-07 | 0,24 |
| <i>spr0031</i> ⁵⁾ | SP0031 | - | Hypothetical protein | 1,68E-03 | 0,33 |
| <i>spr0033</i> | SP0033 | - | Conserved hypothetical protein, putative Succinyl-CoA synthetase, alpha subunit-related enzyme | 2,48E-03 | 2,03 |
| <i>spr0035</i> | SP0035 | <i>aspC</i> | Aspartate aminotransferase | 2,07E-04 | 2,23 |
| <i>spr0036</i> | SP0036 | - | Conserved hypothetical protein, putative DNA repair protein RecO | 4,23E-03 | 2,27 |
| <i>spr0040</i> | SP0041 | <i>blpU</i> | Amphipathic pore-forming peptide precursor | 2,98E-07 | 0,13 |
| <i>spr0049</i> | SP0048 | <i>purN</i> | 5'-phosphoribosylglycinamide transformylase 1 | 1,12E-06 | 0,21 |
| <i>spr0068</i> | SP0075 | - | Conserved hypothetical protein, truncation; PNP phosphorylase family | 1,10E-06 | 2,97 |
| <i>spr0069</i> | SP0077 | - | Hypothetical protein | 1,76E-08 | 4,23 |
| <i>spr0070</i> | SP0078 | <i>trkH</i> | Trk transporter membrane-spanning protein - K ⁺ transport | 3,72E-04 | 3,13 |
| <i>spr0071</i> | SP0079 | <i>trkA</i> | Trk transporter NAD ⁺ binding protein - K ⁺ transport | 4,79E-05 | 2,80 |
| <i>spr0098</i> | SP0109 | - | Hypothetical protein, putative bacteriocin | 7,79E-07 | 0,18 |
| <i>spr0099</i> | SP0110 | - | ABC transporter membrane-spanning permease - aa transport | 3,62E-04 | 0,23 |
| <i>spr0102</i> | - | <i>argG</i> | Argininosuccinate synthase | 9,54E-04 | 0,35 |
| <i>spr0105</i> | - | - | bacteriocin transporter, peptidase c39 family, truncation | 2,33E-05 | 0,34 |
| <i>spr0106</i> | - | - | putative bacteriocin transporter, truncation | 8,75E-05 | 0,24 |
| <i>spr0107</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,68E-03 | 0,25 |
| <i>spr0127</i> ⁵⁾ | SP0124 | <i>cibB</i> | competence induced bacteriocin B | 3,61E-07 | 0,16 |
| <i>spr0128</i> ⁵⁾ | SP0125 | <i>cibA</i> | competence induced bacteriocin A | 4,34E-05 | 0,34 |
| <i>spr0129</i> | SP0127 | - | Conserved hypothetical protein, Peptidase M22 domain, putative glycoprotease | 5,76E-04 | 2,45 |
| <i>spr0130</i> | SP0128 | <i>rimI</i> | Ribosomal protein alanine acetyltransferase | 2,06E-04 | 2,02 |
| <i>spr0133</i> | SP1582 | - | Degenerate transposase (orf2) | 7,93E-04 | 2,54 |
| <i>spr0149</i> | SP0151 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 8,31E-06 | 2,02 |
| <i>spr0162</i> | SP0176 | <i>ribA</i> | Riboflavin biosynthesis; GTP-cyclohydrolase II. | 2,32E-04 | 0,46 |
| <i>spr0171</i> | SP0186 | <i>uvrA</i> | Excinuclease ABC - subunit A | 3,09E-03 | 2,07 |
| <i>spr0177</i> | SP0194 | - | Conserved hypothetical protein | 2,55E-04 | 2,02 |
| <i>spr0186</i> | SP0207 | - | Hypothetical protein, putative ribonucleoside triphosphate reductase | 6,33E-05 | 2,40 |
| <i>spr0191</i> | SP0212 | <i>rplB</i> | 50S Ribosomal protein L2 | 4,41E-05 | 0,48 |
| <i>spr0268</i> | SP0291 | <i>sulC</i> | GTP cyclohydrolase | 1,39E-03 | 2,20 |

| | | | | | |
|-----------------------------|--------|--------------|---|----------|------|
| <i>spr0271</i> | SP0294 | <i>rplM</i> | 50S Ribosomal protein L13 | 5,35E-03 | 2,01 |
| <i>spr0276</i> | SP0303 | <i>bglA</i> | 6-phospho-beta-glucosidase | 7,91E-05 | 0,46 |
| <i>spr0277</i> | SP0304 | - | Conserved hypothetical protein, truncation, MtN3_slv domain | 6,65E-09 | 0,14 |
| <i>spr0278</i> | SP0305 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIB component | 4,99E-03 | 0,42 |
| <i>spr0280</i> | SP0308 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIA component | 8,77E-06 | 0,24 |
| <i>spr0304</i> | SP0336 | <i>pbpX</i> | Penicillin-binding protein 2X | 3,58E-04 | 2,06 |
| <i>spr0340</i> | SP0383 | <i>mvaK2</i> | Phosphomevalonate kinase | 2,47E-05 | 2,06 |
| <i>spr0363</i> | SP0401 | <i>recD</i> | Exonuclease V | 1,78E-03 | 2,24 |
| <i>spr0388</i> | SP0429 | - | Hypothetical protein | 6,50E-07 | 0,19 |
| <i>spr0389</i> | SP0430 | - | Hypothetical protein | 7,46E-06 | 0,23 |
| <i>spr0427</i> | SP0480 | <i>trkA</i> | Trk transporter NAD ⁺ binding protein - K ⁺ transport | 4,10E-05 | 2,12 |
| <i>spr0445</i> | SP0508 | - | putative type I restriction enzyme, truncation | 3,82E-05 | 3,06 |
| <i>spr0446</i> | SP0507 | - | putative type I restriction enzyme, truncation | 1,73E-07 | 0,34 |
| <i>spr0447</i> | SP0506 | <i>xerD</i> | Integrase/recombinase | 4,07E-06 | 0,36 |
| <i>spr0448</i> | SP0507 | - | putative type I restriction enzyme, truncation | 9,33E-06 | 0,32 |
| <i>spr0459</i> | SP0522 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 2,54E-05 | 2,84 |
| <i>spr0460</i> | SP0523 | - | ABC transporter membrane-spanning permease, <i>ecsB</i> like | 3,32E-05 | 2,65 |
| <i>spr0461</i> | SP0524 | <i>blpT</i> | Hypothetical protein | 3,03E-06 | 0,23 |
| <i>spr0462</i> | SP0525 | <i>blpS</i> | Regulatory protein | 1,51E-06 | 0,46 |
| <i>spr0468⁵⁾</i> | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 3,08E-07 | 0,11 |
| <i>spr0469⁵⁾</i> | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 1,08E-06 | 0,05 |
| <i>spr0470</i> | SP0541 | <i>blpO</i> | Hypothetical protein | 3,52E-07 | 0,07 |
| <i>spr0471</i> | - | - | Hypothetical protein | 4,41E-06 | 0,09 |
| <i>spr0472⁵⁾</i> | SP0545 | <i>blpY</i> | BlpY immunity protein | 2,90E-05 | 0,17 |
| <i>spr0473⁵⁾</i> | SP0546 | <i>blpZ</i> | BlpZ protein | 1,33E-04 | 0,20 |
| <i>spr0474⁵⁾</i> | SP0547 | <i>pncP</i> | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 1,60E-04 | 0,32 |
| <i>spr0504</i> | SP0576 | <i>licT</i> | Transcriptional antiterminator (BglG family) | 1,76E-07 | 0,22 |
| <i>spr0506</i> | SP0578 | <i>bglH</i> | 6-phospho-beta-glucosidase | 4,80E-03 | 0,46 |
| <i>spr0557</i> | SP0636 | - | ABC transporter ATP-binding protein - role in polysaccharide efflux | 2,00E-03 | 2,12 |
| <i>spr0565</i> | SP0648 | <i>bgaA</i> | beta-galactosidase precursor | 2,33E-06 | 0,31 |
| <i>spr0613</i> | SP0701 | <i>pyrF</i> | Orotidine-5'-decarboxylase | 2,18E-04 | 2,25 |
| <i>spr0674</i> | SP0766 | <i>sodaA</i> | Manganese co-factored superoxide dismutase | 8,39E-07 | 0,46 |
| <i>spr0707⁵⁾</i> | SP0798 | <i>ciaR</i> | Response regulator, transcriptional regulatory protein | 7,87E-04 | 0,47 |
| <i>spr0746</i> | SP0844 | <i>cdd</i> | Cytidine deaminase | 7,06E-04 | 3,01 |
| <i>spr0782⁵⁾</i> | SP0879 | - | Hypothetical protein | 6,25E-05 | 0,45 |
| <i>spr0819</i> | SP0918 | <i>speE</i> | Spermidine synthase | 2,87E-05 | 0,35 |
| <i>spr0820</i> | SP0919 | - | Conserved hypothetical protein, gamma-glutamyl kinase like | 8,50E-08 | 0,44 |
| <i>spr0821</i> | SP0920 | <i>nspC</i> | Carboxynorspermidine decarboxylase | 1,02E-03 | 0,49 |
| <i>spr0823</i> | SP0922 | <i>but</i> | Beta-alanine synthase or beta-ureidopropionase | 2,18E-06 | 0,32 |
| <i>spr0825</i> | SP0924 | - | Hypothetical protein | 8,37E-05 | 0,24 |
| <i>spr0856⁵⁾</i> | SP0954 | <i>celA</i> | Competence protein | 1,63E-08 | 0,14 |
| <i>spr0857⁵⁾</i> | SP0955 | <i>celB</i> | Competence protein | 5,15E-05 | 0,20 |
| <i>spr0858⁵⁾</i> | SP0956 | - | Hypothetical protein | 5,83E-08 | 0,25 |

| | | | | | |
|---------------------------------|--------|--------------|--|----------|------|
| <i>spr0859</i> ⁵⁾ | SP0957 | - | Hypothetical protein, ATP binding domain, similar to <i>tacH B. subtilis</i> | 1,10E-03 | 0,30 |
| <i>spr0860</i> ⁵⁾ | SP0958 | - | Hypothetical protein, putative permease | 3,44E-08 | 0,36 |
| <i>spr0866</i> | SP0964 | <i>pyrD</i> | Dihydroorotate dehydrogenase | 4,29E-04 | 2,30 |
| <i>spr0881</i> ⁵⁾ | SP0978 | <i>coiA</i> | Competence protein | 1,83E-04 | 0,35 |
| <i>spr0908</i> | SP1004 | <i>phtE</i> | Pneumococcal histidine triad protein E precursor | 5,45E-08 | 0,19 |
| <i>spr0917</i> | SP1012 | <i>ccl</i> | citrulline cluster-linked gene | 3,00E-03 | 0,29 |
| <i>spr0944</i> | SP1042 | - | Hypothetical protein | 3,62E-04 | 0,45 |
| <i>spr0960</i> | SP1115 | <i>mutR</i> | Similar to positive transcriptional regulator MutR. | 1,80E-05 | 0,38 |
| <i>spr0968</i> | - | - | Hypothetical protein | 8,21E-05 | 0,30 |
| <i>spr0969</i> | SP0885 | <i>nikS</i> | Nikkomycin biosynthesis protein, carboxylase | 1,30E-06 | 0,47 |
| <i>spr0971</i> | SP1116 | <i>mefE</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - macrolide efflux | 1,73E-06 | 0,49 |
| <i>spr0996</i> ⁵⁾ | SP1088 | <i>radC</i> | DNA repair protein | 1,99E-03 | 0,36 |
| <i>spr1017</i> ⁵⁾ | SP1110 | <i>mreA</i> | Macrolide-efflux protein | 1,88E-04 | 0,34 |
| <i>spr1055</i> | SP1169 | <i>ung</i> | DNA-uracil glycosylase | 7,46E-03 | 2,03 |
| <i>spr1067</i> | SP1182 | <i>lacR</i> | Lactose phosphotransferase system repressor | 1,86E-04 | 0,45 |
| <i>spr1076</i> | SP1193 | <i>lacA</i> | Galactose-6-phosphate isomerase LacA subunit | 3,01E-05 | 0,46 |
| <i>spr1139</i> | SP1260 | <i>cutC</i> | Copper sensitivity | 1,68E-05 | 2,49 |
| <i>spr1144</i> ⁵⁾ | SP1266 | <i>smf</i> | DNA processing Smf protein | 1,13E-09 | 0,10 |
| <i>spr1152</i> | SP1274 | <i>licD2</i> | licD Protein | 9,37E-06 | 0,49 |
| <i>spr1161</i> | SP1282 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 2,11E-03 | 2,47 |
| <i>spr1192</i> | SP1889 | <i>appC</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - oligopeptide transport | 1,22E-03 | 0,46 |
| <i>spr1200</i> | SP1338 | - | Hypothetical protein | 5,84E-03 | 0,50 |
| <i>spr1287</i> | SP1431 | <i>spnIM</i> | DNA modification methyltransferase | 9,01E-04 | 0,45 |
| <i>spr1359</i> | SP1507 | <i>atpC</i> | Proton-translocating ATPase, F1 sector, epsilon-subunit | 5,47E-07 | 0,39 |
| <i>spr1380</i> | SP1840 | - | ABC transporter, truncation | 3,16E-03 | 2,35 |
| <i>spr1440</i> | SP1586 | - | Conserved hypothetical protein, putative RNA-helicase | 1,70E-03 | 0,42 |
| <i>spr1502</i> | SP1659 | <i>ileS</i> | Isoleucyl-tRNA synthetase | 1,59E-03 | 0,48 |
| <i>spr1523</i> | SP1679 | - | Hypothetical protein | 2,10E-05 | 0,44 |
| <i>spr1548</i> | SP1706 | - | Hypothetical protein, putative permease | 6,81E-04 | 0,40 |
| <i>spr1549</i> | - | - | Hypothetical protein | 6,33E-06 | 0,36 |
| <i>spr1558</i> ^{5) 7)} | SP1714 | <i>ytrA</i> | transcription regulator <i>gntR</i> -like | 2,86E-03 | 3,12 |
| <i>spr1559</i> ^{5) 7)} | SP1715 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 1,38E-06 | 2,69 |
| <i>spr1561</i> ⁵⁾ | SP1716 | <i>natB</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - Na ⁺ export | 2,46E-06 | 0,44 |
| <i>spr1562</i> ⁵⁾ | SP1717 | <i>nata</i> | ABC transporter ATP-binding protein - Na ⁺ export | 7,64E-08 | 0,33 |
| <i>spr1564</i> | SP1720 | - | Hypothetical protein | 7,24E-03 | 2,27 |
| <i>spr1606</i> | SP1780 | <i>pepF</i> | Similar to oligoendopeptidase | 5,58E-03 | 2,06 |
| <i>spr1612</i> | SP1786 | - | Conserved hypothetical protein | 1,56E-04 | 2,15 |
| <i>spr1626</i> | SP1805 | - | Hypothetical protein, CsbD-like phage protein | 1,37E-05 | 0,46 |
| <i>spr1628</i> ⁵⁾ | SP1808 | <i>pilD</i> | Type 4 prepilin peptidase | 3,42E-03 | 0,45 |
| <i>spr1629</i> ⁵⁾ | SP1809 | - | Transcription regulator, HTH_XRE domain | 5,66E-04 | 3,98 |
| <i>spr1630</i> ⁵⁾ | SP1810 | - | Hypothetical protein | 1,84E-05 | 2,12 |
| <i>spr1641</i> | SP1823 | <i>mgtC</i> | Mg(2+) transport ATPase/permease | 1,88E-08 | 0,28 |

| | | | | | |
|-----------------------------|--------|--------------|--|----------|-------|
| <i>spr1684</i> | SP1869 | <i>fatD</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - ferric iron transport | 4,01E-04 | 2,46 |
| <i>spr1691</i> | SP1876 | <i>scpA</i> | segregation and condensation protein A | 8,72E-05 | 2,44 |
| <i>spr1694</i> | SP1879 | - | Conserved hypothetical protein, putative phosphoesterase | 6,25E-03 | 2,90 |
| <i>spr1701</i> | SP1792 | - | Degenerate transposase (orf1) | 8,23E-04 | 0,48 |
| <i>spr1717</i> | SP1901 | <i>trmA</i> | RNA methyltransferase, TrmA family | 4,02E-03 | 2,07 |
| <i>spr1724⁵⁾</i> | SP1540 | <i>ssbB</i> | Single-stranded DNA-binding protein | 1,14E-06 | 0,11 |
| <i>spr1731</i> | SP1915 | - | Transcriptional regulator, LytR/AlgR family | 7,19E-05 | 2,13 |
| <i>spr1763⁶⁾</i> | SP1946 | <i>plcR</i> | Transcriptional activator, <i>xre</i> family | 1,78E-03 | 2,84 |
| <i>spr1764⁶⁾</i> | SP1947 | - | Hypothetical protein | 4,42E-08 | 15,93 |
| <i>spr1765⁶⁾</i> | SP1948 | - | Hypothetical protein | 1,99E-04 | 2,48 |
| <i>spr1766⁶⁾</i> | SP1949 | - | Hypothetical protein | 8,06E-09 | 6,68 |
| <i>spr1767⁶⁾</i> | SP1950 | <i>cylM</i> | CylM protein, cytolytic toxin system | 5,25E-06 | 5,66 |
| <i>spr1768⁶⁾</i> | SP1951 | - | Conserved hypothetical protein, WrbA like | 2,75E-07 | 9,17 |
| <i>spr1769⁶⁾</i> | SP1952 | <i>cylI</i> | Hypothetical protein, <i>cylI</i> immunity domain protein | 1,89E-06 | 6,87 |
| <i>spr1770⁶⁾</i> | SP1953 | <i>cylB</i> | ABC transporter ATP-binding/membrane-spanning - hemolysin secretion protein | 2,44E-04 | 6,06 |
| <i>spr1771⁶⁾</i> | SP1955 | <i>nisP</i> | Subtilisin-like serine protease | 2,85E-06 | 3,43 |
| <i>spr1772⁶⁾</i> | SP1956 | - | Hypothetical protein, membrane protein, truncation | 4,37E-05 | 3,84 |
| <i>spr1774⁶⁾</i> | SP1958 | - | Hypothetical protein | 9,49E-04 | 2,40 |
| <i>spr1786</i> | SP1971 | - | Hypothetical protein | 2,06E-05 | 0,24 |
| <i>spr1831</i> | - | - | putative ATP binding domain, truncation | 5,20E-05 | 0,30 |
| <i>spr1834</i> | SP2022 | <i>ptcC</i> | Phosphotransferase system system, cellobiose-specific IIC component | 3,97E-04 | 0,49 |
| <i>spr1856</i> | - | - | Hypothetical protein, putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 1,64E-07 | 0,30 |
| <i>spr1857</i> | - | - | Hypothetical protein, putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 1,68E-06 | 0,34 |
| <i>spr1861⁵⁾</i> | SP2050 | <i>cglD</i> | Competence protein | 3,59E-05 | 0,22 |
| <i>spr1862⁵⁾</i> | SP2051 | <i>cglC</i> | Competence protein | 2,27E-08 | 0,25 |
| <i>spr1863⁵⁾</i> | SP2052 | <i>cglB</i> | Competence protein | 5,26E-08 | 0,23 |
| <i>spr1864⁵⁾</i> | SP2053 | <i>cglA</i> | Competence protein | 1,74E-05 | 0,37 |
| <i>spr1878</i> | SP2066 | <i>thrC</i> | Threonine synthase | 1,18E-05 | 2,03 |
| <i>spr1879</i> | SP2067 | - | Hypothetical protein, Gamma-glutamylcysteine synthetase-like | 4,88E-05 | 2,51 |
| <i>spr1885</i> | SP2073 | - | ABC transporter ATP-binding/membrane spanning protein - unknown substrate | 2,16E-04 | 2,33 |
| <i>spr1887</i> | SP2075 | - | ABC transporter ATP-binding/membrane spanning protein - unknown substrate | 4,22E-03 | 2,08 |
| <i>spr1902</i> | SP2091 | <i>gpdA</i> | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+] | 7,51E-06 | 2,11 |
| <i>spr1907</i> | SP2097 | <i>dapD</i> | 2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase-related protein | 2,23E-05 | 2,26 |
| <i>spr1920</i> | SP2110 | <i>malD</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - maltose/maltodextrin | 7,45E-03 | 2,05 |
| <i>spr1923</i> | SP2113 | - | ABC transporter, ATP and permease component | 7,48E-04 | 2,40 |
| <i>spr1928</i> | SP2118 | - | Hypothetical protein | 2,70E-04 | 2,04 |
| <i>spr1940</i> | SP2131 | - | transcriptional regulator, BglG family | 2,85E-05 | 0,46 |
| <i>spr1993</i> | SP2188 | <i>hsp33</i> | Chaperonin (heat shock protein 33) | 1,98E-07 | 2,85 |

| | | | | | |
|------------------------------|--------|----------------|---|----------|------|
| <i>spr1995</i> | SP2190 | <i>pspC</i> | Choline binding protein A | 6,99E-07 | 3,75 |
| <i>spr1996</i> | SP2191 | - | Conserved hypothetical protein, putative isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase | 7,08E-06 | 2,35 |
| <i>spr1997</i> | SP2192 | <i>hk06</i> | Histidine kinase | 1,73E-05 | 2,06 |
| <i>spr1998</i> | SP2193 | <i>rr06</i> | Response regulator | 8,52E-06 | 2,29 |
| <i>spr1999</i> | SP2194 | <i>clpC</i> | Class III stress response-related ATPase, truncation | 6,57E-05 | 2,23 |
| <i>spr2000</i> | SP2194 | <i>clpC</i> | Class III stress response-related ATPase, truncation | 5,18E-06 | 2,22 |
| <i>spr2001</i> | SP2195 | <i>ctsR</i> | Transcriptional regulator CtsR | 8,24E-04 | 2,77 |
| <i>spr2012</i> ⁵⁾ | SP2207 | <i>comFC</i> | Involved in transformation (competence for DNA uptake) | 3,59E-08 | 0,30 |
| <i>spr2013</i> ⁵⁾ | SP2208 | <i>comFA</i> | Involved in transformation; required for DNA uptake but not for binding; Related to ATP-dependent RNA/DNA helicases | 7,53E-04 | 0,45 |
| <i>spr2014</i> | SP2209 | - | Conserved hypothetical protein | 1,93E-04 | 2,20 |
| <i>spr2021</i> | SP2216 | <i>gsp-781</i> | General stress protein GSP-781 | 1,84E-03 | 2,56 |
| <i>spr2041</i> ⁵⁾ | SP2235 | <i>comE</i> | Response regulator | 8,69E-07 | 0,14 |
| <i>spr2042</i> ⁵⁾ | SP2236 | <i>comD</i> | Histidine protein kinase | 1,53E-07 | 0,36 |
| <i>spr2043</i> ⁵⁾ | SP2237 | <i>comC</i> | Competence stimulating peptide precursor (CSP) | 2,16E-05 | 0,17 |
| <i>spr2045</i> ⁵⁾ | SP2239 | <i>sphtra</i> | Serine protease | 1,18E-07 | 0,41 |
| <i>spr2046</i> ⁵⁾ | SP2240 | <i>spo0J</i> | Chromosome segregation protein | 1,90E-06 | 0,48 |

¹⁾ Annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); ³⁾ Bezeichnung charakterisierter Gene; ⁴⁾ Transkriptmengenverhältnis von P506 zu R6; ⁵⁾ Gene des Kompetenzregulons; ⁶⁾ Gene des *cyl*-Clusters; ⁷⁾ Gene des *ytrA*-Clusters

7.6 Das Transkriptom von R6Δ*cpoA* bei einer Zelldichte von N=40

Tabelle 7.6: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in R6Δ*cpoA*

| Gennummer R6 ¹⁾ | Gennummer TIGR4 ²⁾ | Gen ³⁾ | Funktion/Domänen | P-Wert | Transkriptverhältnis [Mutante/R6] ⁴⁾ |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------|---|----------|---|
| <i>spr0013</i> ⁵⁾ | SP2006 | <i>comX</i> | Alternative sigma factor ComX | 8,33E-10 | 0,09 |
| <i>spr0020</i> ⁵⁾ | SP0018 | <i>comW</i> | positive factor involved in competence | 1,33E-09 | 0,09 |
| <i>spr0023</i> ⁵⁾ | SP0021 | <i>dut</i> | Deoxyuridinetriphosphatase | 1,06E-05 | 0,47 |
| <i>spr0025</i> | - | <i>radA</i> | DNA repair: sensitivity to gamma and UV radiation | 4,86E-06 | 0,45 |
| <i>spr0030</i> ⁵⁾ | SP0029 | - | Hypothetical protein | 1,28E-05 | 0,14 |
| <i>spr0031</i> ⁵⁾ | SP0031 | - | Hypothetical protein | 1,06E-07 | 0,12 |
| <i>spr0040</i> | SP0041 | <i>blpU</i> | Amphipathic pore-forming peptide precursor | 8,42E-07 | 0,25 |
| <i>spr0043</i> ⁵⁾ | SP0042 | <i>comA</i> | Transport ATP-binding protein ComA | 4,50E-09 | 0,08 |
| <i>spr0105</i> | - | - | Bacteriocin transporter, peptidase c39 family, truncation | 4,61E-05 | 2,64 |
| <i>spr0108</i> | - | - | Conserved hypothetical protein, <i>comB</i> homologue | 5,85E-04 | 2,23 |
| <i>spr0127</i> ⁵⁾ | SP0124 | <i>cibB</i> | Competence induced bacteriocin B | 5,46E-04 | 0,25 |
| <i>spr0128</i> ⁵⁾ | SP0125 | <i>cibA</i> | Competence induced bacteriocin A | 7,76E-07 | 0,13 |
| <i>spr0181</i> | - | <i>orf47</i> | orf47 protein | 1,09E-05 | 0,47 |
| <i>spr0276</i> | SP0303 | <i>bglA</i> | 6-phospho-beta-glucosidase | 1,21E-09 | 0,20 |
| <i>spr0277</i> | SP0304 | - | Conserved hypothetical protein, truncation, MtN3_slv domain | 1,26E-07 | 0,19 |
| <i>spr0278</i> | SP0305 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIb component | 8,03E-09 | 0,25 |

| | | | | | |
|---------------------------------|--------|---------------|---|----------|------|
| <i>spr0279</i> | SP0306 | <i>bglG</i> | Transcription antiterminator BglG family | 3,11E-09 | 0,33 |
| <i>spr0280</i> | SP0308 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIa component | 4,26E-08 | 0,41 |
| <i>spr0281</i> | SP0309 | - | Hypothetical protein | 7,11E-06 | 0,42 |
| <i>spr0282</i> | SP0310 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIc component | 1,25E-04 | 0,43 |
| <i>spr0388</i> | SP0429 | - | Hypothetical protein | 6,24E-08 | 0,19 |
| <i>spr0389</i> | SP0430 | - | Hypothetical protein | 3,16E-07 | 0,19 |
| <i>spr0405</i> | SP0449 | - | Hypothetical protein | 5,76E-04 | 2,10 |
| <i>spr0446</i> | SP0507 | - | Putative type I restriction enzyme, truncation | 5,64E-08 | 0,49 |
| <i>spr0461</i> | SP0524 | <i>blpT</i> | Hypothetical protein | 4,27E-05 | 0,32 |
| <i>spr0465</i> | SP0528 | <i>blpC</i> | Bacteriocin-like peptide, double glycine cleavage type | 2,22E-06 | 0,25 |
| <i>spr0466</i> ⁵⁾ | SP0529 | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 1,17E-06 | 0,31 |
| <i>spr0467</i> ⁵⁾ | SP0529 | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 7,89E-08 | 0,16 |
| <i>spr0468</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 3,11E-08 | 0,21 |
| <i>spr0469</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 1,57E-09 | 0,06 |
| <i>spr0470</i> | SP0541 | <i>blpO</i> | Hypothetical protein | 1,25E-08 | 0,11 |
| <i>spr0471</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,27E-07 | 0,12 |
| <i>spr0472</i> ⁵⁾ | SP0545 | <i>blpY</i> | BlpY immunity protein | 6,53E-11 | 0,06 |
| <i>spr0473</i> ⁵⁾ | SP0546 | <i>blpZ</i> | BlpZ protein | 7,96E-10 | 0,13 |
| <i>spr0474</i> ⁵⁾ | SP0547 | <i>pncP</i> | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 3,44E-09 | 0,07 |
| <i>spr0561</i> | SP0641 | <i>prtA</i> | Cell wall-associated serine proteinase precursor PrtA | 4,11E-08 | 2,52 |
| <i>spr0613</i> | SP0701 | <i>pyrF</i> | Orotidine-5'-decarboxylase | 8,50E-06 | 0,49 |
| <i>spr0614</i> | SP0702 | <i>pyrE</i> | Orotate phosphoribosyltransferase | 8,16E-06 | 0,44 |
| <i>spr0639</i> | SP0727 | <i>copY</i> | COPAB ATPases metal-fist type repressor | 4,04E-06 | 2,77 |
| <i>spr0640</i> | SP0728 | - | Conserved hypothetical protein | 2,23E-07 | 2,52 |
| <i>spr0641</i> | SP0729 | <i>ctpA</i> | P-type ATPase - probable copper transporter | 1,68E-05 | 2,39 |
| <i>spr0690</i> ⁵⁾ | SP0782 | - | Conserved hypothetical protein | 3,07E-07 | 0,38 |
| <i>spr0856</i> ⁵⁾ | SP0954 | <i>celA</i> | Competence protein | 1,65E-07 | 0,12 |
| <i>spr0857</i> ⁵⁾ | SP0955 | <i>celB</i> | Competence protein | 1,49E-09 | 0,12 |
| <i>spr0858</i> ⁵⁾ | SP0956 | - | Hypothetical protein | 7,66E-09 | 0,22 |
| <i>spr0859</i> ⁵⁾ | SP0957 | - | Hypothetical protein, ATP binding domain | 2,06E-04 | 0,33 |
| <i>spr0860</i> ⁵⁾ | SP0958 | - | Hypothetical protein, putative permease | 3,30E-05 | 0,39 |
| <i>spr0865</i> | SP0963 | <i>pyrDII</i> | Dihydroorotate dehydrogenase electron transfer subunit | 2,02E-06 | 0,47 |
| <i>spr0866</i> | SP0964 | <i>pyrD</i> | Dihydroorotate dehydrogenase | 3,84E-06 | 0,31 |
| <i>spr0881</i> ⁵⁾ | SP0978 | <i>coiA</i> | Competence protein | 3,86E-08 | 0,10 |
| <i>spr0996</i> ⁵⁾ | SP1088 | <i>radC</i> | DNA repair protein | 1,61E-06 | 0,39 |
| <i>spr1017</i> ⁵⁾ | SP1110 | <i>mreA</i> | Macrolide-efflux protein | 3,77E-05 | 0,50 |
| <i>spr1143</i> | SP1265 | - | Hypothetical protein | 3,63E-05 | 0,40 |
| <i>spr1144</i> ⁵⁾ | SP1266 | <i>smf</i> | DNA processing Smf protein | 1,73E-08 | 0,09 |
| <i>spr1154</i> | SP1276 | <i>carA</i> | Carbamoylphosphate synthase (glutamine-hydrolysing) light subunit | 1,85E-05 | 0,47 |
| <i>spr1452</i> | - | - | Hypothetical protein, similar nt sequence to rup | 3,29E-04 | 0,45 |
| <i>spr1558</i> ^{5) 7)} | SP1714 | <i>ytrA</i> | Transcription regulator GntR-like | 1,23E-07 | 3,51 |
| <i>spr1559</i> ^{5) 7)} | SP1715 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 4,89E-10 | 3,06 |
| <i>spr1560</i> ^{5) 7)} | SP1715 | - | Hypothetical protein, putative permease | 1,56E-05 | 2,87 |
| <i>spr1628</i> | SP1808 | <i>pilD</i> | Type 4 prepilin peptidase | 1,00E-09 | 0,23 |
| <i>spr1672</i> | SP1857 | <i>czcD</i> | Cation diffusion facilitator transporter - heavy metal transport | 5,94E-08 | 3,91 |

| | | | | | |
|------------------------------|--------|-------------|--|----------|------|
| <i>spr1684</i> | SP1869 | <i>fatD</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - ferric iron transport | 1,32E-05 | 0,37 |
| <i>spr1685</i> | SP1870 | <i>fatC</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - ferric iron transport | 4,46E-09 | 0,36 |
| <i>spr1686</i> | SP1871 | <i>fecE</i> | ABC transporter ATP-binding protein - ferric iron transport | 4,35E-09 | 0,29 |
| <i>spr1724</i> ⁵⁾ | SP1540 | <i>ssbB</i> | Single-stranded DNA-binding protein | 7,96E-07 | 0,11 |
| <i>spr1755</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,08E-05 | 0,48 |
| <i>spr1756</i> ⁵⁾ | SP1939 | <i>dinF</i> | DNA-damage-inducible protein | 7,37E-07 | 0,33 |
| <i>spr1757</i> ⁵⁾ | SP1940 | <i>recA</i> | DNA recombination/repair | 1,71E-05 | 0,34 |
| <i>spr1758</i> ⁵⁾ | SP1941 | <i>cinA</i> | Competence induced protein | 5,49E-08 | 0,15 |
| <i>spr1762</i> ⁵⁾ | SP1945 | <i>comM</i> | Hypothetical protein | 8,26E-05 | 0,39 |
| <i>spr1763</i> ⁶⁾ | SP1946 | <i>plcR</i> | Transcriptional activator, Xre family | 3,38E-05 | 2,61 |
| <i>spr1764</i> ⁶⁾ | SP1947 | - | Hypothetical protein | 3,02E-09 | 6,52 |
| <i>spr1765</i> ⁶⁾ | SP1948 | - | Hypothetical protein | 1,42E-03 | 2,24 |
| <i>spr1766</i> ⁶⁾ | SP1949 | - | Hypothetical protein | 1,82E-05 | 2,85 |
| <i>spr1767</i> ⁶⁾ | SP1950 | <i>cylM</i> | CylM protein, cytolytic toxin system | 1,87E-08 | 8,15 |
| <i>spr1768</i> ⁶⁾ | SP1951 | - | Conserved hypothetical protein, WrbA like | 8,76E-06 | 7,59 |
| <i>spr1769</i> ⁶⁾ | SP1952 | <i>cylI</i> | Hypothetical protein, CylI immunity domain protein | 5,36E-07 | 7,78 |
| <i>spr1770</i> ⁶⁾ | SP1953 | <i>cylB</i> | ATP-binding/membrane-spanning protein; hemolysin secretion protein | 8,72E-07 | 8,41 |
| <i>spr1771</i> ⁶⁾ | SP1955 | <i>nisP</i> | Subtilisin-like serine protease | 9,18E-07 | 4,37 |
| <i>spr1772</i> ⁶⁾ | SP1956 | - | Hypothetical protein, membrane protein, truncation | 1,82E-07 | 4,21 |
| <i>spr1773</i> ⁶⁾ | SP1957 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 6,68E-09 | 4,42 |
| <i>spr1774</i> ⁶⁾ | SP1958 | - | Hypothetical protein | 1,54E-09 | 2,06 |
| <i>spr1826</i> ⁵⁾ | SP2013 | - | Conserved hypothetical protein, putative permease | 2,47E-08 | 0,40 |
| <i>spr1829</i> ⁵⁾ | SP2016 | <i>nadC</i> | Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase | 2,67E-09 | 0,34 |
| <i>spr1830</i> ⁵⁾ | SP2017 | - | Conserved hypothetical protein | 3,32E-05 | 0,48 |
| <i>spr1831</i> | - | - | Putative ATP binding domain, truncation | 3,67E-06 | 0,26 |
| <i>spr1856</i> | - | - | Putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 6,87E-08 | 0,11 |
| <i>spr1857</i> | - | - | Putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 4,67E-07 | 0,11 |
| <i>spr1858</i> ⁵⁾ | SP2047 | - | Hypothetical protein | 1,42E-06 | 0,08 |
| <i>spr1859</i> ⁵⁾ | SP2048 | - | Conserved hypothetical protein, N-terminal methylation motif | 2,87E-07 | 0,08 |
| <i>spr1861</i> ⁵⁾ | SP2050 | <i>cglD</i> | Competence protein | 7,31E-07 | 0,07 |
| <i>spr1862</i> ⁵⁾ | SP2051 | <i>cglC</i> | Competence protein | 3,38E-07 | 0,16 |
| <i>spr1863</i> ⁵⁾ | SP2052 | <i>cglB</i> | Competence protein | 8,03E-08 | 0,07 |
| <i>spr1864</i> ⁵⁾ | SP2053 | <i>cglA</i> | Competence protein | 3,69E-07 | 0,07 |
| <i>spr1895</i> | SP2084 | <i>pstS</i> | ABC transporter substrate-binding protein - phosphate transport | 3,79E-06 | 2,90 |
| <i>spr1945</i> | SP2136 | <i>pcpA</i> | Choline-binding protein | 2,35E-04 | 2,03 |
| <i>spr1968</i> | SP2162 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIc component | 1,11E-06 | 2,03 |
| <i>spr1969</i> | SP2163 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIb component | 8,99E-06 | 2,69 |
| <i>spr1971</i> | SP2165 | <i>fucU</i> | Fucose pathway protein, function unknown | 1,46E-07 | 2,87 |
| <i>spr1972</i> | SP2166 | <i>fucA</i> | L-fuculose phosphate aldolase | 2,70E-06 | 3,73 |
| <i>spr1973</i> | SP2167 | <i>fcsK</i> | Fucose kinase | 1,24E-04 | 2,56 |
| <i>spr1987</i> | SP2183 | - | Hypothetical protein, truncation | 1,01E-05 | 3,23 |
| <i>spr1988</i> | SP2184 | <i>glpF</i> | Glycerol uptake facilitator protein | 1,30E-07 | 2,89 |

| | | | | | |
|------------------------------|--------|--------------|---|----------|------|
| <i>spr1989</i> | SP2185 | <i>glpD</i> | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation | 3,26E-06 | 2,75 |
| <i>spr1990</i> | SP2185 | <i>glpD</i> | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation | 1,85E-07 | 2,48 |
| <i>spr1991</i> | SP2186 | <i>glpK</i> | Glycerol kinase | 1,75E-11 | 3,45 |
| <i>spr2006</i> ⁵⁾ | SP2201 | <i>cbpD</i> | Choline binding protein D | 5,36E-07 | 0,09 |
| <i>spr2012</i> ⁵⁾ | SP2207 | <i>comFC</i> | Involved in transformation (competence for DNA uptake) | 4,26E-07 | 0,08 |
| <i>spr2013</i> ⁵⁾ | SP2208 | <i>comFA</i> | Required for DNA uptake; related to ATP-dependent RNA/DNA helicases | 5,93E-07 | 0,19 |
| <i>spr2041</i> ⁵⁾ | SP2235 | <i>comE</i> | Response regulator | 2,92E-05 | 0,22 |
| <i>spr2042</i> ⁵⁾ | SP2236 | <i>comD</i> | Histidine protein kinase | 3,56E-11 | 0,05 |
| <i>spr2043</i> ⁵⁾ | SP2237 | <i>comC</i> | Competence stimulating peptide precursor (CSP) | 3,26E-09 | 0,05 |

¹⁾ Annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); ³⁾ Bezeichnung charakterisierter Gene; ⁴⁾ Transkriptmengenverhältnis von R6Δ*cpoA* zu R6; ⁵⁾ Gene des Kompetenzregulons; ⁶⁾ Gene des *cyl*-Clusters; ⁷⁾ Gene des *ytrA*-Clusters

7.7 Sequenz des Bereichs upstream des TCS11-Clusters in P406 und P506

```

accaaggtgtcgcaggttcgaatcctgtcttcccagattcaTGGCGGTGTAGCTCAGCTGGCTAGAGCGTCCGGTTCATACCCGGGAGGTCGGGGTTCGA
>>.....pro2.....>>.....met3.....>>
TCCCCTTCGCCGTATAATGATCTTGTCCGACCTTTAGCTCAGCTGGTTAGAGCTCTCGGCTCATAACCGAGTGGTCGTAGGTTCAAGTCTTACAAGGTC
>.....>>.....met2.....>>
CATTTGAATATTGGAGGATTACCCAAGTCCGGCTGAAGGGAACGGTCTTGAAAACCGTCAGGCGGTGAAAAGCGTGCCTGGGTTCCAATCCACATCCTC
>>.....ser3.....>>
CTTTTATATTATTAACGCGGGATGGAGCAGCTCGGTAGCTCGTCCGGCTCATAACCCGAAGTCTAGGTTCAAATCCTGCTCCCGCAATAAGGCTCGGT
>>.....met1.....>>.....>>.....>>
AGCTCAGTTGGTAGACCAATGGATTGAAGCTCCATGTGTGGCGGTTTCGATTCGGTCTCGCGCCATTTATTGATAGTATTTATCGCGGTTAGTTTGTAGT
>.....phe1.....>>.....>>
GGTAAACTACAGCCTTCCAAGTGTGTGTCGCGAGTTCGATTCTCGTCACCCGCTTGAACCTTGTTCAAATTACCAAGTTTTTAACTTGGGCGCGTAG
>.....gly1.....>>.....>>
CTCAGGTGGTTAGAGCGCACGCCTGATAAGCGTGAGGTCGGTGGTTCGAGTCCACTCGTCCCATTAATTGGAGAATTACTCAAGAGGCTGAAGAGgaca
>.....ile1.....>>.....ser2'.....>>
gaagcttctgcctcctctgattttaaagactataattgtagatgaaatgggggaagaagagatgagaaataaatgattattgcaatgagtttagtag
>>.....smp11a.....>>
tagcaggagttatgacctatctcatgttttcgggattggatgaggatttctaccatttctccttggaaaggtcttctgctggctttggaatcatgtcttgct
>.....smp11a.....>>
tgtagagaaggtttgaaattagtcagagatgtgaaaaaggagtttgaggaatgaagagaggatcatctatttctttatcggcctgtcactcttggtat
>.....smp11a.....>>
>>.....smp11b.....>>
ggtagtggaatgtttactgattggtttgatcaagccttgcctcgccaatcatttgggtgctttggggtttgattatgatttctgctgttttccc
>.....smp11b.....>>
tatgggaatggagtggttgaaaggagagtcctcatgactgtggttaaagttgaaaaattgagtaaga
>.....smp11b.....>>
>>.....nbp11'.....>>

```

Abbildung 7.1: Sequenz upstream des TCS11-Clusters in P406. Dargestellt wurde die DNA-Sequenz des Genoms von Mutante P406 upstream des TCS11-Clusters. Die Sequenz von tRNA-Genen und die für Proteine kodierenden Bereiche wurden grün markiert. Nukleotide in Großbuchstaben geben die in P406 im Bereich upstream des TCS11-Clusters veränderte Sequenz wieder.

```

accaaggtgtcgcaggttcgaatcctgtcttccccgattcaTGGCGGTGTAGCTCAGCTGGCTAGAGCGTCCGGTTCATACCCGGGAGGTCGGGGTTCGA
>>.....pro2.....>>                >>.....met3.....>
TCCCCTTCGCCGCTATAATGATCTTGTCCGACCTTTAGCTCAGCTGGTTAGAGCTCTCGGCTCATAACCGAGTGGTCGTTAGGTTCAAGTCTACAAGGTC
>.....>>                >>.....met2.....>
CATTTGAATATTGGAGGATTACCCAAGTCCGGCTGAAGGGAACGGTCTTGA AACCCGTCAGGCGGTGTA AAAAGCGTGC GTGGGTTCGAATCCCACATCTCTC
>>                >>.....ser3.....>
CTTTTATATTATTAAACGCGGATGGAGCAGCTCGGTAGCTCGTCGGGCTCATAACCCGAAGGTCGTTAGGTTCAAATCCTGCTCCCGCAATAAGGCTCGGT
>>                >>.....met1.....>>                >>.....>
AGCTCAGTTGGTAGAGCAATGGATTGAAGTCCATGTGTCCGGGTTGCGATTCCGCTCTCGCGCCATTTATTGATAGTATTATGCGGGGTAGATTAGT
>.....phe1.....>>                >>.....>
GGTAAACTACAGCCTTCCAAGCTGTGTGCGGAGTTCGATTCTCGTCACCCGCTTTGAACTTTGTTCAAATTACCAAGTTTTTAACTGGGCGCGTAG
>.....gly1.....>>                >>.....>
CTCAGGTGGTTAGAGCGCACGCCTGATAAGCGTGAGGTCGGTGGTTCGAGTCCACTCGTGCCATTAATTGGAGAATTACTCAAGAGGCTGAAGAGGACG
>.....ile1.....>>                >>.....>
GTTTGCTAAATCGTTAGGTCGGGTAAGTGGCGCAAGGTTCAATCCCTTATTCTCCGTTTTAATGAGAGTTTGAAGTCTCTTTTTTATTATTAGAGAC
>.....ser2.....>>
AATAAAGCTTCAGATCCGTA AAAACTTAATTGAATTACTAATCTGAAGTATTTTTATGGCTCTTGTCAACTGTAGTGGGTTGAAGAAAAGCTAAGCTCG
AGAAAGGACAAATTCGTCCTTCTTTTTGGCTCTTTGTCAACTGTAGTGGGTTGAAAAAAGCTAAGCTCGAGAAAGGACAAATTTGTCTTTCTTT
<<.....<<
TTTGATGTTCAAAGCGATAAAAATCCTTTTTTGAAGTTTCAAAGTTCGAAATCCAAGGCGTTTCGTTTGATAAGTTTGATGAGATTATTGTGCTG
<.....IS1167trunc'.....<
TCCAGTTGGCGTTAGAATAGTGTAGggagtggttgaaggagaggtotcatgactgtggttaaagttgaaaaattgagtaaga
<.....<<>>.....'smp11b.....>>
>>.....nbp11'.....>>

```

Abbildung 7.2: Sequenz upstream des TCS11-Cluster in P506. Dargestellt wurde die DNA-Sequenz des Genoms von Mutante P506 upstream des TCS11-Clusters. Die Sequenz von tRNA-Genen und die für Proteine kodierenden Bereiche wurden grün markiert. Nukleotide in Großbuchstaben geben die schon in P406 im Bereich upstream des TCS11-Clusters veränderte Sequenz wieder. Unterstrichene Nukleotide in Großbuchstaben zeigen die in P506 zusätzlich veränderte Sequenz an.

7.8 Das Transkriptom von P406 Δ kin11reg11 bei einer Zelldichte von N=40

Tabelle 7.7: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in P406 Δ kin11reg11

| Gennummer R6 ¹⁾ | Gennummer TIGR ²⁾ | Gen ³⁾ | Funktion/Domänen | P-Wert | Transkriptverhältnis [Mutante/R6] ⁴⁾ |
|----------------------------|------------------------------|-------------------|---|----------|---|
| spr0013 ⁵⁾ | SP2006 | comX | Alternative sigma factor ComX | 6,31E-10 | 0,15 |
| spr0020 ⁵⁾ | SP0018 | comW | positive factor involved in competence | 3,77E-10 | 0,08 |
| spr0030 ⁵⁾ | SP0029 | - | Hypothetical protein | 2,44E-07 | 0,13 |
| spr0031 ⁵⁾ | SP0031 | - | Hypothetical protein | 2,00E-08 | 0,10 |
| spr0043 ⁵⁾ | SP0042 | comA | Transport ATP-binding protein ComA | 2,25E-07 | 0,13 |
| spr0085 | SP0096 | - | Hypothetical protein | 2,79E-06 | 0,48 |
| spr0097 | SP0114 | - | Hypothetical protein | 9,67E-05 | 0,45 |
| spr0098 | SP0109 | - | Hypothetical protein, putative bacteriocin | 4,33E-08 | 0,25 |
| spr0099 | SP0110 | - | ABC transporter membrane-spanning permease - aa transport | 2,57E-07 | 0,04 |

| | | | | | |
|-----------------------------|---------------|---------------|---|----------|------|
| <i>spr0101</i> | <i>SP0112</i> | - | ABC transporter solute-binding protein - aa transport | 3,11E-05 | 0,28 |
| <i>spr0102</i> | - | <i>argG</i> | Argininosuccinate synthase | 6,83E-05 | 0,16 |
| <i>spr0104</i> | <i>SP0108</i> | - | Hypothetical protein, HTH-XRE-domain | 2,94E-05 | 0,41 |
| <i>spr0105</i> | - | - | Bacteriocin transporter, peptidase c39 family, truncation | 5,09E-05 | 0,42 |
| <i>spr0106</i> | - | - | Putative bacteriocin transporter, truncation | 4,48E-05 | 0,42 |
| <i>spr0110</i> | <i>SP0108</i> | - | Hypothetical protein | 5,85E-05 | 0,38 |
| <i>spr0127⁵⁾</i> | <i>SP0124</i> | <i>cibB</i> | Competence induced bacteriocin B | 8,81E-05 | 0,31 |
| <i>spr0128⁵⁾</i> | <i>SP0125</i> | <i>cibA</i> | Competence induced bacteriocin A | 8,89E-05 | 0,14 |
| <i>spr0181</i> | - | <i>orf47</i> | orf47 protein | 1,61E-05 | 0,40 |
| <i>spr0251</i> | <i>SP0274</i> | <i>polC</i> | DNA polymerase III, alpha subunit | 5,54E-05 | 0,47 |
| <i>spr0262⁵⁾</i> | <i>SP0285</i> | <i>adhP</i> | Alcohol dehydrogenase, propanol-preferring. | 8,76E-05 | 0,43 |
| <i>spr0264⁵⁾</i> | <i>SP0287</i> | - | Conserved hypothetical protein, xanthine uracil permease family | 1,35E-07 | 2,71 |
| <i>spr0277</i> | <i>SP0304</i> | - | Conserved hypothetical protein, truncation, MtN3_slv domain | 4,51E-06 | 0,28 |
| <i>spr0278</i> | <i>SP0305</i> | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIb component | 9,33E-07 | 0,17 |
| <i>spr0279</i> | <i>SP0306</i> | <i>bglG</i> | Transcription antiterminator BglG family | 2,12E-07 | 0,19 |
| <i>spr0280</i> | <i>SP0308</i> | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIa component | 1,38E-06 | 0,41 |
| <i>spr0281</i> | <i>SP0309</i> | - | Hypothetical protein | 4,14E-04 | 0,30 |
| <i>spr0282</i> | <i>SP0310</i> | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIC component | 7,86E-05 | 0,29 |
| <i>spr0310</i> | <i>SP0342</i> | <i>dexB</i> | Alpha, 1-6-glucosidase | 3,76E-06 | 0,42 |
| <i>spr0311</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,32E-04 | 0,38 |
| <i>spr0388</i> | <i>SP0429</i> | - | Hypothetical protein | 1,40E-06 | 0,32 |
| <i>spr0389</i> | <i>SP0430</i> | - | Hypothetical protein | 2,70E-06 | 0,36 |
| <i>spr0402</i> | <i>SP0446</i> | <i>ilvN</i> | Acetolactate synthase small subunit | 9,11E-06 | 2,71 |
| <i>spr0403</i> | <i>SP0447</i> | <i>ilvC</i> | Ketol-acid reductoisomerase | 5,31E-05 | 2,42 |
| <i>spr0404</i> | <i>SP0448</i> | - | Hypothetical protein | 6,47E-05 | 2,05 |
| <i>spr0601</i> | <i>SP0686</i> | - | Conserved hypothetical protein | 1,16E-05 | 0,47 |
| <i>spr0627</i> | <i>SP0715</i> | <i>lctO</i> | Lactate oxidase | 2,58E-03 | 0,50 |
| <i>spr0668</i> | <i>SP0758</i> | <i>ptsG</i> | PTS glucose-specific enzyme EIIabc component | 7,33E-06 | 0,42 |
| <i>spr0690⁵⁾</i> | <i>SP0782</i> | - | Conserved hypothetical protein | 3,98E-06 | 0,41 |
| <i>spr0813</i> | <i>SP0913</i> | - | ABC transporter membrane-spanning permease-unknown substrate | 2,94E-03 | 0,48 |
| <i>spr0856⁵⁾</i> | <i>SP0954</i> | <i>celA</i> | Competence protein | 2,79E-05 | 0,20 |
| <i>spr0857⁵⁾</i> | <i>SP0955</i> | <i>celB</i> | Competence protein | 9,34E-07 | 0,22 |
| <i>spr0858⁵⁾</i> | <i>SP0956</i> | - | Hypothetical protein | 3,57E-07 | 0,39 |
| <i>spr0859⁵⁾</i> | <i>SP0957</i> | - | Hypothetical protein, ATP binding domain | 1,68E-05 | 0,21 |
| <i>spr0881⁵⁾</i> | <i>SP0978</i> | <i>coiA</i> | Competence protein | 1,68E-08 | 0,11 |
| <i>spr0987</i> | <i>SP1582</i> | <i>IS1167</i> | Degenerate transposase (orf1) | 9,11E-05 | 0,35 |
| <i>spr0996⁵⁾</i> | <i>SP1088</i> | <i>radC</i> | DNA repair protein | 8,99E-06 | 0,31 |
| <i>spr1017⁵⁾</i> | <i>SP1110</i> | <i>mreA</i> | Macrolide-efflux protein | 1,11E-05 | 0,26 |
| <i>spr1018</i> | <i>SP1111</i> | - | Conserved hypothetical protein | 7,85E-08 | 0,41 |
| <i>spr1029</i> | <i>SP1121</i> | <i>glgB</i> | 1,4-alpha-glucan branching enzyme | 5,34E-05 | 0,40 |

| | | | | | |
|---------------------------------|--------|-------------|--|----------|-------|
| <i>spr1096</i> | - | <i>metY</i> | O-acetylhomoserine sulfhydrylase, truncation | 3,13E-04 | 0,46 |
| <i>spr1097</i> | SP1215 | <i>nirC</i> | Formate-nitrate transporter | 3,31E-04 | 0,29 |
| <i>spr1144</i> ⁵⁾ | SP1266 | <i>smf</i> | DNA processing Smf protein | 3,38E-08 | 0,07 |
| <i>spr1334</i> | SP1480 | - | Hypothetical protein | 1,04E-09 | 0,27 |
| <i>spr1379</i> | SP1839 | - | ABC transporter, truncation | 7,77E-06 | 2,05 |
| <i>spr1435</i> | SP1577 | <i>apt</i> | Adenine phosphoribosyltransferase | 9,13E-04 | 0,43 |
| <i>spr1436</i> | SP1578 | - | Conserved hypothetical protein | 8,03E-05 | 0,28 |
| <i>spr1437</i> | SP1580 | <i>msmK</i> | ABC transporter ATP-binding protein-multiple sugar transport | 2,41E-06 | 0,31 |
| <i>spr1452</i> | - | - | Hypothetical protein, similar nt sequence to rup | 1,38E-05 | 0,42 |
| <i>spr1558</i> ^{5) 7)} | SP1714 | <i>ytrA</i> | Transcription regulator GntR-like | 5,69E-06 | 2,93 |
| <i>spr1562</i> ⁵⁾ | SP1717 | <i>natA</i> | ABC transporter ATP-binding protein - Na ⁺ export | 7,13E-09 | 0,49 |
| <i>spr1628</i> ⁵⁾ | SP1808 | <i>pilD</i> | Type 4 prepilin peptidase | 8,68E-08 | 0,19 |
| <i>spr1644</i> | SP1825 | - | ABC transporter ATP-binding protein-unknown substrate | 9,05E-04 | 0,48 |
| <i>spr1645</i> | SP1826 | - | ABC transporter substrate-binding protein-unknown substrate | 5,85E-05 | 0,34 |
| <i>spr1646</i> | SP1827 | - | Conserved hypothetical protein | 1,46E-05 | 0,32 |
| <i>spr1648</i> | SP1829 | <i>galT</i> | Galactose-1-phosphate uridylyltransferase | 2,10E-05 | 0,43 |
| <i>spr1649</i> | SP1830 | - | Putative transcriptional regulator (<i>phoU</i> like) | 1,99E-05 | 0,36 |
| <i>spr1652</i> | SP1833 | - | Hypothetical protein | 6,96E-05 | 0,29 |
| <i>spr1698</i> | SP1883 | <i>dexS</i> | Dextran glucosidase | 7,98E-10 | 0,04 |
| <i>spr1699</i> | SP1884 | <i>treP</i> | Phosphotransferase system, trehalose-specific IIbc component | 3,83E-09 | 0,10 |
| <i>spr1724</i> ⁵⁾ | SP1540 | <i>ssbB</i> | Single-stranded DNA-binding protein | 5,81E-06 | 0,17 |
| <i>spr1755</i> | - | - | Hypothetical protein | 6,71E-08 | 0,40 |
| <i>spr1756</i> ⁵⁾ | SP1939 | <i>dinF</i> | DNA-damage-inducible protein | 5,43E-06 | 0,34 |
| <i>spr1757</i> ⁵⁾ | SP1940 | <i>recA</i> | DNA recombination/repair | 4,02E-06 | 0,35 |
| <i>spr1758</i> ⁵⁾ | SP1941 | <i>cinA</i> | Competence induced protein | 2,15E-08 | 0,14 |
| <i>spr1762</i> ⁵⁾ | SP1945 | <i>comM</i> | Hypothetical protein | 6,32E-07 | 0,38 |
| <i>spr1768</i> ⁶⁾ | SP1951 | - | Conserved hypothetical protein, WrbA like | 6,47E-04 | 2,15 |
| <i>spr1769</i> ⁶⁾ | SP1952 | <i>cylI</i> | Hypothetical protein, CylI immunity domain protein | 1,82E-09 | 2,63 |
| <i>spr1770</i> ⁶⁾ | SP1953 | <i>cylB</i> | ATP-binding/membrane-spanning protein; hemolysin secretion protein | 1,18E-05 | 2,95 |
| <i>spr1771</i> ⁶⁾ | SP1955 | <i>nisP</i> | Subtilisin-like serine protease | 1,22E-05 | 2,10 |
| <i>spr1786</i> | SP1971 | - | Hypothetical protein | 2,95E-05 | 0,28 |
| <i>spr1816</i> ⁸⁾ | SP2002 | - | Conserved hypothetical protein, putative permease | 2,06E-04 | 4,05 |
| <i>spr1817</i> ⁸⁾ | SP2003 | - | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 6,56E-06 | 5,61 |
| <i>spr1818</i> ⁸⁾ | SP2005 | - | Hypothetical protein, putative membrane protein | 2,80E-08 | 14,53 |
| <i>spr1829</i> ⁵⁾ | SP2016 | <i>nadC</i> | Probable nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase | 1,59E-06 | 0,40 |
| <i>spr1831</i> | - | - | Putative ATP binding domain, truncation | 6,95E-06 | 0,25 |
| <i>spr1856</i> | - | - | Putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 3,50E-06 | 0,12 |

| | | | | | |
|------------------------------|--------|---------------|---|----------|------|
| <i>spr1857</i> | - | - | Putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 9,19E-08 | 0,44 |
| <i>spr1858</i> ⁵⁾ | SP2047 | - | Hypothetical protein | 8,41E-07 | 0,09 |
| <i>spr1859</i> ⁵⁾ | SP2048 | - | Conserved hypothetical protein, N-terminal methylation motif | 1,42E-06 | 0,07 |
| <i>spr1861</i> ⁵⁾ | SP2050 | <i>cglD</i> | Competence protein | 4,20E-07 | 0,07 |
| <i>spr1862</i> ⁵⁾ | SP2051 | <i>cglC</i> | Competence protein | 5,70E-05 | 0,33 |
| <i>spr1863</i> ⁵⁾ | SP2052 | <i>cglB</i> | Competence protein | 4,72E-07 | 0,06 |
| <i>spr1864</i> ⁵⁾ | SP2053 | <i>cglA</i> | Competence protein | 2,50E-07 | 0,06 |
| <i>spr1895</i> | SP2084 | <i>pstS</i> | ABC transporter substrate-binding protein - phosphate transport | 1,56E-07 | 3,03 |
| <i>spr1897</i> | SP2086 | <i>pstA</i> | ABC transporter membrane-spanning permease-phosphate transport | 3,50E-04 | 2,04 |
| <i>spr1914</i> | SP2104 | - | Hypothetical protein | 8,15E-06 | 5,35 |
| <i>spr1916</i> | SP2106 | <i>malP</i> | Maltodextrin phosphorylase | 1,96E-08 | 0,28 |
| <i>spr1917</i> | SP2107 | <i>malM</i> | 4-alpha-glucanotransferase (amylomaltase) | 2,39E-06 | 0,22 |
| <i>spr1919</i> ⁵⁾ | SP2109 | <i>malC</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - maltose/maltodextrin | 3,01E-06 | 0,26 |
| <i>spr1920</i> ⁵⁾ | SP2110 | <i>malD</i> | ABC transporter membrane-spanning permease - maltose/maltodextrin | 1,47E-04 | 0,49 |
| <i>spr1936</i> | SP2127 | <i>tktC</i> | Putative transketolase c-terminal section | 3,81E-04 | 2,92 |
| <i>spr1938</i> | SP2129 | - | PTS EIIc component | 3,12E-05 | 2,10 |
| <i>spr1969</i> | SP2163 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIb component | 7,55E-06 | 0,48 |
| <i>spr1971</i> | SP2165 | <i>fucU</i> | Fucose pathway protein, function unknown | 6,07E-06 | 0,39 |
| <i>spr1987</i> | SP2183 | - | Hypothetical protein, truncation | 3,44E-03 | 2,13 |
| <i>spr1988</i> | SP2184 | <i>glpF</i> | Glycerol uptake facilitator protein | 1,21E-03 | 2,03 |
| <i>spr2006</i> ⁵⁾ | SP2201 | <i>cbpD</i> | Choline binding protein D | 7,43E-09 | 0,08 |
| <i>spr2012</i> ⁵⁾ | SP2207 | <i>comFC</i> | Involved in transformation (competence for DNA uptake) | 3,19E-08 | 0,06 |
| <i>spr2013</i> ⁵⁾ | SP2208 | <i>comFA</i> | Required for DNA uptake; related to ATP-dependent RNA/DNA helicases | 5,32E-07 | 0,09 |
| <i>spr2040</i> | SP2234 | - | Transcriptional regulator, TetR family | 8,69E-06 | 0,48 |
| <i>spr2042</i> ⁵⁾ | SP2236 | <i>comD</i> | Histidine protein kinase | 1,56E-09 | 0,04 |
| <i>spr2043</i> ⁵⁾ | SP2237 | <i>comC</i> | Competence stimulating peptide precursor (CSP) | 1,06E-06 | 0,06 |
| <i>spr2045</i> ⁵⁾ | SP2239 | <i>sphtra</i> | Serine protease | 1,89E-07 | 0,33 |
| <i>spr2046</i> ⁵⁾ | SP2240 | <i>spo0J</i> | Chromosome segregation protein | 1,29E-06 | 0,45 |

¹⁾ Annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); ³⁾ Bezeichnung charakterisierter Gene; ⁴⁾ Transkriptmengenverhältnis von P406 Δ *kin11reg11* zu R6; ⁵⁾ Gene des Kompetenzregulons; ⁶⁾ Gene des *cyl*-Clusters; ⁷⁾ Gene des *ytrA*-Clusters; ⁸⁾ Gene des TCS11-Clusters

7.9 DNA-Sequenz der Promotor-Bereiche des TCS11-Clusters

```

1789090          (-10)   (+1)
ACCAAGGTGTCGCAGGTCGAATCCTGTCCTCCCGATTTCATTACAGAGATATGTGAGTGTATTTTTAAAACACTAGATATTATATACATTAAAGAGGAATCAGTTT
>>.....pro2.....>>
GGTTCCTCTTTTGGATTTTCAGTAATCATTGGCAGCGTACTTTTTGTCTCCAGTCTTTTCAATAAATACCGTAGTTAGGTATACACATTGAAATTTAA
CAGATTTATAACTCTTATAAATTTTAAAGAAAGCAATAGAAGGTTTTGTTCACGTATAATATAGAGAATTGAAATAAGATATGAACAGCTCTATCAGGAAAGT
TAAATTAATTTATAGAAATTTTAGTATTTAAGGCCTACTGTTATAGATTCAATACACTATATATGTGTTTGTCTGATAAAAAATTTCTACTCTTTTGTATTTAA
ATAAGTATTAGTTTACATTATGGTGTGAATGGGTTTGATATCTCTTTTGAGGAAGTTGCCTTAGATTTTTTGTGATTGTGTTTTATTGTATAGTGTATCTTGCTTG

                                     -10   +1   RBS
TTTTGAACAGAATTTTATGACATTGTGCATATTTCTAGTGACAGAAGCTTCTGCCTCCTCTGATTTTAAAAGACTATAAATTTGTAGTATGAAATGGGGAAGAAG
AGATCGAGAATAAATGATTTATGCAATGAGTTTAGTAGTAGCAGGAGTTATGACCTATCTCATGTTTTTCGGGATTGGATGAGGATTTTACCA
>>.....smp11A'.....>
m r n k m i i a m s l v v a g v m t y l m f s g l d e d m t
1788361

```

Abbildung 7.3: Sequenz des Bereichs des Promotors $P_{11.1}$ und des putativen Promotors $P_{11.3}$. Dargestellt wurde die DNA-Sequenz des Genoms von *Streptococcus pneumoniae* R6 von nt-Position 1788361 bis 1789090. -10: -10-Region von $P_{11.1}$; +1: Transkriptionsstart von $P_{11.1}$; RBS: Ribosomenbindestelle; ATG (gelb): Translationsstart von *smp11A*; (-10): -10-Region des putativen Promotors $P_{11.3}$; (+1): Transkriptionsstart des putativen Promotors $P_{11.3}$; *kursiv*: Sequenz des *rupB1*-Elements. Die Sequenz von tRNA-Genen und die Aminosäuresequenz von Proteinen in Ein-Buchstaben-Code wurden grün dargestellt.

```

1786980          -10   +1
TTGTTTTACATACCGACAAGATCAACAACCTGGCAGAAAACATTGCGTCATAGCCCTGTAATAATGGGTAGAATATTATCTATCAAGATAACAAGTATGC
>>.....'msp11'.....>
v l h t d k i n n w q k t l r h s p v n m v e y y l s k i t s m l
TGTTGATATTTGGTTTCAATCTTGGTGGTTTCTCAGTTGGGCATTTGTAAAGAGGTGGACATGTCTCTTGGAAATGGATTGGGGCTGCACCTT
>.....'msp11'.....>
v d y l v s i l v v f s v g h f v r g v d m s l g n w i g a a l l
TGCTGATAGTAGGAAGTATTCCTCGTAGCGCTTGGTTTGACCTTGACTCTCTTACCAACTAGTCAGTTGATGTCTGTCGTGGCAATCTCTTTATC
>.....'msp11'.....>
l i v g s i a f v a l g l t l t l l p t s q l m s v v g n l l y l
TAGGGTTGGCTGTTTGGTGGACTCTGGATGCCTATCTCTTTATTTCCAGACTGGATGCAAGTAGTAGGTAAGTGTCTCCGACCTATCAGTTGATGG
>.....'msp11'.....>
g l a v l g g l w m p i s l f p d w m q v v g k c l p t y q l m e
AGTTGCTCAAGACCTTCTTAAATGAGGTTGGCATCAATCTATCAGCCACAGTTTATTTACTTGTTTTTTCAGTAGTTTGTGTTGGTTTGACCATTTACC
>.....'msp11'.....>
l l k t f l n e g g i n l s a t v y l l v f s v v l f g l t i y l
TTCAAGGTCATAAGGAGAATGCTTATGCTTGAAGACTGAAAAG
>>.....>>
q g h k e n a -
>>.....kin11'.....>>
m l e r l k
1786441

```

Abbildung 7.4: Sequenz des Bereichs des Promotors $P_{11.2}$. Dargestellt wurde die DNA-Sequenz des Genoms von *Streptococcus pneumoniae* R6 von nt-Position 1786441 bis 1786980. -10: -10-Region von $P_{11.2}$; +1: Transkriptionsstart von $P_{11.2}$; RBS: Ribosomenbindestelle; ATG (gelb): Translationsstart von *kin11*. Die Aminosäuresequenz von 'Msp11 und Kin11' wurde in grünem Ein-Buchstaben-Code dargestellt.

```

1784780
AGAATCTGGTTGGTTATGATGATATAATATTTTCATGAAGACTATGTGCTAAAATTGACGGTAGTGAATGGAAACAATACCTATAGTAGATTGAAACTAGAATAG
>>....'reg11.....>>
 e s g w l -
TACACCTCTACTCTCAAAACATTGTTAGAAATCGATTGACTGTCTGATCGATTATCTCTTATTTCATTTACTATAACTTTAGGAGGGCTTAGTTTC
CTCCTTTTGTAGTTAGTCTAAGGTGGTAGCAAGGAGCTAAACCTAGGTTTTCTATGAAATTTTTCAATCAATCTTCAAAAAACACTTGAAAGTGTTTACAATTA
-10      +1
GTGATAGAATGGAATAAGTAGAAATATGAAAACGAAATTTTCACATCTTCACTTTGTGAAGTAGATATAGAGCTTCAATCAGTACCTCTACTTGTAAAAGAATG
TGTGAGATAGAAAGGACAGGAAAAGGAATGAATGCAGATGATACAGTAACCAATTTATGATGTGCTCGTGAAGCAGGTGTTCCATGGCGAC
>>.....'ccpA'.....>>
 m n a d d t v t i y d v a r e a g v s m a
1784273

```

Abbildung 7.5: Sequenz des Bereichs des Promotors P_{ccpA} . Dargestellt wurde die DNA-Sequenz des Genoms von *Streptococcus pneumoniae* R6 von nt-Position 1784780 bis 1784273. -10: -10-Region von P_{ccpA} ; +1: Transkriptionsstart von P_{ccpA} ; RBS: Ribosomenbindestelle; ATG (gelb): Translationsstart von *ccpA*. Die Aminosäuresequenz von 'Reg11 und CcpA' wurde in grünem Ein-Buchstaben-Code dargestellt.

7.10 DNA-Sequenz der Promotor-tragenden DNA-Fragmente $P_{11.1}$, $P_{11.2}$ und $P_{11.3}$

$P_{11.1}$

```

SphI
gcatgcGATTGTGTTTTATTGTATAGTGTATCTTGTCTGTTTTGAACAGAATTTTTATGACATTTGTCATATTTCTAGTGACAGAAGCTTCTGCCTCCTC
-10      +1      BamHI
TGATTTTAAAGACTATAATGTAGTATGAAAGgatcc

```

$P_{11.2}$

```

SphI
gcatgcCATGATGTCAACAGCTATCTTCTCATTCCCAGTTGTTTTACATACCACAAGATCAACAACCTGGCAGAAAACATTGCGTCATAGCCCTGTAATA
>>.....'msp11'.....>>
-10      +1      BamHI
TGGTAGAATATTATCTATCAAAggatcc
.....>>

```

$P_{11.3}$

```

SphI
gcatgcGTTTCGACTCCTTAGGGTGCATTTTTCTATTTAACTCGGGAAGTAGCTCAGCTTGGTAGAGTACTTGGTTTGGGACCAAGGTGTCGAGGTTTCG
>>.....'arg4'.....>> >>.....'pro2'.....>>
-10      +1      BamHI
AATCCTGTCTTCCCGATTCATTACAGAGATATGTGAGTGTGATTTTTAAACTAGATATTATATACAggatcc
>.....>>

```

Abbildung 7.6: Klonierte Promotorfragmente $P_{11.1}$, $P_{11.2}$, und $P_{11.3}$. Dargestellt wurde die DNA-Sequenz der in pPP2 klonierten Promotorfragmente. -10: -10-Region; +1: Transkriptionsstart; blau: Bezeichnung der mittels Primer angehängten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen. Sequenzen von tRNA-Genen oder für Proteine kodierende Bereiche wurden grün markiert.

7.11 Das Transkriptom von R6Δ*smp11A* bei einer Zelldichte von N=40Tabelle 7.8: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in R6Δ*smp11A*

| Gennummer R6 ¹⁾ | Gennummer TIGR4 ²⁾ | Gen ³⁾ | Funktion/Domänen | P-Wert | Transkriptverhältnis [Mutante/R6] ⁴⁾ |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------|---|----------|---|
| <i>spr0020</i> ⁵⁾ | SP0018 | <i>comW</i> | positive factor involved in competence | 9,71E-04 | 2,0 |
| <i>spr0030</i> ⁵⁾ | SP0029 | - | Hypothetical protein | 1,38E-03 | 5,4 |
| <i>spr0031</i> ⁵⁾ | SP0031 | - | Hypothetical protein | 1,43E-03 | 2,4 |
| <i>spr0040</i> | SP0041 | <i>blpU</i> | Amphipathic pore-forming peptide precursor | 3,65E-04 | 9,1 |
| <i>spr0044</i> ⁵⁾ | SP0043 | <i>comB</i> | Transport permease protein ComB | 2,23E-04 | 2,7 |
| <i>spr0050</i> | SP0049 | <i>vanZ</i> | Teicoplanin resistance protein | 1,20E-04 | 0,50 |
| <i>spr0066</i> | SP0073 | - | Conserved hypothetical protein, putative Glyoxalase | 3,97E-05 | 0,38 |
| <i>spr0067</i> | - | - | Conserved hypothetical protein | 3,31E-03 | 0,49 |
| <i>spr0105</i> | - | - | Bacteriocin transporter, peptidase c39 family, truncation | 4,27E-05 | 0,14 |
| <i>spr0106</i> | - | - | Putative bacteriocin transporter, truncation | 2,09E-05 | 0,13 |
| <i>spr0107</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,27E-03 | 0,17 |
| <i>spr0108</i> | - | - | Conserved hypothetical protein, <i>comB</i> homologue | 8,12E-05 | 0,18 |
| <i>spr0111</i> | SP0115 | - | Hypothetical protein | 1,36E-05 | 0,33 |
| <i>spr0112</i> | - | - | Hypothetical protein | 7,69E-04 | 0,33 |
| <i>spr0114</i> | - | - | Hypothetical protein | 2,42E-03 | 0,42 |
| <i>spr0115</i> | SP0115 | - | Hypothetical protein | 1,31E-04 | 0,48 |
| <i>spr0128</i> ⁵⁾ | SP0125 | <i>cibA</i> | Competence induced bacteriocin A | 9,90E-03 | 2,6 |
| <i>spr0264</i> ⁵⁾ | SP0287 | - | Conserved hypothetical protein, xanthine uracil permease family | 1,16E-04 | 0,44 |
| <i>spr0287</i> | SP0317 | <i>kdgA</i> | 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase | 2,54E-05 | 0,37 |
| <i>spr0288</i> | SP0318 | <i>kdgK</i> | 2-keto-3-deoxygluconate kinase | 2,75E-03 | 0,33 |
| <i>spr0290</i> | SP0320 | <i>gno</i> | 5-keto-D-gluconate 5-reductase | 4,54E-04 | 0,30 |
| <i>spr0291</i> | SP0321 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIa component | 2,42E-03 | 0,21 |
| <i>spr0293</i> | SP0323 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIb component | 4,07E-05 | 0,18 |
| <i>spr0295</i> | SP0325 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIId component | 8,76E-05 | 0,19 |
| <i>spr0307</i> | SP0338 | - | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 1,30E-04 | 0,27 |
| <i>spr0388</i> | SP0429 | - | Hypothetical protein | 4,05E-05 | 2,2 |
| <i>spr0389</i> | SP0430 | - | Hypothetical protein | 3,18E-03 | 2,3 |
| <i>spr0446</i> | SP0507 | - | Putative type I restriction enzyme, truncation | 5,48E-04 | 0,34 |
| <i>spr0462</i> | SP0525 | <i>blpS</i> | Regulatory protein | 1,72E-03 | 3,2 |
| <i>spr0463</i> | SP0526 | <i>blpR</i> | Response regulator BlpR | 5,40E-04 | 2,7 |
| <i>spr0464</i> | SP0527 | <i>blpH</i> | Histidine kinase BlpH | 3,36E-03 | 2,6 |
| <i>spr0465</i> | SP0528 | <i>blpC</i> | Peptide pheromone BlpC | 7,78E-03 | 8,5 |
| <i>spr0466</i> ⁵⁾ | SP0529 | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 8,42E-03 | 11,1 |
| <i>spr0467</i> ⁵⁾ | SP0529 | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 5,77E-03 | 9,8 |
| <i>spr0468</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 4,53E-03 | 9,5 |
| <i>spr0469</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 6,47E-03 | 7,5 |
| <i>spr0470</i> | SP0541 | <i>blpO</i> | Hypothetical protein | 1,66E-04 | 9,5 |
| <i>spr0471</i> | - | - | Hypothetical protein | 1,18E-03 | 10,3 |

| | | | | | |
|---------------------------------|--------|--------------|--|----------|------|
| <i>spr0472</i> ⁵⁾ | SP0545 | <i>blpY</i> | BlpY immunity protein | 4,51E-04 | 12,1 |
| <i>spr0473</i> ⁵⁾ | SP0546 | <i>blpZ</i> | BlpZ protein | 4,73E-04 | 5,6 |
| <i>spr0474</i> ⁵⁾ | SP0547 | <i>pncP</i> | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 7,39E-05 | 9,1 |
| <i>spr0504</i> | SP0576 | <i>licT</i> | Transcriptional antiterminator (BglG family) | 4,49E-05 | 0,41 |
| <i>spr0561</i> | SP0641 | <i>prtA</i> | Cell wall-associated serine proteinase precursor PrtA | 3,86E-03 | 2,9 |
| <i>spr0632</i> | SP0720 | - | ABC transporter ATP-binding protein-cobalt or other cation transport | 8,87E-03 | 0,47 |
| <i>spr0633</i> | SP0721 | - | Conserved hypothetical protein | 2,47E-05 | 0,44 |
| <i>spr0639</i> | SP0727 | <i>copY</i> | COPAB ATPases metal-fist type repressor | 7,39E-03 | 0,37 |
| <i>spr0826</i> | SP0925 | - | Hypothetical protein | 6,59E-03 | 3,3 |
| <i>spr0857</i> ⁵⁾ | SP0955 | <i>celB</i> | Competence protein | 4,80E-04 | 2,9 |
| <i>spr0996</i> ⁵⁾ | SP1088 | <i>radC</i> | DNA repair protein | 3,53E-04 | 2,5 |
| <i>spr1144</i> ⁵⁾ | SP1266 | <i>smf</i> | DNA processing Smf protein | 4,00E-03 | 3,3 |
| <i>spr1291</i> | SP1436 | - | Hypothetical protein | 9,90E-06 | 2,1 |
| <i>spr1510</i> | SP1666 | <i>ftsZ</i> | Cell division protein FtsZ | 3,76E-03 | 0,47 |
| <i>spr1558</i> ^{5) 6)} | SP1714 | <i>ytrA</i> | Transcription regulator GntR-like | 6,71E-03 | 2,6 |
| <i>spr1559</i> ^{5) 6)} | SP1715 | - | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 9,03E-04 | 2,9 |
| <i>spr1566</i> | SP1722 | <i>scrA</i> | Phosphotransferase system Sucrose-specific EIIabc components | 1,35E-03 | 0,48 |
| <i>spr1619</i> | SP1682 | - | ABC transporter membrane-spanning permease-sugar transporter | 2,07E-03 | 2,2 |
| <i>spr1620</i> | SP1897 | - | ABC transporter substrate-binding protein-sugar transport | 5,93E-05 | 2,4 |
| <i>spr1662</i> | SP1847 | <i>xpt</i> | Xanthine phosphoribosyltransferase | 8,15E-04 | 0,50 |
| <i>spr1679</i> | SP1862 | - | Conserved hypothetical protein | 2,18E-04 | 0,47 |
| <i>spr1758</i> ⁵⁾ | SP1941 | <i>cinA</i> | Competence induced protein | 4,23E-03 | 2,8 |
| <i>spr1816</i> ⁷⁾ | SP2002 | <i>mcp11</i> | ABC transporter permease component - unknown substrate | 1,56E-03 | 2,1 |
| <i>spr1817</i> ⁷⁾ | SP2003 | <i>nbp11</i> | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 2,18E-04 | 2,3 |
| <i>spr1856</i> | - | - | Putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 1,54E-03 | 3,7 |
| <i>spr1857</i> | - | - | Putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 8,25E-06 | 3,0 |
| <i>spr1858</i> ⁵⁾ | SP2047 | - | Hypothetical protein | 8,96E-04 | 3,4 |
| <i>spr1859</i> ⁵⁾ | SP2048 | - | Conserved hypothetical protein, N-terminal methylation motif | 9,00E-03 | 3,3 |
| <i>spr1861</i> ⁵⁾ | SP2050 | <i>cglD</i> | Competence protein | 5,18E-03 | 2,9 |
| <i>spr1862</i> ⁵⁾ | SP2051 | <i>cglC</i> | Competence protein | 9,50E-03 | 2,7 |
| <i>spr1863</i> ⁵⁾ | SP2052 | <i>cglB</i> | Competence protein | 1,24E-03 | 3,3 |
| <i>spr1945</i> | SP2136 | <i>pcpA</i> | Choline-binding protein | 8,13E-03 | 7,5 |
| <i>spr2006</i> ⁵⁾ | SP2201 | <i>cbpD</i> | Choline binding protein D | 4,17E-03 | 2,2 |
| <i>spr2037</i> | - | - | Conserved hypothetical protein, truncation | 6,94E-03 | 0,37 |
| <i>spr2038</i> | - | - | Conserved hypothetical protein, truncation | 5,87E-04 | 0,46 |

¹⁾ Annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); ³⁾ Bezeichnung charakterisierter Gene; ⁴⁾ Transkriptmengenverhältnis von R6Δ*mcp11A* zu R6; ⁵⁾ Gene des Kompetenzregulons; ⁶⁾ Gene des *ytrA*-Clusters; ⁷⁾ Gene des TCS11-Clusters

7.12 Das Transkriptom von R6 Δ msp11_3 bei einer Zelldichte von N=40Tabelle 7.9: Gene mit signifikant veränderter Transkriptmenge in R6 Δ msp11_3

| Gennummer R6 ¹⁾ | Gennummer TIGR4 ²⁾ | Gen ³⁾ | Funktion/Domänen | P-Wert | Transkriptverhältnis [Mutante/R6] ⁴⁾ |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------|---|----------|---|
| <i>spr0013</i> ⁵⁾ | SP2006 | <i>comX</i> | Alternative sigma factor ComX | 2,07E-05 | 0,10 |
| <i>spr0020</i> ⁵⁾ | SP0018 | <i>comW</i> | positive factor involved in competence | 4,36E-05 | 0,07 |
| <i>spr0030</i> ⁵⁾ | SP0029 | - | Hypothetical protein | 5,83E-04 | 0,20 |
| <i>spr0031</i> ⁵⁾ | SP0031 | - | Hypothetical protein | 8,37E-06 | 0,34 |
| <i>spr0040</i> | SP0041 | <i>blpU</i> | Amphipathic pore-forming peptide precursor | 2,84E-04 | 0,09 |
| <i>spr0043</i> ⁵⁾ | SP0042 | <i>comA</i> | Transport ATP-binding protein ComA | 8,85E-03 | 0,11 |
| <i>spr0044</i> ⁵⁾ | SP0043 | <i>comB</i> | Transport permease protein ComB | 2,58E-07 | 0,10 |
| <i>spr0105</i> | - | - | Bacteriocin transporter, peptidase c39 family, truncation | 8,68E-04 | 3,17 |
| <i>spr0106</i> | - | - | Putative bacteriocin transporter, truncation | 4,92E-04 | 3,48 |
| <i>spr0107</i> | - | - | Hypothetical protein | 9,90E-04 | 3,92 |
| <i>spr0108</i> | - | - | Conserved hypothetical protein, <i>comB</i> homologue | 1,96E-03 | 4,17 |
| <i>spr0127</i> ⁵⁾ | SP0124 | <i>cibB</i> | Competence induced bacteriocin B | 6,90E-05 | 0,08 |
| <i>spr0128</i> ⁵⁾ | SP0125 | <i>cibA</i> | Competence induced bacteriocin A | 4,51E-04 | 0,03 |
| <i>spr0388</i> | SP0429 | - | Hypothetical protein | 3,07E-06 | 0,18 |
| <i>spr0389</i> | SP0430 | - | Hypothetical protein | 1,36E-03 | 0,14 |
| <i>spr0423</i> | SP0476 | - | Phosphotransferase system sugar-specific EIIa component | 3,09E-04 | 2,65 |
| <i>spr0446</i> | SP0507 | - | Putative type I restriction enzyme, truncation | 5,72E-03 | 2,40 |
| <i>spr0448</i> | SP0507 | - | Putative type I restriction enzyme, truncation | 1,54E-03 | 0,33 |
| <i>spr0462</i> | SP0525 | <i>blpS</i> | Regulatory protein | 4,47E-04 | 0,33 |
| <i>spr0463</i> | SP0526 | <i>blpR</i> | Response regulator BlpR | 9,13E-04 | 0,42 |
| <i>spr0464</i> | SP0527 | <i>blpH</i> | Histidine kinase BlpH | 1,41E-03 | 0,48 |
| <i>spr0467</i> ⁵⁾ | SP0529 | <i>blpB</i> | ABC export protein, truncation | 7,20E-03 | 0,07 |
| <i>spr0468</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 2,43E-03 | 0,05 |
| <i>spr0469</i> ⁵⁾ | SP0530 | <i>blpA</i> | ABC export protein, truncation | 5,53E-03 | 0,06 |
| <i>spr0470</i> | SP0541 | <i>blpO</i> | Hypothetical protein | 2,97E-03 | 0,09 |
| <i>spr0471</i> | - | - | Hypothetical protein | 3,13E-07 | 0,09 |
| <i>spr0472</i> ⁵⁾ | SP0545 | <i>blpY</i> | BlpY immunity protein | 1,33E-04 | 0,07 |
| <i>spr0473</i> ⁵⁾ | SP0546 | <i>blpZ</i> | BlpZ protein | 5,92E-04 | 0,22 |
| <i>spr0474</i> ⁵⁾ | SP0547 | <i>pncP</i> | ABC transporter ATP binding protein - unknown substrate | 2,63E-05 | 0,14 |
| <i>spr0561</i> | SP0641 | <i>prtA</i> | Cell wall-associated serine proteinase precursor PrtA | 7,16E-04 | 2,76 |
| <i>spr0639</i> | SP0727 | <i>copY</i> | COPAB ATPases metal-fist type repressor | 7,73E-05 | 2,53 |
| <i>spr0640</i> | SP0728 | - | Conserved hypothetical protein | 4,72E-03 | 2,52 |
| <i>spr0856</i> ⁵⁾ | SP0954 | <i>celA</i> | Competence protein | 3,38E-03 | 0,12 |
| <i>spr0857</i> ⁵⁾ | SP0955 | <i>celB</i> | Competence protein | 2,31E-05 | 0,06 |
| <i>spr0858</i> ⁵⁾ | SP0956 | - | Hypothetical protein | 1,97E-07 | 0,36 |
| <i>spr0859</i> ⁵⁾ | SP0957 | - | Hypothetical protein, ATP binding domain | 1,48E-03 | 0,45 |
| <i>spr0860</i> ⁵⁾ | SP0958 | - | Hypothetical protein, putative permease | 3,31E-04 | 0,49 |

| | | | | | |
|------------------------------|--------|---------------|---|----------|------|
| <i>spr0881</i> ⁵⁾ | SP0978 | <i>coiA</i> | Competence protein | 1,34E-03 | 0,15 |
| <i>spr0945</i> | SP1043 | - | Hypothetical protein | 6,91E-03 | 2,09 |
| <i>spr0996</i> ⁵⁾ | SP1088 | <i>radC</i> | DNA repair protein | 9,82E-04 | 0,06 |
| <i>spr1144</i> ⁵⁾ | SP1266 | <i>smf</i> | DNA processing Smf protein | 5,86E-04 | 0,04 |
| <i>spr1321</i> | SP1467 | - | Conserved hypothetical protein, glutamine amidotransferase family | 7,27E-04 | 2,86 |
| <i>spr1322</i> | SP1468 | <i>pdx1</i> | Pyridoxine biosynthesis protein | 4,75E-03 | 2,40 |
| <i>spr1452</i> | - | - | Hypothetical protein, similar nt sequence to rup | 1,71E-04 | 0,43 |
| <i>spr1472</i> | SP1631 | <i>thrS</i> | Threonyl-tRNA synthetase 1 | 2,00E-03 | 0,50 |
| <i>spr1537</i> | SP1694 | - | Hypothetical protein | 3,34E-03 | 2,05 |
| <i>spr1562</i> ⁵⁾ | SP1717 | <i>nata</i> | ABC transporter ATP-binding protein - Na ⁺ export | 1,05E-04 | 0,45 |
| <i>spr1672</i> | SP1857 | <i>czcD</i> | Cation diffusion facilitator transporter-heavy metal transport | 1,33E-03 | 3,03 |
| <i>spr1724</i> ⁵⁾ | SP1540 | <i>ssbB</i> | Single-stranded DNA-binding protein | 2,85E-03 | 0,06 |
| <i>spr1756</i> ⁵⁾ | SP1939 | <i>dinF</i> | DNA-damage-inducible protein | 1,65E-03 | 0,38 |
| <i>spr1758</i> ⁵⁾ | SP1941 | <i>cinA</i> | Competence induced protein | 1,31E-03 | 0,12 |
| <i>spr1762</i> ⁵⁾ | SP1945 | <i>comM</i> | Hypothetical protein | 9,88E-04 | 0,14 |
| <i>spr1767</i> ⁶⁾ | SP1950 | <i>cylM</i> | CylM protein, cytolytic toxin system | 1,81E-06 | 2,15 |
| <i>spr1770</i> ⁶⁾ | SP1953 | <i>cylB</i> | ATP-binding/membrane-spanning protein; hemolysin secretion protein | 2,83E-03 | 2,12 |
| <i>spr1817</i> ⁷⁾ | SP2003 | <i>nbp11</i> | ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate | 1,54E-04 | 2,01 |
| <i>spr1818</i> ⁷⁾ | SP2005 | <i>smp11A</i> | Putative membrane protein | 9,04E-04 | 2,62 |
| <i>spr1822</i> | SP2009 | <i>rpmG</i> | 50S Ribosomal protein L33 | 2,83E-03 | 2,05 |
| <i>spr1831</i> | - | - | Putative ATP binding domain, truncation | 9,22E-03 | 0,41 |
| <i>spr1856</i> | - | - | Putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 6,16E-04 | 0,03 |
| <i>spr1857</i> | - | - | Putative SAM-dependent methyltransferase, truncation | 4,06E-05 | 0,12 |
| <i>spr1858</i> ⁵⁾ | SP2047 | - | Hypothetical protein | 2,12E-04 | 0,03 |
| <i>spr1859</i> ⁵⁾ | SP2048 | - | Conserved hypothetical protein, N-terminal methylation motif | 1,34E-04 | 0,03 |
| <i>spr1861</i> ⁵⁾ | SP2050 | <i>cglD</i> | Competence protein | 1,34E-07 | 0,03 |
| <i>spr1862</i> ⁵⁾ | SP2051 | <i>cglC</i> | Competence protein | 2,92E-07 | 0,03 |
| <i>spr1863</i> ⁵⁾ | SP2052 | <i>cglB</i> | Competence protein | 7,53E-06 | 0,02 |
| <i>spr1864</i> ⁵⁾ | SP2053 | <i>cglA</i> | Competence protein | 3,45E-04 | 0,02 |
| <i>spr1875</i> | SP0664 | - | Putative group B streptococcal surface immunogenic protein | 3,53E-03 | 2,94 |
| <i>spr1945</i> | SP2136 | <i>pcpA</i> | Choline-binding protein | 1,12E-02 | 7,41 |
| <i>spr2006</i> ⁵⁾ | SP2201 | <i>cbpD</i> | Choline binding protein D | 3,13E-04 | 0,08 |
| <i>spr2012</i> ⁵⁾ | SP2207 | <i>comFC</i> | Involved in transformation (competence for DNA uptake) | 4,29E-04 | 0,08 |
| <i>spr2013</i> ⁵⁾ | SP2208 | <i>comFA</i> | Required for DNA uptake; related to ATP-dependent RNA/DNA helicases | 2,62E-05 | 0,04 |
| <i>spr2041</i> ⁵⁾ | SP2235 | <i>comE</i> | Response regulator | 7,09E-05 | 0,10 |
| <i>spr2042</i> ⁵⁾ | SP2236 | <i>comD</i> | Histidine protein kinase | 6,50E-04 | 0,03 |
| <i>spr2043</i> ⁵⁾ | SP2237 | <i>comC</i> | Competence stimulating peptide precursor (CSP) | 5,92E-07 | 0,02 |

¹⁾ Annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* R6 (Genbank Nr. NC_003098); ²⁾ zu orfs aus R6 homologe annotierte orfs von *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Genbank Nr. NC_003028); ³⁾ Bezeichnung charakterisierter Gene; ⁴⁾ Transkriptmengenverhältnis von R6 Δ *msp11_3* zu R6; ⁵⁾ Gene des Kompetenzregulons; ⁶⁾ Gene des *cyl*-Clusters; ⁷⁾ Gene des TCS11-Clusters

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Carsten Volz
geboren am: 14.03.1973 in Kaiserslautern
Familienstand: Verheiratet
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1979-1980 Grundschole in Weilerbach
1980-1983 Grundschole Luitpoldschole, Kaiserslautern
1983-1992 Staatliches Gymnasium am Rittersberg, Kaiserslautern
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1992-1993 Deutsches Rotes Kreuz in Kaiserslautern

Hochschulbildung

an der Technischen Universität Kaiserslautern

1994-1996 Chemiestudium
1996-2004 Biologiestudium, Hauptfach: Mikrobiologie
Abschluss: Diplom
Titel der Diplomarbeit: Substrate, Effekte und Interaktionen einer ClpP-artigen Protease des temperenten *Lactobacillus gasser* Bakteriophagen ϕ adh.

2004-2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Mikrobiologie der Technischen Universität Kaiserslautern.