

# **Die Regulation des Zweikomponentensystems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae* und die phänotypischen Konsequenzen**

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

von

**Dipl.-Biol. Miriam Müller**

Datum der wissenschaftlichen Aussprache  
10.06.11

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

Kaiserslautern, 2011

D386

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, Miriam Müller, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

Kaiserslautern, Mai 2011

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> – ein natürlich kompetentes Bakterium	3
2.2 $\beta$ -Lactamresistenz in <i>Streptococcus pneumoniae</i> – die P- und C-Mutantenfamilie	6
2.3 Zweikomponentensysteme	8
2.4 Das Zweikomponentensystem CiaRH und sein Regulon	10
2.5 Die csRNAs – kleine regulatorische RNAs	14
2.6 HtrA – eine Serinprotease der HtrA-Proteinfamilie	17
2.7 Zielsetzung dieser Arbeit	20
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
3.1 Material	22
3.1.1 Bakterienstämme	22
3.1.2 Plasmide	27
3.1.3 Oligonukleotide	27
3.1.4 Nährmedien	29
3.1.4.1 C+Y-Medium	29
3.1.4.2 Todd Hewitt broth (THB)	30
3.1.4.3 Brain heart infusion (BHI)	31
3.1.4.4 D-Blutagar	31
3.1.4.5 LB-Medium und -Agar	31
3.2 Methoden	32
3.2.1 Anzucht und Stammkonservierung	32
3.2.1.1 Wachstum in Flüssigmedium	32
3.2.1.2 Glycerinkulturen	33
3.2.2 Transformation von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	33
3.2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen von <i>S. pneumoniae</i>	33
3.2.2.2 Transformation von <i>S. pneumoniae</i>	33
3.2.2.3 Bestimmung der Transformationseffizienz	34
3.2.3 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	35
3.2.3.1 Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	35
3.2.3.2 Transformation von <i>E. coli</i>	35
3.2.4 Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	36
3.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	37
3.2.5.1 Zellaufschluss	38
3.2.5.2 RNA-Isolierung	38
3.2.5.3 DNaseI-Verdau	39
3.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	39
3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
3.2.7.1 Überlappende PCR	41
3.2.8 Restriktion von DNA	43
3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten	43

3.2.10	Agarose-Gelelektrophorese	44
3.2.11	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	45
3.2.11.1	SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen	45
3.2.11.2	PAGE zur Auftrennung von RNA	46
3.2.12	Western Blot	47
3.2.12.1	Herstellung von Zelllysaten	47
3.2.12.2	Blotten der Proteine	48
3.2.12.3	Färben des Western Blots	48
3.2.13	Northern Blot	49
3.2.13.1	Blotten der RNA	50
3.2.13.2	Färben des Northern Blots	50
3.2.14	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	51
3.2.15	$\beta$ -Galaktosidaseassay	52
3.2.15.1	Durchführung des $\beta$ -Galaktosidaseassays	53
3.2.15.2	Auswertung des $\beta$ -Galaktosidaseassays	54
3.2.15.3	Proteinbestimmung nach Bradford	54
3.2.16	Konstruktion der Stämme mit veränderten <i>ciaH</i> -Allelen	55
3.2.17	Konstruktion des Deletionsderivats R6 spr0931:: <i>aad9</i>	56
3.2.18	Konstruktion des Deletionsderivats R6 <i>parB</i> :: <i>cat</i>	57
3.2.19	Konstruktion der <i>htrA</i> -Komplementationsstämme	58
3.2.20	Konstruktion des rifampinresistenten Stammes RKL222 zur Verwendung als Transformationsmarker	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>Die <i>ciaH</i>-Allele aus <math>\beta</math>-lactamresistenten Spontanmutanten von <i>S. pneumoniae</i> R6</b>	<b>60</b>
4.1.1	Die Instabilität der <i>ciaH</i> -Allele und die daraus resultierenden technischen Konsequenzen	61
4.1.2	Untersuchungen der CiaR-abhängigen Promotoraktivität in Stämmen mit verändertem <i>ciaH</i>	63
4.1.3	Der Einfluss der <i>ciaH</i> -Allele auf die $\beta$ -Lactamresistenz	67
4.1.4	Der Einfluss der <i>ciaH</i> -Allele auf das Wachstums- und Lyseverhalten	68
4.1.5	Der Einfluss der <i>ciaH</i> -Allele auf die Kompetenz	70
<b>4.2</b>	<b>Der Anteil von HtrA und den csRNAs an den CiaRH-vermittelten Phänotypen</b>	<b>71</b>
4.2.1	Der Einfluss von <i>htrA</i> und <i>ccnA-E</i> auf die Kompetenz	72
4.2.1.1	Untersuchungen der Kompetenz in C+Y-Medium	73
4.2.1.2	Untersuchungen der Kompetenz in brain heart infusion (BHI)	75
4.2.1.3	Untersuchungen der Kompetenz in Todd Hewitt broth (THB)	77
4.2.2	Der Einfluss von <i>htrA</i> und <i>ccnA-E</i> auf die CiaRH-vermittelte Resistenz	79
4.2.3	Der Einfluss von <i>htrA</i> und <i>ccnA-E</i> auf die CiaRH-vermittelte Autolyse	81
<b>4.3</b>	<b>Der regulatorische Einfluss von HtrA auf die Aktivität von CiaRH</b>	<b>83</b>
4.3.1	Der Einfluss von HtrA auf die CiaR-abhängige Genregulation	83
4.3.2	Der Einfluss weiterer Gendeletionen des CiaR-Regulons auf die Aktivität von CiaRH	89
4.3.3	Die Bedeutung von CiaH für die Inhibierung des CiaRH-Systems durch HtrA	92
4.3.4	Der Einfluss von HtrA auf ein bereits aktiviertes CiaRH-System	94
4.3.5	Die Bedeutung des Mediums	96
4.3.6	Die Bedeutung der Kompetenz	98
4.3.7	Der Einfluss von HtrA auf die Menge des Responseregulators CiaR	100

---

<b>5 Diskussion</b>	101
<b>5.1 Der Einfluss bestimmter <i>ciaH</i>-Mutationen auf die Funktion von CiaH und den Phosphorylierungsstatus von CiaR</b>	101
<b>5.2 Der inhibierende Effekt von HtrA auf die Aktivität des TCS CiaRH</b>	110
5.2.1 Die Rolle der Histidinkinase CiaH	111
5.2.2 Wie kann HtrA auf CiaR wirken?	112
5.2.3 Wie wird die Aktivität von CiaR verändert?	115
5.2.4 Protease- oder Chaperonaktivität?	117
5.2.5 Gibt es einen Zusammenhang mit anderen regulatorischen Einflüssen?	118
5.2.6 Die physiologische Funktion	120
<b>5.3 Regulation von Kompetenz, Resistenz und Autolyse durch CiaRH – welche Rolle spielen die csRNAs und HtrA?</b>	122
5.3.1 CiaRH und die Kompetenz	123
5.3.2 CiaRH und die Resistenz	129
5.3.2 CiaRH und die Autolyse	131
<b>5.4 Die Regulation von CiaRH und seine Folgen – ein Überblick</b>	133
<b>5.5 Ausblick</b>	138
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	140
<b>7 Anhang</b>	154
Danksagung	162
Lebenslauf	163

# Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin / Alanin	rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
AA	Acrylamid	RR	Responseregulator
Abb.	Abbildung	RT	Raumtemperatur
ADP	Adenosindiphosphat	s	Sekunde
APS	Ammoniumpersulfat	SDS	Natriumdodecylsulfat
AS	Aminosäure	Sm	Streptomycin
ATP	Adenosintri-phosphat	Spc	Spectinomycin
BAA	Bisacrylamid	sRNA	small RNA
BHI	rain heart infusion	T	Thymin / Threonin
bp	Basenpaar	Tab.	Tabelle
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)	TCS	Zweikomponentensystem
C	Cytosin	TE	Tris-EDTA
Cam	Chloramphenicol	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Ctx	Cefotaxim	Tet	Tetracyclin
D	Aspartat	THB	Todd Hewitt broth
DMSO	Dimethylsulfoxid	TIR	Translationsinitiationsregion
DNA	Desoxyribonukleinsäure	T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur (Nucleinsäuren)
DNAse	Desoxyribonuklease	U	Units
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	UTR	untranslatierte Region
Ery	Erythromycin	V	Valin
EtOH	Ethanol		
G	Guanin		
g	Gramm		
h	Stunde		
H	Histidin		
HK	Histidinkinase		
K	Lysin		
Kan	Kanamycin		
kb	Kilobasen		
kDa	Kilodalton		
l	Liter		
M	molar		
MHK	minimale Hemmkonzentration		
min	Minute		
N	beliebige Base / Asparagin		
OD	optische Dichte		
ONP	o-Nitrophenol		
ONPG	o-Nitrophenol-β-D-Galaktopyranosid		
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)		
P	Phosphat / Prolin		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PBP	Penicillin-bindendes Protein		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
Pip	Piperacillin		
PTS	Phosphotransferasesystem		
Q	Glutamin		
Rif	Rifampin		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNAse	Ribonuklease		

# 1 Zusammenfassung

Das Zweikomponentensystem CiaRH, bestehend aus der membranständigen Histidinkinase CiaH und dem cytoplasmatischen Responseregulator CiaR, wurde als erste nicht-PBP-Resistenzdeterminante in *Streptococcus pneumoniae* entdeckt. Es beeinflusst neben der  $\beta$ -Laktamresistenz noch weitere Phänotypen, darunter die genetische Kompetenz, die Autolyse und die Virulenz, was seine Bedeutung für die Physiologie der Zelle unterstreicht.

Im Zuge dieser Arbeit wurden sieben verschiedene *ciaH*-Allele aus spontanen  $\beta$ -laktamresistenten Labormutanten charakterisiert. Die Allele, deren eine bis zwei Punktmutationen sich über den gesamten Genbereich erstrecken, wurden mit Hilfe der Janus-Kassette in den Wildtyp-Stamm R6 eingebracht und untersucht. Es konnte durch  $\beta$ -Galaktosidaseassays von Promotor-*lacZ*-Fusionen gezeigt werden, dass alle *ciaH*-Allele eine Aktivierung des CiaRH-Systems vermitteln. Diese bewegt sich, bezogen auf den CiaR-regulierten Promotor  $P_{htrA}$ , je nach Allel zwischen dem 4- und dem 26-fachen im Vergleich zum Wildtyp. Phänotypische Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung des CiaRH-Systems in allen Fällen zu einer Erhöhung der  $\beta$ -Laktamresistenz, sowie einer verzögerten Autolyse führt. Durch den neu hergestellten alternativen Rifampin-Resistenzmarker RKL222 konnte zudem der Kompetenzphänotyp der Stämme mit verändertem *ciaH* untersucht und ein Verlust der Kompetenz nachgewiesen werden. Die Ausprägung der Phänotypen korreliert dabei weitestgehend mit der Stärke der CiaRH-Aktivierung. Die abgestufte Aktivierungsstärke der unterschiedlichen *ciaH*-Allele könnte in Zukunft bei der Untersuchung verschiedener regulatorischer Aspekte von CiaRH von Nutzen sein.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, welches oder welche der 30 Gene des CiaR-Regulons die CiaRH-Abhängigkeit des Resistenz-, Kompetenz- und Autolysephänotyps von *S. pneumoniae* vermitteln. Dazu wurde die Bedeutung der stark regulierten Gene *ccnA-E* und *htrA* phänotypisch näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die durch *ccnA-E* kodierten csRNAs die Haupteffektoren der genannten Phänotypen sind. Ihr Fehlen hebt den Kompetenzblock, die verzögerte Lyse und größtenteils auch die  $\beta$ -Laktamresistenz eines aktivierten CiaRH-Systems auf. Die Serinprotease HtrA dagegen hat keinen deutlichen Effekt auf Resistenz und Autolyse, trägt aber zum Kompetenzblock, der bei aktiviertem CiaRH-System auftritt, bei. In dem kompetenzinhibierenden Medium BHI führt nur die gemeinsame Deletion von *ccnA-E* und *htrA* zur Wiederherstellung der Kompetenz,



wie beim *ciaR*-Deletionsstamm, während in dem ebenfalls kompetenzinhibierenden Medium THB die Deletion von *htrA* dafür ausreicht. Die Identifizierung der csRNAs und HtrA als Effektoren der CiaRH-abhängigen Phänotypen stellt die Basis für weiterführende Analysen über die regulatorischen Zusammenhänge zwischen CiaRH und den Phänotypen dar.

In dieser Arbeit konnte zudem erstmals gezeigt werden, dass unter den Genprodukten des CiaR-Regulons die Serinprotease HtrA, die csRNAs und das Mannose-Phosphotransferasesystem ManLMN einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität des CiaRH-Systems ausüben. Die Deletion ihrer Gene führte zu einer unterschiedlich starken Aktivierung der CiaR-abhängigen Genregulation. Da der stärkste aktivierende Effekt durch das Fehlen von HtrA vermittelt wurde, wurde die Art dieser Regulation im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass im Falle einer *htrA*-Deletion die Aktivierung von CiaR ohne Beteiligung der Histidinkinase CiaH geschieht. Zudem ist der regulatorische Effekt offenbar unabhängig vom Medium und wird nicht über Veränderungen der genetischen Kompetenz vermittelt. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde zusätzlich festgestellt, dass die Deletion der Gene *comAB* und *comDE*, die für die Kompetenzinduktion essentiell sind, einen inhibitorischen Effekt auf die CiaRH-Aktivität hat. Damit konnten in dieser Arbeit zwei bislang unbekannte Regulationswege identifiziert werden, die die Aktivität des CiaRH-Systems beeinflussen.

Im Gegensatz zur Mehrzahl der Zweikomponentensysteme ist CiaRH offensichtlich nicht darauf ausgelegt, starke Änderungen der Genexpression zu vermitteln. Die CiaRH-Aktivität befindet sich vielmehr unter den verschiedensten physiologischen Bedingungen auf einem recht konstanten mittleren Aktivierungsniveau. Stärkere Abweichungen von diesem Niveau führen zur deutlichen Beeinträchtigung der Zellfitness. Die Homöostase der CiaRH-Aktivität ist folglich für *S. pneumoniae* von großer Bedeutung und muss durch Regulationsmechanismen sichergestellt werden. Regelkreise, wie die in dieser Arbeit identifizierten Regulationswege, stellen dabei eine Möglichkeit dar. Insbesondere die gegenseitige Beeinflussung von CiaRH und den Komponenten des eigenen Regulons kann zur Aufrechterhaltung eines gleichbleibenden Aktivitätsniveaus von CiaRH beitragen. Es zeigt sich mehr und mehr, dass es sich bei CiaRH um ein für die Zellphysiologie bedeutendes System handelt, dessen Aktivität durch ein regulatorisches Zusammenspiel von äußeren und inneren Faktoren gesteuert wird.

## 2 Einleitung

### 2.1 *Streptococcus pneumoniae* – ein natürlich kompetentes Bakterium

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung eines Zweikomponentensystems des Bakteriums *Streptococcus pneumoniae* R6. Phylogenetisch gehört *S. pneumoniae* (Pneumokokkus) wie alle Streptokokken zur Untergruppe der grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (~40 %). Bereits 1881 wurde dieses Bakterium von George Miller Sternberg und Louis Pasteur unabhängig voneinander entdeckt und beschrieben. Morphologisch bildete *S. pneumonaie* kleine Kokken ( $\emptyset \sim 0,5 - 1,5 \mu\text{m}$ ), die in kurzen Ketten oder als Diplokokken angeordnet sind, woher auch der frühere Name *Diplococcus pneumoniae* herrührt.

Bei Streptokokken handelt es sich um Milchsäurebakterien, die in unterschiedlichsten Lebensräumen vorkommen und sowohl pathogene, als auch kommensale und in der Lebensmittelindustrie verwendete Arten umfassen. Sie sind anaerob aber aerotolerant und gewinnen Energie in erster Linie durch homofermentative Milchsäuregärung. In den meisten Fällen sind Streptokokken auf komplexe Nährstoffbedingungen angewiesen, da ihnen viele Stoffwechselwege zur Biosynthese verschiedenster essentieller Verbindungen wie Vitamine, Aminosäuren oder Nukleotide fehlen (Hardie und Whiley, 1995). Auf Blutagar-Platten bildet *S. pneumoniae* eine  $\alpha$ -Hämolyse aus, das heißt, es kommt zu einer Entfärbung der Erythrozyten und einer sogenannten „Vergrünung“ um die Kolonien. Die Art der Hämolyse stellt ein Unterscheidungsmerkmal innerhalb der Streptokokken dar. So bildet beispielsweise *Streptococcus pyogenes* eine  $\beta$ -Hämolyse aus, wobei es im Gegensatz zur  $\alpha$ -Hämolyse zu einer vollständigen Lyse der Erythrozyten um die Bakterienkolonien kommt.

Große Bedeutung für die Molekularbiologie erlangte *S. pneumoniae* durch die Versuche von Frederick Griffith zur Transformation von Kapselphänotypen (Griffith, 1928). Griffith stellte fest, dass wenn er pathogene bekapselte Pneumokokken, die vorher abgetötet wurden, gemeinsam mit lebenden apathogenen Pneumokokken ohne Kapsel in Mäuse injizierte, diese überraschenderweise starben. Aus ihrem Blut konnte Griffith lebende bekapselte Pneumokokken isolieren, womit gezeigt wurde, dass die Information zur Kapselbildung und damit die Pathogenität auf irgendeine Weise an die lebenden Pneumokokken weitergegeben, „transformiert“ wurde. Einige Jahre später konnten Avery *et al.* (1944) zeigen, dass es sich

bei dem „transformierenden Prinzip“ um Desoxyribonukleinsäure handelte und nicht wie bis dato angenommen um Proteine (Avery *et al.*, 1944). Damit wurde DNA als Träger der Erbinformation identifiziert.

Der Zustand, der es Bakterien ermöglicht DNA aus der Umgebung aufzunehmen wird als Kompetenz bezeichnet. *S. pneumoniae* ist ein Bakterium, das medienabhängig im Laufe seines exponentiellen Wachstums natürlicherweise Kompetenz entwickelt, die bei Eintritt in die Stationärphase wieder verschwindet. Seit ihrer Entdeckung war die Kompetenz von Pneumokokken und ihre Regulation Mittelpunkt intensiver Forschungen und ist daher gut untersucht, wenn auch nicht vollständig verstanden. Die Kompetenzinduktion in *S. pneumoniae* wird von einem autokatalytischen Quorum sensing-System gesteuert. Dieses besteht aus dem Zweikomponentensystem ComDE, dem Kompetenzpheromon CSP und dem ABC-Transporter ComAB. ComAB exportiert das sogenannte Pre-CSP, das von dem Gen *comC* kodiert wird (Hui *et al.*, 1995). Durch gleichzeitige Abspaltung des N-terminalen Leader-Peptids entsteht reifes CSP mit einer Länge von 17 Aminosäuren (Håvarstein *et al.*, 1995). Erreicht die Konzentration von CSP in der Umgebung einen bestimmten Schwellenwert, so kommt es zur Stimulation von ComD und der Phosphorylierung von ComE (Håvarstein *et al.*, 1996; Pestova *et al.*, 1996). ComE wird dadurch aktiviert und steuert die Expression einer Reihe von Genen unter denen sich auch *comCDE* und *comAB* befinden (Ween *et al.*, 1999). Dabei kommt es zu einer autokatalytischen Verstärkung des Regulationsloops. Weitere Gene, die als Teil des ComE-Regulons identifiziert wurden, sind die beiden *comX*-Gene *comX1* und *comX2*, sowie *comW* und *comM* (Lee und Morrison, 1999; Luo *et al.*, 2004; Håvarstein *et al.*, 2006). Die *comX*-Gene kodieren für einen alternativen Sigmafaktor, ComX oder  $\sigma^X$ , der offenbar durch ComW stabilisiert und aktiviert wird (Luo und Morrison, 2003; Sung und Morrison, 2005). ComX steuert die Expression einer Vielzahl von weiteren Genen, darunter unter anderem auch Gene, die für die Transformation essentiell sind, da sie für Komponenten des DNA-Aufnahmekomplexes und der DNA-Integration kodieren (Peterson *et al.*, 2004; Claverys *et al.*, 2009). ComX stellt also die Verbindung zwischen dem CSP-abhängigen Quorum sensing-System und der Kompetenz dar (Luo *et al.*, 2003).

Aufgrund ihrer zeitlichen Expression nach künstlicher Induktion mit CSP werden die Gene des ComE-Regulons als „frühe Kompetenzgene“ bezeichnet, während ComX die Expression der „späten Kompetenzgene“ kontrolliert. In zwei Transkriptomstudien konnten insgesamt 124 (Peterson *et al.*, 2004) bzw. 105 Gene (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004) als CPS-induziert

identifiziert werden, was etwa 6 % des Gesamtgenoms entspricht. Unter den 91 Genen, die in beiden Studien vorkamen, gehörten 17 zu den frühen und 60 zu den späten Kompetenzgenen (Claverys *et al.*, 2006). Die meisten dieser Gene sind für eine funktionelle Transformierbarkeit verzichtbar, haben also offenbar andere physiologische Funktionen. Für den Zustand, in dem das ComE- und ComX-Regulon aktiviert ist, wurde der Begriff „X-state“ eingeführt, um ihn als neutralen Begriff von der reinen Kompetenz abgrenzen zu können (Claverys *et al.*, 2006). Für einige CSP-induzierbare Gene, die offensichtlich nicht für die Kompetenz an sich benötigt werden, konnte mittlerweile gezeigt werden, dass sie für die Allolyse von Bedeutung sind. Bei der Allolyse, auch „Fraticide“ oder „Brudermord“ genannt, handelt es sich um die Lyse nicht-kompetenter Zellen innerhalb einer Kultur durch kompetente Zellen (Steinmoen *et al.*, 2003). Die späten Kompetenzgene *lytA*, *cbpD* und *cibAB*, die für das Hauptautolysin von *S. pneumoniae*, sowie eine Mureinhydrolase und ein Zwei-Peptid Bacteriocin kodieren, wurden als bedeutsam für die Allolyse identifiziert (Guiral *et al.*, 2005; Kausmally *et al.*, 2005; Håvarstein *et al.*, 2006). Vor Lyse geschützt werden die kompetenten *S. pneumoniae*-Zellen dabei offenbar durch das Immunitätsprotein ComM, das durch ein frühes Kompetenzgen exprimiert wird, sowie durch das Immunitätsprotein CibC, dessen Gen mit *cibAB* in einem Operon lokalisiert ist. Als biologische Gründe für die Allolyse wurden Vorteile für die Kultur bei der Kolonisation eines Wirtsorganismus durch die von den lysierten Zellen freigesetzten Virulenzfaktoren (z. B. Pneumolysin), oder die Bereitstellung von Nährstoffen für die nicht-lysierten kompetenten Zellen, diskutiert (Guiral *et al.*, 2005). Die Vorstellung, dass die Freisetzung von DNA durch die nicht-kompetenten Zellen den genetischen Austausch fördert, ist aufgrund der Tatsache, dass das Maximum der DNA-Freisetzung zeitlich erst erfolgt nachdem die Kompetenz bereits wieder verschwunden ist, eher unwahrscheinlich.

Die Kompetenz von *S. pneumoniae* wird durch verschiedenste Umweltbedingungen beeinflusst, darunter pH-Wert, Microaerobiosis oder bestimmte Medien (Chen und Morrison, 1987; Echenique *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003). Ebenso wurden einige zelluläre Komponenten und Regulationssysteme, wie Oligopeptid-Permeasen, Zweikomponentensysteme oder Proteasen als kompetenzregulierend beschrieben (Alloing *et al.*, 1998; Chastanet *et al.*, 2001; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Da das Kompetenzregulon einen großen Teil des Genoms umfasst und offenbar durch verschiedenste Bedingungen reguliert wird, scheint es sich bei dem X-state um einen zentralen physiologischen Zustand zu handeln.

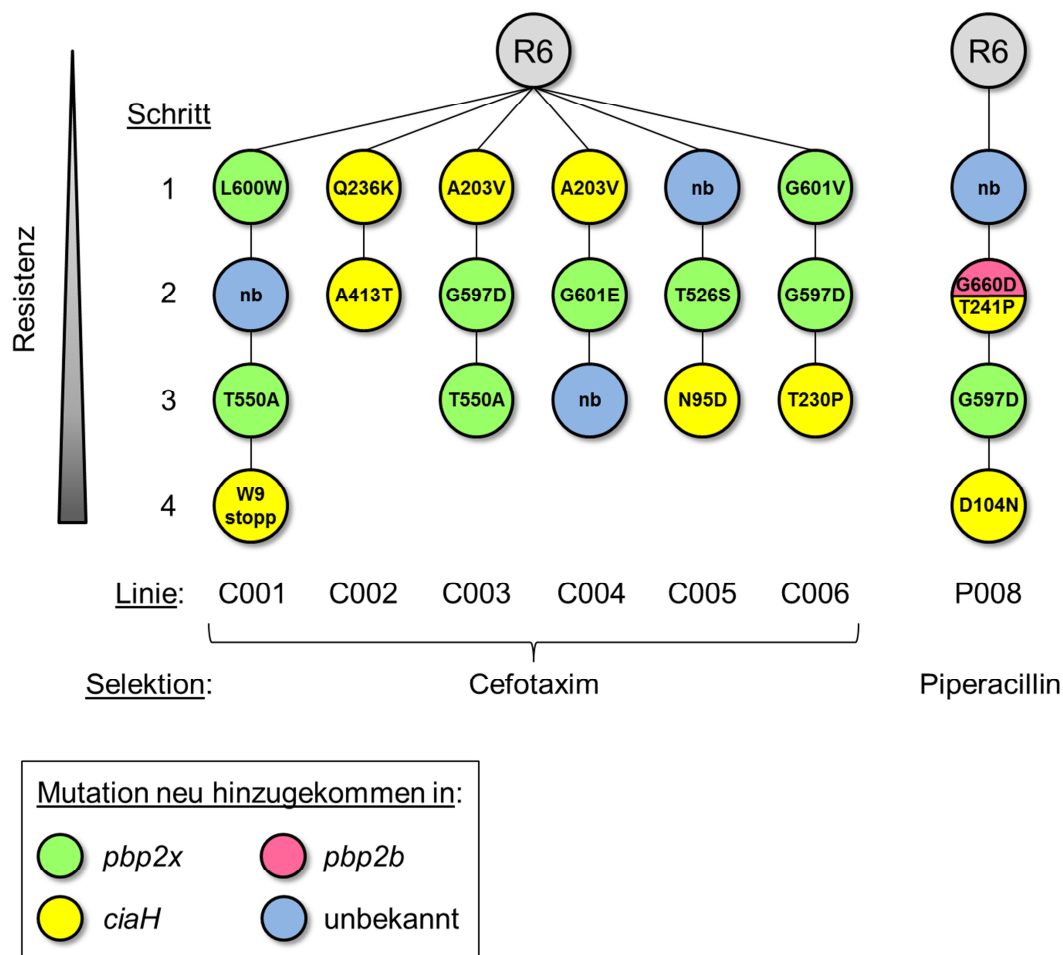
## 2.2 $\beta$ -Lactamresistenz in *Streptococcus pneumoniae* - die P- und C-Mutantenfamilie

Penicillin bzw.  $\beta$ -Lactamantibiotika sind als Therapeutikum bei der Bekämpfung pathogener Bakterien weit verbreitet. Mit der Zeit entwickelten sich jedoch in vielen Bakterien, darunter auch in Pneumokokken, vielfältige Resistenzmechanismen, die die Wirksamkeit der Antibiotika verringern oder aufheben. Um die Entstehung von Resistenzen bei *S. pneumoniae* besser verstehen zu können, wurde in den 80er Jahren versucht, Resistenzentstehung im Labor nachzustellen (Laible und Hakenbeck, 1987). *S. pneumoniae* wurde dazu einem künstlichen Selektionsdruck mit schrittweise ansteigenden Antibiotikakonzentrationen ausgesetzt. Die Antibiotika der Wahl waren zwei  $\beta$ -Lactamantibiotika, Piperacillin und Cefotaxim. Bei Piperacillin handelt es sich um ein Penicillin mit einem sehr breiten Wirkspektrum, Cefotaxim ist ein Cephalosporin der dritten Generation. Durch sukzessive Selektion entstanden mehrere Mutantenfamilien, in denen die Höhe der Resistenz mit der Anzahl der Selektionsschritte zunahm. Bezeichnet werden die einzelnen Stämme nach Anfangsbuchstaben des verwendeten Selektionsantibiotikums und einer dreistelligen Nummer, wobei die erste Nummer für den Selektionsschritt und die letzte Nummer für die Linie bzw. Familie steht. Die einzelnen Mitglieder der Mutantenfamilien wurden auf Spontanmutationen in bekannten und unbekanntem Resistenzdeterminanten hin untersucht.

In vielen Selektionsschritten der Spontanmutanten kam es zu Mutationen in den Penicillin-bindenden Proteinen (PBP), den Targets der  $\beta$ -Lactamantibiotika (Abb. 2.1). PBPs sind Enzyme der Zellwandsynthese. Sie verknüpfen durch ihre Transpeptidase- und Transglycosylaseaktivität die Untereinheiten des Peptidoglykans und bewirken so eine Vernetzung, die die Stabilität der Zellwand garantiert.  $\beta$ -Lactamantibiotika haben strukturelle Ähnlichkeit zu dem Substrat der PBPs, dem D-Alanin-D-Alanylrest der Pentapeptidkette der Peptidoglykanuntereinheiten.  $\beta$ -Lactame binden als Strukturanaloga kovalent an das katalytisch aktive Serin der PBPs, wodurch die Transpeptidierung der Mureinstränge unterbunden wird. Durch die fehlende Quervernetzung kommt es zur Instabilität der Zellhülle, was letztlich zur Lyse führen kann (Tipper und Strominger, 1965). *S. pneumoniae* hat insgesamt sechs verschiedene PBPs, die sich in ihrem Molekulargewicht und ihren enzymatischen Aufgaben unterscheiden.

Neben den Mutationen in verschiedenen PBPs, die als Resistenzdeterminanten bereits aus klinischen *S. pneumoniae*-Isolaten bekannt waren, wurden in den C- und P-Mutantenfamilien auch bislang unbekanntem Nicht-PBP-Resistenzdeterminanten identifiziert (Hakenbeck *et al.*,

1999). Mehrere der laborerzeugten Spontanmutanten trugen Mutationen in einem Gen, das für eine Histidinkinase eines Zweikomponentensystems kodierte (Abb. 2.1) (Guenzi *et al.*, 1994). Untersuchungen der Mutation der Mutante C306 in besagtem Gen zeigten neben einer erhöhten Cefotaximresistenz noch eine gemeinsam auftretende Reduktion der Kompetenz. Aufgrund dessen wurde die Histidinkinase CiaH, für „competence induction and altered cefotaxime susceptibility“, genannt und ihr zugehöriger Responseregulator CiaR. Damit war CiaRH das erste Zweikomponentensystem, das in *S. pneumoniae* identifiziert wurde. Die Untersuchungen zeigten zudem, dass die *ciaH*-Mutation in C306 einen aktivierenden Effekt auf das Zweikomponentensystem hat, auf den offenbar die Resistenz und der Kompetenzphänotyp zurückgehen. Wie genau dieses Zweikomponentensystem Resistenz und Kompetenz beeinflusst, ist jedoch bis zum heutigen Tag noch weitestgehend ungeklärt.

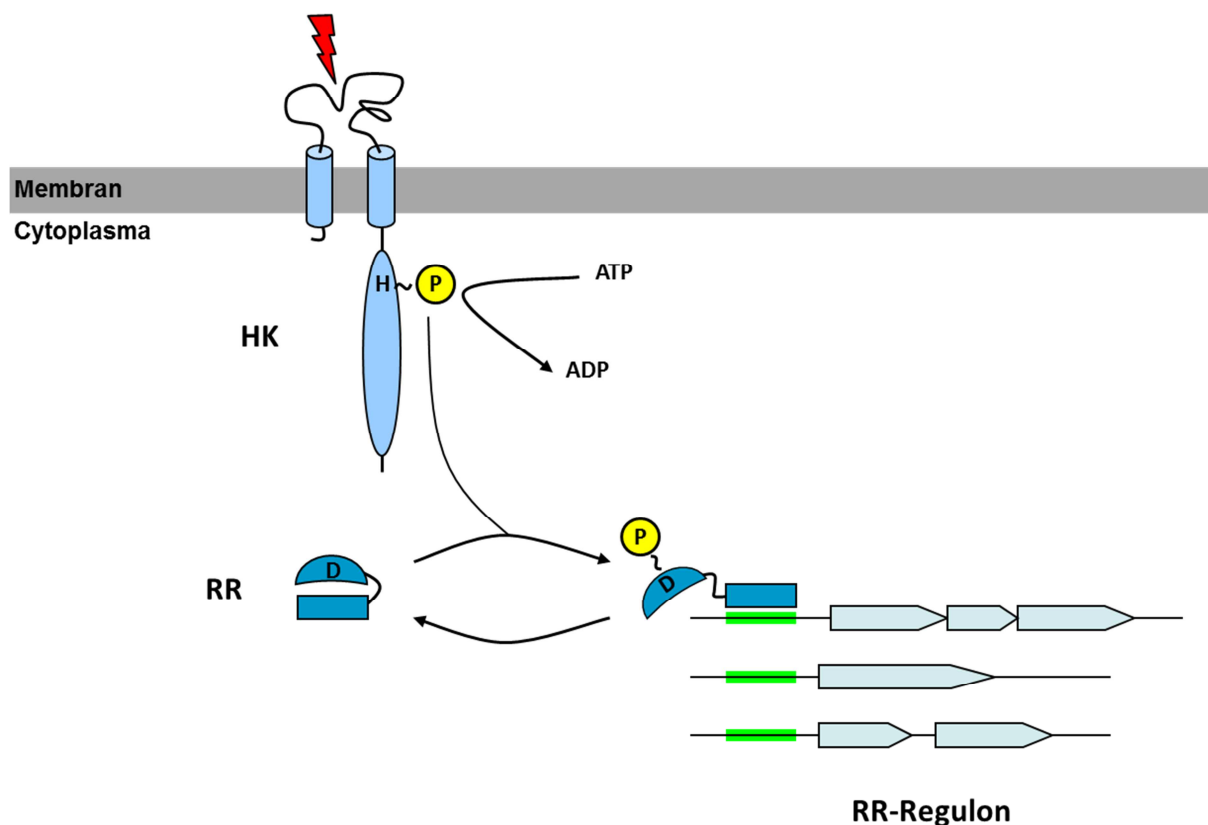


**Abb. 2.1: Schematische Darstellung der C-Mutantenfamilien C001 bis C006 (nach Zähler *et al.*, 2002) und der P-Mutantenfamilie P008.** Jeder Punkt steht für einen Stamm innerhalb einer Familie. Die Stämme wurden ausgehend von *S. pneumoniae* R6 in bis zu vier Schritten durch ansteigende Cefotaximkonzentrationen selektiert. Die Farbe kennzeichnet die Resistenzdeterminante, in der im jeweiligen Selektionsschritt eine neue Punktmutation identifiziert werden konnte, die der Vorgänger noch nicht enthielt. In den Punkten steht der durch die Mutation vermittelte Aminosäureaustausch. nb = nicht bestimmt

## 2.3 Zweikomponentensysteme

Um zu überleben müssen Bakterien in der Lage sein, schnell auf eine sich verändernde Umwelt, zu reagieren. Veränderungen in Temperatur, pH-Wert, der Verfügbarkeit von Nährstoffen oder der Anwesenheit von schädlichen Verbindungen bedürfen einer Anpassung von Stoffwechsel, Zellintegrität oder Abwehrmechanismen (Mascher *et al.*, 2006b). Eine Möglichkeit extrazelluläre Signale in eine intrazelluläre Antwort umzusetzen ist durch Zweikomponentensysteme (TCS) gegeben. TCS sind weit verbreitet und kommen selbst in Eukaryonten und Archaeen vor. Am häufigsten findet man sie jedoch in Bakterien, wo sie nahezu überall verbreitet sind (West und Stock, 2001). Klassische TCS bestehen aus einer Membranständigen Histidinkinase (HK), die einen bestimmten Reiz wahrnimmt und einem cytoplasmatisch lokalisierten Responseregulator (RR), der die physiologische Antwort generiert (Abb. 2.2). Die HK besitzt in der Regel einen variablen N-Terminus, der als Sensordomäne fungiert. Die Detektion eines Stimulus, der ein chemischer, aber auch ein physikalischer Reiz sein kann, führt an der intrazellulären C-terminalen Domäne der HK zur Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrests. Der C-Terminus der meisten HK ist konserviert und besteht aus der DHP-Domäne (dimerization and histidine phosphotransfer) in der das konservierte Histidin liegt, sowie aus der CA-Domäne (catalytic and ATP binding), die die ATP-abhängige Phosphorylierung katalysiert. Für einige HK konnte gezeigt werden, dass sie als Dimer aktiv sind, wobei es sowohl für eine Phosphorylierung der Untereinheiten *in cis*, als auch *in trans* Beispiele gibt (Yang und Inouye, 1991; Casino *et al.*, 2009).

Der energiereich an das Histidin gebundene Phosphatrest der HK wird auf ein konserviertes Aspartat in der N-terminalen Receiver-Domäne des zugehörigen RR übertragen. Durch diese Phosphorylierung wird der RR in seine aktive Konformation überführt und kann über die C-terminale Effektor-Domäne seine physiologische Funktion ausüben. Diese besteht meist in einer Interaktion mit der DNA und der transkriptionellen Regulation eines bestimmten Sets von Genen, das die zelluläre Antwort auf den Reiz generiert. In einigen Fällen führt die Aktivierung des RR aber auch zu Protein-Protein-Interaktionen. Abgeschaltet wird das System durch Dephosphorylierung des RR. Einige RR haben eine Autophosphataseaktivität, aber auch HK sind oftmals bifunktional und können neben der Phosphorylierung auch die Dephosphorylierung des zugehörigen RR katalysieren (Stock *et al.*, 2000). Für die Funktionalität des TCS ist die Dephosphorylierung des RR genauso wichtig wie die Phosphorylierung, da es die Reversibilität des Systems gewährleistet und nur so ein Signal differenziert wahrgenommen werden kann.



**Abb. 2.2: Beispielhafte Darstellung eines klassischen Zwei-Komponenten-Systems.** Die membranständige Histidinkinase (HK) nimmt einen Reiz (rot) wahr, worauf es intrazellulär zu einer ATP-abhängigen Phosphorylierung eines konservierten Histidinrests (H) kommt. Der energiereich gebundene Phosphatrest (P) wird auf ein konserviertes Aspartat (D) des Responseregulators (RR) übertragen, der daraufhin in seine aktive Konformation übergeht und die Transkription bestimmter Gene steuert, indem er an eine bestimmte Erkennungssequenz (grün) im Promotorbereich bindet.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Vorstellung eines linearen Systems, das die Anwesenheit eines Signals über die Sensordomäne der HK wahrnimmt und in eine Phosphorylierung des RR als Antwort umsetzt, ein zu einfaches Modell zu sein scheint. Es gibt Beispiele, in denen Signale nicht über die Sensordomäne, sondern über die Transmembranregion detektiert oder durch ein membranständiges Hilfsprotein vermittelt werden. Ebenso wurden vermehrt Regulatorproteine identifiziert, die mit der HK oder dem RR interagieren und deren Phosphorylierungsstatus beeinflussen können. Auf diese Weise können andere Signale oder Regulationswege auf verschiedenste Weise in ein TCS integriert werden (Mitrophanov und Groisman, 2008; Buelow und Raivio, 2010; Krell *et al.*, 2010). Die Detektion eines Signals führt auch nicht in allen Fällen zu einer erhöhten Phosphorylierung des RR. Manche RR liegen auch ohne das Zutun der HK in einem phosphorylierten Zustand vor und ein eingehender Stimulus führt durch die Aktivierung der Phosphataseaktivität der



zugehörigen HK zu einer Abnahme der RR-Aktivität (Castelli *et al.*, 2000). Als Phosphodonator für eine HK-unabhängige Phosphorylierung von RR könnten kleine energiereiche Metabolite, allen voran Acetyl-Phosphat, dienen, wodurch zusätzlich der Stoffwechselstatus einen Einfluss auf die TCS-Aktivität nehmen kann (Wolfe, 2005; Wolfe, 2010).

## 2.4 Das Zweikomponentensystem CiaRH und sein Regulon

CiaRH ist eines von insgesamt 13 TCS in *S. pneumoniae* (Lange *et al.*, 1999). Seit seiner Entdeckung war CiaRH schon häufig Teil wissenschaftlicher Studien und es konnte gezeigt werden, dass dieses TCS an der Regulation vieler Phänotypen in *S. pneumoniae* beteiligt ist: So führt eine stärkere Aktivierung von CiaRH zum Verlust der natürlichen Transformierbarkeit (Guenzi *et al.*, 1994), während die Inaktivierung von CiaRH zu Kompetenzentwicklung unter verschiedensten kompetenzinhibierenden Bedingungen führt. Dazu zählen beispielsweise bestimmte Medien, wie Todd Hewitt broth (THB) oder brain heart infusion (BHI), ein niedriger pH-Wert, verringerte Sauerstoffkonzentrationen oder Maleat anstatt Phosphat als Pufferkomponente (Giammarinaro *et al.*, 1999; Echenique *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003; Tsui *et al.*, 2010).

Ebenso zeigt sich bei einem aktivierten CiaRH-System eine erhöhte Restistenz gegen  $\beta$ -Lactamantibiotika (Guenzi *et al.*, 1994; Zähler *et al.*, 2002). Diesem Umstand verdankt CiaRH seine Entdeckung, da bei einer Untersuchung  $\beta$ -lactamresistenter Spontanmutanten Punktmutationen im Histidinkinasegen *ciaH* identifiziert werden konnten (vgl. Kap. 2.2).

Es konnte auch gezeigt werden, dass ein aktiviertes CiaRH-System eine bessere Widerstandsfähigkeit gegen eine induzierte Lyse durch Desoxycholat oder Zellwand-Inhibitoren wie Fosfomycin, D-Cycloserin, Bacitracin, Piperacillin und Vancomycin verleiht (Giammarinaro *et al.*, 1999; Mascher *et al.*, 2006a; Moscoso *et al.*, 2010). Auch am Schutz von *S. pneumoniae* vor säureinduzierter Lyse ist CiaRH beteiligt (Pinas *et al.*, 2008). Ein inaktiviertes CiaRH-System führt dagegen zu einem Wachstumsverlauf mit einer verkürzten Stationärphase und einer früher einsetzenden Autolyse (Mascher *et al.*, 2006a).

Auch für die Virulenz hat sich das CiaRH-System als bedeutsam herausgestellt. So sind *S. pneumoniae*-Stämme mit inaktiviertem CiaRH-TCS schlechter in der Lage Nasopharynx oder Lunge zu besiedeln und ins Blut überzutreten (Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a).

CiaRH ist ein klassisches Zweikomponentensystem und zeigt Ähnlichkeit zu dem TCS EnvZ/OmpR aus *Escherichia coli*. Die Histidinkinase CiaH besitzt zwei putative Transmembrandomänen zwischen denen eine extrazelluläre Domäne, möglicherweise die Sensordomäne, liegt. C-terminal schließt sich ein cytoplasmatisch lokalisierter Bereich an, der starke Homologie zu der DHP- und CA-Domäne anderer Histidinkinasen hat. Das konservierte Histidin sitzt an Position 226. Der Responseregulator CiaR ist cytoplasmatisch lokalisiert und fungiert als Transkriptionsregulator. Das Bindemotiv von CiaR ist ein direkter Repeat mit der Konsensussequenz TTTAAG-N5-TTTAAG der in den meisten Fällen ca. 10 bp upstream der -10-Region lokalisiert ist (Halfmann *et al.*, 2007b). Bislang konnten 16 CiaR-regulierte Promotoren identifiziert werden, die die Expression von 30 Genen steuern, darunter *ciaRH* selbst (Tab. 2.1) (Halfmann, 2008).

Die stärksten CiaR-aktivierten Promotoren steuern die Expression von fünf kleinen regulatorischen RNAs, den csRNAs („*cia*-dependent *s*mall *R*NAs“). Die csRNAs waren die ersten kleinen regulatorischen RNAs, die in *S. pneumoniae* identifiziert wurden. Sie werden von den Genen *ccnA-E* („*cia*-controlled *n*on-coding RNA“) kodiert und spielen eine Rolle bei der Autolyse und möglicherweise auch bei der Kompetenz von *S. pneumoniae* (Halfmann *et al.*, 2007b; Tsui *et al.*, 2010).

Ein weiteres CiaR-reguliertes Operon liegt in unmittelbarer Nähe zum Replikationsursprung und enthält die Gene *htrA* und *parB*. *HtrA* (*h*igh *t*emperature *r*equirement *A*) kodiert für eine Serinprotease, die an der Zelloberfläche lokalisiert vorliegt (Sebert *et al.*, 2005). Ihr wird eine bedeutende Rolle bei der Virulenz, ebenso wie bei der Kompetenz von *S. pneumoniae* zugesprochen (Ibrahim *et al.*, 2004a; Ibrahim *et al.*, 2004b; Kowalko und Sebert, 2008). *ParB*, das gemeinsam mit *htrA* in einem Operon transkribiert wird, zeigt Homologie zu Segregationsproteinen, wie sie beispielsweise in *Bacillus subtilis* vorkommen. Dort sind sie bei der Replikation an der Aufteilung von Plasmiden oder dem Chromosom in die Tochterzellen beteiligt (Leonard *et al.*, 2005). In *S. mutans* wurde ein Einfluss von *parB* auf die Kompetenz beobachtet (Ahn *et al.*, 2005). In *S. pneumoniae* selbst, weiß man dagegen noch recht wenig über *parB* und seine Funktion.

Zum CiaR-Regulon gehören des Weiteren Gene, die am Zuckerstoffwechsel beteiligt sind, wie das *man*- und das *mal*-Operon. Die Gene *manLMN* werden von dem einzigen negativ durch CiaR regulierten Promotor kontrolliert und kodieren für ein Phosphotransferasesystem (PTS), das in Streptokokken Mannose, aber auch Glucose transportiert (Abranches *et al.*, 2003). Zudem ist es an der Katabolitrepression, einem zentralen Stoffwechsel-

Regulationssystem, beteiligt. *MalM* und *malP* kodieren für eine Amylomaltase und eine Maltosephosphorylase, also für Enzyme, die für die Maltose- und Maltodextrinverwertung benötigt werden (Nieto *et al.*, 2001).

Eine weitere Gruppe des CiaR-Regulons umfasst Gene, die an der Zellwandmodifikation beteiligt sind. Dazu gehören das *licI*-Operon mit den Genen *licABC-tarIJ* und das *dlt*-Operon. Das *licI*-Operon ist für *S. pneumoniae* essentiell und an der Bildung von cholinsubstituierten Teichonsäuren beteiligt. Die Genprodukte von *tarI* und *tarJ* synthetisieren Cytidindiphosphat(CDP)-Ribitol, das als Vorstufe für die Teichonsäuren und für Kapselpolysaccharide benötigt wird (Baur *et al.*, 2009). *LicA*, *licB* und *licC* sind für die Aufnahme von Cholin verantwortlich und für seine Modifikation zu CDP-Cholin, das Substrat für die Cholinsubstitution der Teichonsäuren (Zhang *et al.*, 1999). *DltXABCD* kodieren für Enzyme, die für die Substitution der Teichonsäuren mit D-Alanin benötigt werden. In *S. pneumoniae* R6 ist dieses Operon jedoch nicht funktionell. Aufgrund einer Mutation in *dltA* kommt es hier zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation, weshalb der Stamm R6 kein D-Alanin in seinen Teichonsäuren besitzt (Kovács *et al.*, 2006).

Neben den bereits genannten Genen befinden sich noch ein Acetylerasegen (*axe*), das möglicherweise an der Cefotaximresistenz beteiligt ist (Mascher, 2001), ein Peptidyl-Prolylisomerasegen (*ppmA*), das offenbar bei der Virulenz eine Rolle spielt (Overweg *et al.*, 2000), sowie mehrere Gene, die für hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion kodieren, unter den Genen des CiaR-Regulons.

**Tab. 2.1: CiaR-regulierte Gene nach Halfmann (2008)**

spr Nummer / Gen	Genprodukt	Funktion Genprodukt	Lokalisation
<b>stark CiaR-abhängige Gene</b>			
ccnC <sup>a</sup> (vor spr0022)	csRNA3	nicht-codierende, regulatorische RNA	cytoplasmatisch
ccnE <sup>a</sup> (vor spr0219)	csRNA5	nicht-codierende, regulatorische RNA	cytoplasmatisch
ccnA <sup>a</sup> (vor spr0238)	csRNA1	nicht-codierende, regulatorische RNA	cytoplasmatisch
ccnB <sup>a</sup> (vor spr0238)	csRNA2	nicht-codierende, regulatorische RNA	cytoplasmatisch
ccnD <sup>a</sup> (vor spr0240)	csRNA4	nicht-codierende, regulatorische RNA	cytoplasmatisch
spr0931	Spr0931	Konserviertes hypothetisches Protein	extrazellulär
spr2045	HtrA	Serinprotease	extrazellulär
spr2046	ParB	Chromosomen-Segregationsprotein	cytoplasmatisch
spr1538a <sup>a</sup>	Spr1538a	hypothetisches Protein	cytoplasmatisch
<b>schwach CiaR-abhängige Gene</b>			
spr0707	CiaR	Responseregulator	cytoplasmatisch
spr0708	CiaH	Histidinkinase	Membran
spr0782	Spr0782	konserviertes hypothetisches Protein	cytoplasmatisch
spr0884	PpmA	Peptidyl-Prolylisomerase	extrazellulär
spr1149	TarI <sup>b</sup>	CTP:Phosphoribitol Cytidyltransferase	cytoplasmatisch
spr1148	TarJ <sup>b</sup>	Alkoholdehydrogenase	cytoplasmatisch
spr1147	LicA	Cholinkinase	cytoplasmatisch
spr1146	LicB	Transportprotein	Membran
spr1145	LicC	CTP:Phosphocholin Cytidyltransferase	cytoplasmatisch
spr1538	Axe	Acetylerase	cytoplasmatisch
spr1787	Spr1787	konserviertes hypothetisches Protein	Membran
spr1917	MalM	Amylomaltase	cytoplasmatisch
spr1916	MalP	Maltosephosphorylase	cytoplasmatisch
spr1982a <sup>a</sup>	DltX	konserviertes hypothetisches Protein	Membran
spr1982	DltA (Dcl)	D-Alanyl-Carrierprotein Ligase	cytoplasmatisch
spr1981	DltB	Transportprotein	Membran
spr1980	DltC (Dcp)	D-Alanyl-Carrierprotein	cytoplasmatisch
spr1979	DltD	Beteiligt an Ligation Dcp-D-Alanin	Membran
<b>negativ regulierte Gene</b>			
spr0261	ManL	Mannose/Glucose-PTS	Membran
spr0260	ManM		Membran
spr0259	ManN		cytoplasmatisch

<sup>a</sup> nicht annotiert bei Hoskins *et al.*, 2001<sup>b</sup> Baur *et al.*, 2009

Das Signal, das durch CiaRH in *S. pneumoniae* detektiert wird, ist bislang unbekannt. Viele Substanzen und Bedingungen darunter  $\text{Ca}^{2+}$ , Phosphat oder  $\text{O}_2$  wurden als Stimuli dieses TCS diskutiert (Giammarinaro *et al.*, 1999; Echenique *et al.*, 2000). In *Streptococcus mutans* wird CiaRH nachweislich durch  $\text{Ca}^{2+}$  reprimiert, wobei jedoch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Regulation durch ein kleines, gemeinsam mit *ciaRH* transkribiertes Peptid vermittelt wird, das in *S. pneumoniae* fehlt (He *et al.*, 2008). Auch durch Zugabe von Zellwand-Antibiotika wie Penicillin oder Vancomycin wird das CiaRH-System in Pneumokokken aktiviert (Haas *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2007). Aufgrund dessen werden generelle Veränderungen der Zellhülle ebenfalls als mögliches Signal für CiaRH postuliert (Hakenbeck *et al.*, 1999; Zähler *et al.*, 2002; Jordan *et al.*, 2008). Zudem ist durch den Aktivitätsanstieg des CiaRH-Systems, den man zu Beginn der Stationärphase beobachten kann, auch ein wachstumsphasenabhängiger Stimulus denkbar (Halfmann, 2008).

Neben dem Signal selbst, ist auch die Art und Weise, wie der Stimulus die Aktivität von CiaH beeinflusst noch nicht abschließend geklärt. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass CiaH offenbar bifunktional ist, also als Phosphatase oder als Kinase agieren kann, und dass CiaR auch in Abwesenheit von CiaH phosphoryliert vorliegt (Halfmann *et al.*, 2011). Somit könnte ein Signal theoretisch sowohl die Kinase- als auch die Phosphataseaktivität der Histidinkinase CiaH verändern.

## 2.5 Die csRNAs - kleine regulatorische RNAs

Die csRNAs, die in *S. pneumoniae* unter der Kontrolle des Responseregulators CiaR stehen, zählen zu den kleinen, regulatorischen RNAs. Im Gegensatz zu den klassischen Vertretern der RNAs in der Zelle, den rRNAs, mRNAs und tRNAs, wurden sRNAs („small RNAs“) erst vor relativ kurzer Zeit entdeckt, ihre offensichtlich weite Verbreitung und ihre vielfältigen physiologischen Aufgaben rücken sie jedoch vermehrt ins Interesse der Wissenschaft. Mittlerweile geht man davon aus, dass 10-20 % der bakteriellen Gene für regulatorische RNAs codieren (Romby und Charpentier, 2010). In *S. pneumoniae* konnten, inklusive der fünf csRNAs, bislang 14 sRNAs nachgewiesen werden, jedoch kann man davon ausgehen, dass mit den bisherigen Untersuchungen nicht alle existierenden sRNAs erfasst wurden (Tsui *et al.*, 2010).

Die Funktionsweise der bislang bekannten bakteriellen sRNAs zeigt ein hohes Maß an Variabilität. Einige sRNAs binden an Proteine und beeinflussen deren Funktion. So wird beispielsweise in *Escherichia coli* der Regulator CsrA, ein RNA-Bindeprotein, das mit mRNAs von Genen des Zuckerstoffwechsels interagiert, durch die sRNA CsrB inhibiert. CsrB bindet an CsrA und blockiert dadurch die Bindung der anderen CsrA-Substrate (Liu *et al.*, 1997).

Die meisten sRNAs jedoch wirken regulatorisch auf mRNAs und beeinflussen deren Stabilität oder die Translationsinitiation. Doch auch hier gibt es verschiedene Mechanismen: Viele sRNAs werden von intergenen Bereichen ausgehend transkribiert und regulieren mRNAs, deren Gene an anderen Loci des Genoms liegen. Diese sRNAs weisen nur kurze komplementäre Bereiche zu ihren Ziel-mRNAs auf und können mit mehreren verschiedenen Targets interagieren. Die Interaktion kann den Bereich um das Start-Codon und die Shine-Dalgarno-Region betreffen und die Ribosomenbindung und damit die Translation hemmen. Ebenso kann die Interaktion in der 5'-untranslatierten Region (UTR) erfolgen und aktivierend wirken. So bindet beispielsweise in *Streptococcus pyogenes* die sRNA FasX an die 5'-UTR der *ska*-mRNA und erhöht deren Stabilität und dadurch die Menge an translatierter Streptokinase SKA (Ramirez-Peña *et al.*, 2010).

Es gibt auch sRNAs, die einen kleinen offenen Leserahmen („open reading frame“, ORF) enthalten. So fungiert RNAlII aus *Staphylococcus aureus* sowohl als mRNA des Hämolytins  $\delta$ , als auch als regulatorische RNA, die an die Translationsinitiationsregion (TIR) einer Vielzahl von Virulenzfaktoren bindet und die Bindung der Ribosomen behindert, sowie den Abbau des Komplexes durch die Ribonuclease III initiiert (Romby und Charpentier, 2010).

Des Weiteren gibt es sRNAs, die gemeinsam mit ihrer Ziel-mRNA im selben DNA-Locus liegen, aber in unterschiedliche Richtungen transkribiert werden. Dadurch weisen mRNA und sRNA über weite Bereiche absolute Komplementarität auf. In *Bacillus subtilis* überlappen die Gene der sRNA RatA und des toxischen Peptids TxpA und werden gleichzeitig transkribiert. RatA bindet als Antitoxin an die TxpA-mRNA und führt vermutlich zu deren Abbau (Silvaggi *et al.*, 2005).

Eine besondere Form der RNA-Regulation findet man in den 5'-UTRs mancher mRNAs. 5'-UTRs sind in der Lage komplexe Strukturen auszubilden, die verschiedene regulatorische Funktionen übernehmen können. So gibt es Riboswitches, die als sogenanntes RNA-Thermometer die Translation des nachfolgenden kodierenden Bereichs je nach Temperatur zulassen oder unterbinden. Ein einfaches RNA-Thermometer befindet sich auf der

*hsp17*-mRNA des Cyanobakteriums *Synechocystis* (Kortmann *et al.*, 2011). Bei niedrigen Temperaturen bildet die 5'-UTR eine Stammschleife aus, die auch die Shine-Dalgarno-Region umfasst und somit die Ribosomenbindung blockiert. Bei höheren Temperaturen schmilzt die Stammschleife auf und ermöglicht den Ribosomen den Zugang zur Ribosomenbindestelle, wodurch die Translation des Hitzeschock-Proteins Hsp17 erfolgen kann.

Die in *S. pneumoniae* identifizierten fünf csRNAs liegen in intergenen Regionen und sind nicht-kodierend, tragen also keine ORFs. *In silico*-Berechnungen sagen für die csRNAs eine 3'- und eine 5'-Stammschleife, sowie einen dazwischenliegenden ungepaarten Bereich voraus. Die Sequenzen aller fünf csRNAs tragen komplementäre Shine-Dalgarno- und Start-Codon-Bereiche, was dafür spricht, dass sie mit der TIR von mRNAs interagieren und deren Translation beeinflussen (Halfmann *et al.*, 2007b). Aufgrund der großen Homologie, die die csRNAs untereinander aufweisen, ist eine redundante Funktion vorstellbar. Regulatorische Ziele der csRNAs sind bislang noch nicht identifiziert worden, allerdings gibt es erste Hinweise auf eine Interaktion mit den mRNAs der Gene *comC* und *spr0081*. *ComC* kodiert für den Vorläufer des Kompetenzpheromons CSP und bei *Spr0081* handelt es sich um einen bislang unbekanntes ABC-Transporter (Kovács, 2009).

Untersuchungen in *S. mitis*, *S. sanguinis* und *S. oralis* konnten auch in diesen Streptokokken zwischen zwei und sechs csRNA-Gene identifizieren. Dies deutet darauf hin, dass csRNAs als Bestandteil des CiaR-Kernregulons in allen Streptokokken vertreten sind (Marx *et al.*, 2010).

Viele regulatorische RNAs, vor allem in gramnegativen Bakterien benötigen für ihre Funktionalität ein Hilfsprotein, das Hfq. Dieses Hilfsprotein und seine Homologe fungieren als RNA-Chaperon und unterstützen die sRNA-mRNA-Bindung (Chao und Vogel, 2010). In den meisten grampositiven Bakterien jedoch ist die Rolle von Hfq nicht eindeutig geklärt und nimmt möglicherweise andere regulatorische Funktionen ein (Bohn *et al.*, 2007). In Enterokokken, Laktokokken, Laktobacillen und Streptokokken dagegen sind keine Hfq-Homologe im Genom zu finden (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Möglicherweise wird hier die Funktion von Hfq durch andere, bislang unbekannte Proteine übernommen oder die regulatorischen RNAs dieser Bakterien, darunter auch die csRNAs, können ohne einen Hilfsfaktor ihre Funktion ausüben (Marx *et al.*, 2010).

## 2.6 HtrA - eine Serinprotease der HtrA-Proteinfamilie

Das wohl am besten untersuchte Gen des CiaR-Regulons ist *htrA*, ein Gen, das wie die csRNAs zu den am stärksten CiaR-abhängigen Genen zählt (Tab. 2.1). *HtrA* kodiert für eine Serinprotease der HtrA-Familie und liegt in *S. pneumoniae* extrazellulär, aber membranassoziiert vor (Sebert *et al.*, 2005). Es gibt Daten, die auf eine Beteiligung von HtrA an der Kompetenz, der Virulenz, der Bacteriocinproduktion und dem Wachstum unter Stressbedingungen in Pneumokokken schließen lassen: So konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von HtrA den Kompetenzdefekt, der durch eine konstitutive Aktivierung von CiaH (CiaH-T230P) verursacht wird, teilweise aufheben kann (Sebert *et al.*, 2005). Dagegen konnten andere Untersuchungen einen inhibitorischen Effekt von HtrA auf die Kompetenz beobachten (Ibrahim *et al.*, 2004b). In einem Serotyp 6A-*S. pneumoniae*-Stamm wurde zudem ein negativer Einfluss von HtrA auf die Produktion des Zwei-Peptid Bacteriocins Pneumocin MN beobachtet (Dawid *et al.*, 2009). Die Gene dieses Bacteriocins (*blpMN*) werden von einem Zweikomponentensystem reguliert, das durch das Peptidpheromon BlpC stimuliert wird. Ein Abbau von BlpC durch HtrA wurde als mögliche Ursache für den Einfluss von HtrA auf Pneumocin MN diskutiert. Einen besonders deutlichen Effekt zeigt das Fehlen von HtrA bei der Virulenz der pathogenen *S. pneumoniae*-Stämme D39 und TIGR4. Durch die Deletion von *htrA* kam es in Studien zu Pneumonie und Bakteriämie in Mäusen zu einem kompletten Virulenzverlust bei D39 und einer deutlich reduzierten Virulenz von TIGR4 (Ibrahim *et al.*, 2004a; Ibrahim *et al.*, 2004b). Ebenso zeigten diese Stämme ein deutlich verlangsamtes Wachstum bei erhöhten Temperaturen (40°C) und eine geringere Widerstandsfähigkeit gegen oxidativen Stress. Auch wenn HtrA in *S. pneumoniae* schon recht gut untersucht ist, so weiß man doch noch wenig über seine genaue Wirkungsweise, da Struktur oder natürliche Substrate noch unbekannt sind.

HtrA zählt zu einer weit verbreiteten Familie von trypsinähnlichen Serinproteasen. Diese Proteasen kommen bei grampositiven und gramnegativen Bakterien ebenso vor, wie in Pflanzen und Säugetieren. Sie sind oftmals extrazellulär bzw. im Periplasma lokalisiert und übernehmen dort in vielen Fällen die Funktion der Proteinqualitätskontrolle. Im Gegensatz zu den Proteasen wie ClpXP oder Lon, die die Qualitätskontrolle im Cytoplasma übernehmen, arbeiten die HtrA-Proteasen ATP-unabhängig (Kim und Kim, 2005).

HtrA-Proteasen weisen untereinander einen, bezüglich der Domänenstruktur, ähnlichen Aufbau auf. Am N-Terminus befindet sich oftmals ein kurzer hydrophober Bereich, der als



Signalpeptid oder Membrananker fungieren kann, gefolgt von der Proteasedomäne und einer oder mehrerer PDZ-Domänen (post-synaptic density protein, *disc large*, *zo-1* protein). Die Proteasedomäne enthält drei konservierte katalytisch aktive Aminosäuren, ein Histidin, ein Serin und ein Aspartat (Skorko-Glonek *et al.*, 1995). Die PDZ-Domänen sind am C-terminalen Ende der HtrA-Serinproteasen lokalisiert und variieren in ihrer Anzahl. HtrA von *S. pneumoniae* besitzt, wie die Homologe der meisten grampositiven Bakterien, nur eine PDZ-Domäne, während viele HtrA-Homologe gramnegativer Bakterien zwei PDZ-Domänen enthalten (Jones *et al.*, 2001). PDZ-Domänen sind weit verbreitete Strukturmodule, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind. Es wird vermutet, dass die PDZ-Domänen an der Substratbindung von HtrA beteiligt sind und bei der Interaktion der HtrA-Untereinheiten während der Oligomerisierung eine Rolle spielen. An der HtrA-Protease DegP in *E. coli*, die strukturell und funktionell gut untersucht ist, konnte zudem gezeigt werden, dass der Oligomerisierungszustand einen regulatorischen Einfluss auf ihre enzymatische Aktivität hat (Jiang *et al.*, 2008; Krojer *et al.*, 2010). Die Oligomerisierung und dadurch die Aktivität wird durch Ligandenbindung an die PDZ-Domäne stimuliert.

Enzymatisch betrachtet besitzen Proteine der HtrA-Familie offenbar sowohl Protease-, als auch Chaperonaktivität, wobei das Umschalten von einer Funktion zur anderen temperaturabhängig ist (Spiess *et al.*, 1999). Dass es sich bei HtrA-Homologen tatsächlich um Serinproteasen handelt, wurde durch proteolytischen Abbau von  $\beta$ -Casein experimentell bestätigt (Lipinska *et al.*, 1990). Wie für HtrA in *S. pneumoniae* ist jedoch für die meisten HtrA-Proteasen das natürliche Substrat noch unbekannt. Bei der Proteinqualitätskontrolle durch HtrA geht man davon aus, dass allgemein falsch oder unvollständig gefaltete Proteine als Substrat erkannt werden, möglicherweise durch Exposition ungeordneter hydrophober Bereiche, die sich normalerweise im Innern eines Proteins befinden (Kolmar *et al.*, 1996). Bei einigen Bakterien wurden jedoch auch spezifische Substrate identifiziert. In *E. coli* wird das Colicin A Lyseprotein, sowie die  $\alpha$ -Amylase MalS durch DegP neu gefaltet oder abgebaut (Cavard *et al.*, 1989; Spiess *et al.*, 1999). In dem Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* hat HtrA sogar eine prozessierende Funktion bei einigen exportierten Proteinen. So wird die Muramidase AcmA durch HtrA in zwei kleinere aktive Formen gespalten, die zwar nach wie vor die Zellwand anderer Bakterien degradieren können, aber nicht mehr die von *L. lactis* selbst (Poquet *et al.*, 2000). Zudem ist HtrA von *L. lactis* in der Lage, das Pro-Peptid der Nuclease NucA von *Staphylococcus aureus* abzuspalten. In Streptokokken gibt es bislang nur in *S. pyogenes* Hinweise auf ein natürliches Substrat. Dort scheint HtrA an der Prozessierung der Virulenzfaktoren SpeB und Streptolysin S (SLS) beteiligt zu sein (Lyon und Caparon,

2004). Jedoch gibt es neuere Daten, die darauf hindeuten, dass zumindest die Cystein-Protease SpeB nur indirekt durch HtrA beeinflusst wird (Cole *et al.*, 2007).

## 2.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Zweikomponentensystem CiaRH wurde bei einer Studie zur Entstehung von  $\beta$ -Lactamresistenzen als erste nicht-PBP-Resistenzdeterminante identifiziert (Guenzi *et al.*, 1994). In cefotaxim- und piperacillinresistenten Spontanmutanten traten verschiedene unabhängige Punktmutationen im Histidinkinasegen *ciaH* auf (Zähler *et al.*, 2002). Eines dieser *ciaH*-Allele, *ciaH306*, wurde daraufhin bereits recht umfassend untersucht. Seine Punktmutation führt zu einer Veränderung in CiaH, die eine deutliche Aktivierung des Zweikomponentensystems CiaRH bewirkt (Mascher *et al.*, 2006a; Halfmann *et al.*, 2007b). Die anderen *ciaH*-Allele, deren Mutationen sich über den gesamten Bereich des Gens erstrecken, sind noch weitestgehend uncharakterisiert. Im Zuge dieser Arbeit sollten daher alle *ciaH*-Allele systematisch und unabhängig von ihrem ursprünglichen genetischen Hintergrund untersucht werden. Dazu wurden sie mit Hilfe der Janus-Kassette in den *S. pneumoniae*-Wildtypstamm R6 eingebracht. Zunächst sollte durch Promotor-*lacZ*-Fusionen und  $\beta$ -Galaktosidaseassays ermittelt werden, welchen Einfluss die verschiedenen Aminosäureaustausche in CiaH auf die Aktivität des Zweikomponentensystems CiaRH haben. Im Anschluss daran, sollte der Zusammenhang zwischen dem Aktivierungsstatus von CiaRH und verschiedenen Phänotypen untersucht werden, die als CiaRH-reguliert gelten.

Verschiedene Phänotypen von *S. pneumoniae*, wie die genetische Kompetenz, die  $\beta$ -Lactamresistenz und die Autolyse wurden schon vielfach regulatorisch mit CiaRH in Verbindung gebracht (Guenzi *et al.*, 1994; Echenique *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Zähler *et al.*, 2002; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Mascher *et al.*, 2006a). Bislang ist jedoch unklar, welche der bekannten 30 CiaR-regulierten Gene diese Regulationen vermitteln. Zwei Gene bzw. Gengruppen des CiaR-Regulons wurden in der vorliegenden Arbeit auf ihre Rolle bei den CiaRH-abhängigen Phänotypen untersucht: Das Serinproteasegen *htrA* und die Gene der fünf nicht-codierenden csRNAs, *ccnA-E*. Für *htrA* gibt es bereits Hinweise auf eine regulatorische Beteiligung am Kompetenzphänotyp (Ibrahim *et al.*, 2004b; Sebert *et al.*, 2005), was seine Bedeutung als potentiellen Vermittler der CiaRH-abhängigen Regulation unterstreicht. Die bisherigen Daten widersprechen sich allerdings hinsichtlich der Richtung des Kompetenzeffekts von HtrA, weshalb im Zuge dieser Arbeit die Rolle der Serinprotease an den CiaRH-vermittelten Phänotypen näher untersucht werden sollte. Die csRNAs wurden erst durch die Identifikation der CiaR-Bindestelle entdeckt und über ihre physiologische Funktion ist nahezu nichts bekannt (Halfmann *et al.*, 2007b). Ihre Expression unterliegt der

Kontrolle der fünf stärksten CiaR-regulierten Promotoren und ihr Vorkommen in verschiedenen Streptokokken weist sie offenbar als Teil des CiaR-Kernregulons aus. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass die csRNAs eine bedeutende Rolle bei der Regulation der verschiedenen CiaRH-abhängigen Phänotypen spielen, zumal die Beteiligung kleiner nicht-kodierende RNAs an verschiedensten Regulationswegen bekannt ist (Repoila und Darfeuille, 2009). In der vorliegenden Arbeit sollten nun die phänotypischen Folgen von *htrA*- und *ccnA-E*-Deletionen in Wildtyp oder CiaRH-aktiviertem genetischen Hintergrund und unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden, um mehr über die Bedeutung dieser Komponenten des Regulons für den physiologischen Zustand von *S. pneumoniae* zu erfahren.

Auch wenn das TCS CiaRH bezüglich seiner Phänotypischen Effekte schon gut untersucht ist, so weiß man doch noch recht wenig über seine Regulation oder seinen Stimulus. In *E. coli* steht das HtrA-Homolog DegP unter der Kontrolle des TCS CpxAR (Danese *et al.*, 1995). In diesem TCS spielt DegP eine regulatorische Rolle bei der Stimulierung von CpxAR durch aggregierte Proteine und beeinflusst somit auch seine eigene Expression (Buelow und Raivio, 2005; Isaac *et al.*, 2005). Aufgrund einer gewissen Ähnlichkeit zwischen CpxAR und CiaRH, beide werden offenbar in Stresssituationen aktiviert, sollte im Zuge dieser Arbeit untersucht werden, ob HtrA in *S. pneumoniae* ebenfalls einen Einfluss auf die Stimulierung von CiaRH hat und somit eine regulatorische Aufgabe bei der Aktivierung oder Inaktivierung von CiaRH übernimmt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Bakterienstämme

In Tab. 3.1 und Tab. 3.2 sind die Stämme von *Streptococcus pneumoniae* aufgeführt, mit denen gearbeitet wurde, bzw. die als Ausgangsstämme der in dieser Arbeit hergestellten Stämme dienten.

**Tab. 3.1: In dieser Arbeit verwendete Stämme und Ausgangsstämme von *S. pneumoniae***

RKL-Nummer	Stamm	Genotyp	Referenz
	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> , $\Delta(lac)U169$ , ( $\Phi 80$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15), <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>thi-1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	wildtyp, kapselfrei, kompetent	Ottolenghi und Hotchkiss, 1962
	R6 <i>ciaR::aad9</i>	<i>ciaR::aad9</i> , Spc <sup>R</sup>	Mascher <i>et al.</i> , 2003
	R6 <i>ciaH::aad9</i>	<i>ciaH::aad9</i> , Spc <sup>R</sup>	Zähler, 1999
	R6 <i>ciaR::janus</i>	Janus-Kassette in <i>ciaR</i> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>	Schmitt, 2006
	R6 <i>ciaH::janus</i>	Janus-Kassette in <i>ciaH</i> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>	Schmitt, 2006
	R6 $\Delta$ <i>ciaR</i>	<i>ciaR</i> -Minigen, $\Delta$ AS16-204	Schmitt, 2006
	R6 C102	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, Ctx <sup>R</sup>	Zähler <i>et al.</i> , 2002
	R6 C103	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, Ctx <sup>R</sup>	Laible und Hakenbeck, 1987
	R6 C202	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, Ctx <sup>R</sup>	Zähler <i>et al.</i> , 2002
	R6 C305	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, Ctx <sup>R</sup>	Laible und Hakenbeck, 1987
	R6 C306	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, Ctx <sup>R</sup>	Laible und Hakenbeck, 1987
	R6 P208	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, Pip <sup>R</sup>	Laible und Hakenbeck, 1987
	R6 P408	R6 Derivat, Genotyp teilweise unbekannt, Pip <sup>R</sup>	Laible und Hakenbeck, 1987
	R6 <i>htrA::aphIII</i>	<i>htrA::aphIII</i> , Kan <sup>R</sup>	Schäfer, 2007
	R6 P <sub>vegM</sub> - <i>htrA</i>	<i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-htrA</i>	Marx, 2007
	R6 <i>htrA::aphIII</i> P <sub><i>htrA</i></sub> - <i>htrA</i>	<i>htrA::aphIII bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-htrA</i>	Marx, 2007
RKL20	R6 PP2 <i>ccnA</i>	<i>bgaA::tetM-P<sub>ccnA</sub>-lacZ</i>	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
RKL26	R6 PP2 <i>ciaR</i>	<i>bgaA::tetM-P<sub>ciaR</sub>-lacZ</i>	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b

RKL27	R6 PP2spr0782	<i>bgaA::tetM-P<sub>spr0782</sub>-lacZ</i>	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
RKL30	R6 PP2spr0931	<i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
RKL32	R6 PP2spr1149	<i>bgaA::tetM-P<sub>spr1149</sub>-lacZ</i>	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
RKL43	R6 PP2 <i>htrA</i>	<i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
RKL45	R6 PP2 <i>vegM</i>	<i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
RKL74	R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>ccnA</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P<sub>ccnA</sub>-lacZ</i>	Halfmann, 2008
RKL78	R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>ciaR</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P<sub>ciaR</sub>-lacZ</i>	Halfmann, 2008
RKL79	R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2spr0782	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P<sub>spr0782</sub>-lacZ</i>	Halfmann, 2008
RKL81	R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2spr0931	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>	Halfmann, 2008
RKL82	R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2spr1149	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P<sub>spr1149</sub>-lacZ</i>	Halfmann, 2008
RKL86	R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>htrA</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>	Halfmann, 2008
RKL87	R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>vegM</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>	Halfmann, 2008
RKL229	R6 34512 ( $\Delta$ <i>ccnCDEAB</i> ; Cheshire-KO)	<i>ccnC::lox72, ccnD::lox72, ccnE::lox72, ccnAB::lox72</i>	Kovács, 2009
RKL242	R6 Strep <sup>R</sup>	<i>rpsL41</i>	Salles <i>et al.</i> , 1992
RKL263	R6 <i>comAB::aphIII</i>	<i>comAB::aphIII, Kan<sup>R</sup></i>	Zerfass, 2009
RKL264	R6 $\Delta$ <i>htrA</i>	<i>htrA</i> -Minigen, $\Delta$ AS3-346	Schäfer, 2007
RKL265	R6 <i>axe::aphIII</i>	<i>axe::aphIII, Kan<sup>R</sup></i>	Schäfer, 2007
RKL266	R6 $\Delta$ spr0782	spr0782-Minigen, $\Delta$ AS4-124	Schäfer, 2007
RKL267	R6 spr1787:: <i>aad9</i>	spr1787:: <i>aad9, Spc<sup>R</sup></i>	Schäfer, 2007
RKL268	R6 <i>ppmA::cat</i>	<i>ppmA::cat, Cam<sup>R</sup></i>	Schäfer, 2007
RKL269	R6 <i>comDE::aphIII</i>	<i>comDE::aphIII, Kan<sup>R</sup></i>	Schnorpfeil, 2010
RKL322	R6 <i>manLMN::ermAM</i>	<i>manLMN::ermAM, Ery<sup>R</sup></i>	Heintz, 2006

**Tab. 3.2:** Für diese Arbeit hergestellte Stämme von *S. pneumoniae*

RKL-Nummer	Stamm	Genotyp
RKL159	R6 <i>vegM_htrA htrA::aphIII</i>	<i>htrA::aphIII, bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-htrA</i>
RKL160	R6 <i>ciaH306 htrA::aphIII</i>	<i>ciaH A688C, htrA::aphIII</i>
RKL162	R6 <i>ciaH202</i> Strep <sup>R</sup>	<i>ciaH C706A G1237A, Sm<sup>R</sup></i>
RKL163	R6 <i>ciaH305</i> Strep <sup>R</sup>	<i>ciaH A283G, Sm<sup>R</sup></i>
RKL164	R6 <i>ciaH208</i> Strep <sup>R</sup>	<i>ciaH A721C, Sm<sup>R</sup></i>
RKL165	R6 <i>ciaH408</i> Strep <sup>R</sup>	<i>ciaH G310A A721C, Sm<sup>R</sup></i>
RKL166	R6 <i>ciaH103</i> Strep <sup>R</sup>	<i>ciaH C608T, Sm<sup>R</sup></i>
RKL167	R6 <i>ciaH102</i> Strep <sup>R</sup>	<i>ciaH C706A, Sm<sup>R</sup></i>
RKL168	R6 <i>ciaH306</i> Strep <sup>R</sup>	<i>ciaH A688C, Sm<sup>R</sup></i>
RKL169	R6 <i>ciaH202</i> pPP2 <i>vegM</i> Strep <sup>R</sup>	RKL162, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>

RKL170	R6 <i>ciaH202</i> pPP2 <i>htrA</i> Strep <sup>R</sup>	RKL162, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL171	R6 <i>ciaH202</i> pPP2 <i>spr0931</i> Strep <sup>R</sup>	RKL162, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL172	R6 <i>ciaH305</i> pPP2 <i>vegM</i> Strep <sup>R</sup>	RKL163, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL173	R6 <i>ciaH305</i> pPP2 <i>htrA</i> Strep <sup>R</sup>	RKL163, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL174	R6 <i>ciaH305</i> pPP2 <i>spr0931</i> Strep <sup>R</sup>	RKL163, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL175	R6 <i>ciaH208</i> pPP2 <i>vegM</i> Strep <sup>R</sup>	RKL164, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL176	R6 <i>ciaH208</i> pPP2 <i>htrA</i> Strep <sup>R</sup>	RKL164, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL177	R6 <i>ciaH208</i> pPP2 <i>spr0931</i> Strep <sup>R</sup>	RKL164, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL178	R6 <i>ciaH408</i> pPP2 <i>vegM</i> Strep <sup>R</sup>	RKL165, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL179	R6 <i>ciaH408</i> pPP2 <i>htrA</i> Strep <sup>R</sup>	RKL165, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL180	R6 <i>ciaH408</i> pPP2 <i>spr0931</i> Strep <sup>R</sup>	RKL165, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL181	R6 <i>ciaH103</i> pPP2 <i>vegM</i> Strep <sup>R</sup>	RKL166, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL182	R6 <i>ciaH103</i> pPP2 <i>htrA</i> Strep <sup>R</sup>	RKL166, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL183	R6 <i>ciaH103</i> pPP2 <i>spr0931</i> Strep <sup>R</sup>	RKL166, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL184	R6 <i>ciaH102</i> pPP2 <i>vegM</i> Strep <sup>R</sup>	RKL167, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL185	R6 <i>ciaH102</i> pPP2 <i>htrA</i> Strep <sup>R</sup>	RKL167, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL186	R6 <i>ciaH102</i> pPP2 <i>spr0931</i> Strep <sup>R</sup>	RKL167, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL187	R6 <i>ciaH306</i> pPP2 <i>vegM</i> Strep <sup>R</sup>	RKL168, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL188	R6 <i>ciaH306</i> pPP2 <i>htrA</i> Strep <sup>R</sup>	RKL168, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL189	R6 <i>ciaH306</i> pPP2 <i>spr0931</i> Strep <sup>R</sup>	RKL168, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL190	R6 <i>ciaH202 ciaR::janus</i>	RKL162, Januskassette in <i>ciaR</i> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>
RKL191	R6 <i>ciaH202 ΔciaR</i> Strep <sup>R</sup>	RKL162, <i>ciaR</i> -Minigen (ΔAS16-204)
RKL192	R6 <i>ciaH202 htrA::aphIII</i> Strep <sup>R</sup>	RKL162, <i>htrA::aphIII</i>
RKL193	R6 <i>ciaH202 htrA::aphIII</i> pPP2 <i>vegM</i> Strep <sup>R</sup>	RKL192, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL194	R6 <i>ciaH202 htrA::aphIII</i> pPP2 <i>htrA</i> Strep <sup>R</sup>	RKL192, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL195	R6 <i>ciaH202 htrA::aphIII</i> pPP2 <i>spr0931</i> Strep <sup>R</sup>	RKL192, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL196	R6 <i>htrA::aphIII</i> pPP2 <i>vegM</i>	<i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL197	R6 <i>htrA::aphIII</i> pPP2 <i>htrA</i>	<i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL198	R6 <i>htrA::aphIII</i> pPP2 <i>spr0931</i>	<i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL222	R6 <i>rpoB</i> H486Y m5	<i>rpoB</i> C1456T, Rif <sup>R</sup>
RKL259	R6 <i>ciaH202s</i> Strep <sup>R</sup>	<i>ciaH</i> G1237A, Sm <sup>R</sup>
RKL260	R6 <i>ciaH408s</i> Strep <sup>R</sup>	<i>ciaH</i> G310A, Sm <sup>R</sup>
RKL261	R6 <i>parB::cat</i> 8/2	<i>parB::cat</i>
RKL262	R6 <i>spr0931::aad9</i>	<i>spr0931::aad9</i>
RKL270	R6 <i>ΔhtrA</i> pPP2 <i>vegM</i>	RKL264, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL271	R6 <i>ΔhtrA</i> pPP2 <i>htrA</i>	RKL264, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL272	R6 <i>ΔhtrA</i> pPP2 <i>spr0931</i>	RKL264, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL273	R6 <i>axe::aphIII</i> pPP2 <i>vegM</i>	RKL265, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL274	R6 <i>axe::aphIII</i> pPP2 <i>htrA</i>	RKL265, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL275	R6 <i>axe::aphIII</i> pPP2 <i>spr0931</i>	RKL265, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>

RKL276	R6 $\Delta$ spr0782 pPP2vegM	RKL266 <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL277	R6 $\Delta$ spr0782 pPP2htrA	RKL266, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL278	R6 $\Delta$ spr0782 pPP2spr0931	RKL266, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL279	R6 spr1787:: <i>aad9</i> pPP2vegM	RKL267, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL280	R6 spr1787:: <i>aad9</i> pPP2htrA	RKL267, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL281	R6 spr1787:: <i>aad9</i> pPP2spr0931	RKL267, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL282	R6 <i>ppmA::cat</i> pPP2vegM	RKL268, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL283	R6 <i>ppmA::cat</i> pPP2htrA	RKL268, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL284	R6 <i>ppmA::cat</i> pPP2spr0931	RKL268, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL285	R6 <i>comDE::aphIII</i> pPP2vegM	RKL269, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL286	R6 <i>comDE::aphIII</i> pPP2htrA	RKL269, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL287	R6 <i>comDE::aphIII</i> pPP2spr0931	RKL269, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL288	R6 <i><math>\Delta</math>htrA comDE::aphIII</i>	RKL264, <i>comDE::aphIII</i>
RKL289	R6 <i><math>\Delta</math>htrA comDE::aphIII</i> pPP2vegM	RKL270, <i>comDE::aphIII</i>
RKL290	R6 <i><math>\Delta</math>htrA comDE::aphIII</i> pPP2htrA	RKL271, <i>comDE::aphIII</i>
RKL291	R6 <i><math>\Delta</math>htrA comDE::aphIII</i> pPP2spr0931	RKL272, <i>comDE::aphIII</i>
RKL292	R6 <i>comAB::aphIII</i> pPP2vegM	RKL263, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL293	R6 <i>comAB::aphIII</i> pPP2htrA	RKL263, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL294	R6 <i>comAB::aphIII</i> pPP2spr0931	RKL263, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL295	R6 <i><math>\Delta</math>htrA comAB::aphIII</i>	RKL264, <i>comAB::aphIII</i>
RKL296	R6 <i><math>\Delta</math>htrA comAB::aphIII</i> pPP2vegM	RKL270, <i>comAB::aphIII</i>
RKL297	R6 <i><math>\Delta</math>htrA comAB::aphIII</i> pPP2htrA	RKL271, <i>comAB::aphIII</i>
RKL298	R6 <i><math>\Delta</math>htrA comAB::aphIII</i> pPP2spr0931	RKL272, <i>comAB::aphIII</i>
RKL299	R6 spr0931:: <i>aad9</i> pPP2vegM	RKL262, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL300	R6 spr0931:: <i>aad9</i> pPP2htrA	RKL262, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL301	R6 spr0931:: <i>aad9</i> pPP2spr0931	RKL262, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL302	R6 <i>parB::cat</i> pPP2vegM	RKL261, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL303	R6 <i>parB::cat</i> pPP2htrA	RKL261, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL304	R6 <i>parB::cat</i> pPP2spr0931	RKL261, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL305	R6 <i>ciaH202s</i> pPP2vegM Strep <sup>R</sup>	RKL259, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL306	R6 <i>ciaH202s</i> pPP2htrA Strep <sup>R</sup>	RKL259, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL307	R6 <i>ciaH202s</i> pPP2spr0931 Strep <sup>R</sup>	RKL259, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL308	R6 <i>ciaH408s</i> pPP2vegM Strep <sup>R</sup>	RKL260, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL309	R6 <i>ciaH408s</i> pPP2htrA Strep <sup>R</sup>	RKL260, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL310	R6 <i>ciaH408s</i> pPP2spr0931 Strep <sup>R</sup>	RKL260, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL311	R6 <i>htrA::aphIII</i> pPP2ciaR	<i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P<sub>ciaR</sub>-lacZ</i>
RKL312	R6 <i>htrA::aphIII</i> pPP2ccnA	<i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P<sub>ccnA</sub>-lacZ</i>
RKL313	R6 <i>htrA::aphIII</i> pPP2spr1149	<i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P<sub>spr1149</sub>-lacZ</i>
RKL314	R6 <i>htrA::aphIII</i> pPP2spr0782	<i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0782</sub>-lacZ</i>
RKL315	R6 <i>htrA::aphIII ciaH ::aad9</i> pPP2vegM	RKL196, <i>ciaH ::aad9</i>



RKL316	R6 <i>htrA::aphIII ciaH::aad9</i> pPP2htrA	RKL197, <i>ciaH::aad9</i>
RKL317	R6 <i>htrA::aphIII ciaH::aad9</i> pPP2spr0931	RKL198, <i>ciaH::aad9</i>
RKL318	R6 <i>htrA::aphIII ciaH::aad9</i> pPP2ciaR	RKL311, <i>ciaH::aad9</i>
RKL319	R6 <i>htrA::aphIII ciaH::aad9</i> pPP2ccnA	RKL312, <i>ciaH::aad9</i>
RKL320	R6 <i>htrA::aphIII ciaH::aad9</i> pPP2spr1149	RKL313, <i>ciaH::aad9</i>
RKL321	R6 <i>htrA::aphIII ciaH::aad9</i> pPP2spr0782	RKL314, <i>ciaH::aad9</i>
RKL323	R6 <i>manLMN::ermAM</i> pPP2vegM	RKL322, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL324	R6 <i>manLMN::ermAM</i> pPP2htrA	RKL322, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL325	R6 <i>manLMN::ermAM</i> pPP2spr0931	RKL322, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL340	R6 <i>ΔccnCDEAB ciaH::janus</i>	RKL229, Januskassette in <i>ciaH</i> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>
RKL341	R6 <i>ciaH202 ΔccnCDEAB</i> (Cheshire-KO)	RKL229, <i>ciaH C706A G1237A</i> , Sm <sup>R</sup>
RKL348	R6 <i>ciaH306 htrA::aphIII</i>	RKL168, <i>htrA::aphIII</i> , Sm <sup>R</sup>
RKL349	R6 <i>ciaH306 ΔccnCDEAB</i> (Cheshire-KO)	RKL168, <i>ΔccnC::lox72</i> , <i>ΔccnD::lox72</i> ; <i>ΔccnE::lox72</i> ; <i>ΔccnAB::lox72</i> , Sm <sup>R</sup>
RKL350	R6 <i>ciaH306 htrA::ahpIII ΔccnCDEAB</i> (Cheshire-KO)	RKL349, <i>htrA::aphIII</i> , Sm <sup>R</sup>
RKL351	R6 <i>ciaH202 htrA::ahpIII ΔccnCDEAB</i> (Cheshire-KO)	RKL341, <i>htrA::aphIII</i> , Sm <sup>R</sup>
RKL352	R6 <i>ciaH306 ciaR::janus</i>	RKL168, Januskassette in <i>ciaR</i> , Sm <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>
RKL353	R6 <i>ciaH306 ΔciaR</i> Strep <sup>R</sup>	RKL168, <i>ciaR</i> -Minigen ( $\Delta$ aal6-204)
RKL354	R6 $\Delta$ <i>htrA</i> pKP01 (pSW1- <i>htrA</i> )	RKL264, <i>bgaA''::tmp-htrA</i>
RKL355	R6 $\Delta$ <i>htrA</i> pKP01 pPP2vegM	RKL354, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL356	R6 $\Delta$ <i>htrA</i> pKP01 pPP2htrA	RKL354, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL357	R6 $\Delta$ <i>htrA</i> pKP01 pPP2spr0931	RKL354, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL358	R6 $\Delta$ <i>htrA</i> pKP01- <i>htrA</i> <sub>S234A</sub>	RKL264, <i>bgaA''::tmp-htrAT700G T702C</i> (HtrAS234A)
RKL359	R6 $\Delta$ <i>htrA</i> pKP01- <i>htrA</i> <sub>S234A</sub> pPP2vegM	RKL358, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL360	R6 $\Delta$ <i>htrA</i> pKP01- <i>htrA</i> <sub>S234A</sub> pPP2htrA	RKL358, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL361	R6 $\Delta$ <i>htrA</i> pKP01- <i>htrA</i> <sub>S234A</sub> pPP2spr0931	RKL358, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>
RKL362	R6 <i>htrA::ahpIII ΔccnCDEAB</i> (Cheshire-KO)	RKL229, <i>htrA::aphIII</i> , Sm <sup>R</sup>
RKL363	R6 <i>ΔccnCDEAB</i> pPP2vegM	RKL229, <i>bgaA::tetM-P<sub>vegM</sub>-lacZ</i>
RKL364	R6 <i>ΔccnCDEAB</i> pPP2htrA	RKL229, <i>bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-lacZ</i>
RKL365	R6 <i>ΔccnCDEAB</i> pPP2spr0931	RKL229, <i>bgaA::tetM-P<sub>spr0931</sub>-lacZ</i>

### 3.1.2 Plasmide

Tab. 3.3 beinhaltet die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Alle Plasmide sind in *Escherichia coli* replikativ, während in *Streptococcus pneumoniae* Teilbereiche der Plasmide ins Genom integrieren.

**Tab. 3.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide**

Plasmid	Beschreibung	Selektionsbedingungen	Referenz
pPP2 <sub>vegM</sub>	pPP2 Derivat, P <sub>vegM</sub> -lacZ Fusion	Ampicillin 100 µg/ml ( <i>E. coli</i> ), Tetracyclin 3 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
pPP2 <sub>htrA</sub>	pPP2 Derivat, P <sub>htrA</sub> -lacZ Fusion	Ampicillin 100 µg/ml ( <i>E. coli</i> ), Tetracyclin 3 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
pPP2 <sub>spr0931</sub>	pPP2 Derivat, P <sub>spr0931</sub> -lacZ Fusion	Ampicillin 100 µg/ml ( <i>E. coli</i> ), Tetracyclin 3 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
pPP2 <sub>ciaR</sub>	pPP2 Derivat, P <sub>ciaR</sub> -lacZ Fusion	Ampicillin 100 µg/ml ( <i>E. coli</i> ), Tetracyclin 3 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
pPP2 <sub>ccnA</sub>	pPP2 Derivat, P <sub>ccnA</sub> -lacZ Fusion	Ampicillin 100 µg/ml ( <i>E. coli</i> ), Tetracyclin 3 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
pPP2 <sub>spr1149</sub>	pPP2 Derivat, P <sub>spr1149</sub> -lacZ Fusion	Ampicillin 100 µg/ml ( <i>E. coli</i> ), Tetracyclin 3 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
pPP2 <sub>spr0782</sub>	pPP2 Derivat, P <sub>spr0782</sub> -lacZ Fusion	Ampicillin 100 µg/ml ( <i>E. coli</i> ), Tetracyclin 3 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )	Halfmann <i>et al.</i> , 2007b
pKP01	pSW1 Derivat, <i>htrA</i> mit nativem Promotor	Ampicillin 100 µg/ml ( <i>E. coli</i> ), Tetracyclin 3 µg/ml ( <i>S. pneumoniae</i> )	Peters, 2010
pUC18	Standard Klonierungsvektor in <i>E. coli</i>	Ampicillin 100 µg/ml ( <i>E. coli</i> )	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC19	Standard Klonierungsvektor in <i>E. coli</i>	Ampicillin 100 µg/ml ( <i>E. coli</i> )	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

### 3.1.3 Oligonukleotide

Tab. 3.4 bis Tab. 3.8 zeigen die in dieser Arbeit für Stammkonstruktionen, Sequenzierungen oder Analysen verwendeten Primer. Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon synthetisiert. Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 pmol/µl wurden vor Gebrauch mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 10 pmol/µl verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei –20°C.

**Tab. 3.4: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *ciaRH***

Primername	Sequenz (5'-3')
Cia_P1-2	GAATTGGTTCGTCAGCTGGC
Cia_P1	GGATTAAGGCAGCCCTTGG
Cia_P_3	GGTGTCTATGACTTGATTTTGCTGGCTTTGATGTTGCC
R1728	CCCATCATCTCTCCGAGC
CiaH_for	TCGGTTGTGCGAAGTCTATGTTTCAAAAAGTC
CiaH_rev	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
Cia-M1	GAGACTGGCAAGTAAAGACAAAATCC
CiaHup_f	TGCAGTCGAAGCAGTTGTTCTTCAATACGG
CiaHdown_r	ATTGACCGCAACGAGCAATTCCTTACCAGC
CiaHup_ff	CGGTATGGGAATCAAGGAAATTGCAGCACG
CiaHdown_rr	CCAAGAAGTCTAAGAAAGGCTTGATACGGTCC

**Tab. 3.5: Oligonukleotide zur Amplifikation von *htrA***

Primername	Sequenz (5'-3')
htrA_for_UEP	ATTATATTGATCCCAGCAGG
SpoOJ1	GAGATATTTTACCATAGATAGC

**Tab. 3.6: Mutageneseprimer zur Generierung von Punktmutationen in *ciaH***

Primername	Sequenz (5'-3')
MutC102_for	CCACTCGCAGTTTTGAAAAATCGCTTAGAGACC
MutC102_rev	GGTCTCTAAGCGATTTTTCAAACCTGCGAGTGG
MutC202_for	CCAAGCAAATTGTAGATACTCTAAAAGGAACTG
MutC202_rev	CAGTTCCTTTTAGAGTATCTACAATTTGCTTGG
MutP408_for	GTCATTCTCTTTGATAAGAACTTTACTCAACTTCTTTCTGG
MutP408_rev	GAAAGAAGTTGAGTAAAGTTCTTATCAAAGAGAATGACTTCC

**Tab. 3.7: Oligonukleotide zur Herstellung der Deletionen von *parB* und *spr0931***

Primername	Sequenz (5'-3')
cat-for	AGGAGGAATTTATATATGAC
cat-rev	CTAAATCCAATCATCTACC
parBup_for	GAGAAACTGCTATTGCCATCGGTAGCC
parBup_rev	GATAATATTTAAAAGTCATATATAAATTCCTCCTACACTAACACATCTTTTCTC
parBdown_for	GATATAATTAATAAGGTAGATGATTGGATTAGGGCTGTTCTTTTATTTTTTATCTC
parBdown_rev	GTGAGTCTTACCAAGGCCTGGTCCTCC
cat-parB_rev	GAGATAAAAAAATAAAAGAACAGCCCTAAATCCAATCATCTACCTTATTAATTATATC
parB-Bam_rev	AAATAAAAGAGGATCCCTAAATCCAATCATCTACCTTATTAATTATATC
parB-Bam_for	TTGGATTTAGGGATCCTCTTTTATTTTTTTATCTCACAAGGTTATCC
spec-for	ATGAATACATACGAACAAATTAATAAAAGTG
spec-rev	TTATAATTTTTTTAATCTGTTATTTAAATAGTTTATAG
931up_for	GCTGGCTATAAAGCTTACCGCGTTCATC
931up_rev	CACTTTATTAATTTGTTTCGTATGTATTCATAGGGAATTCCTCCTTTACTTC
931down_for	CTATAAACTATTTAAATAACAGATTAATAAAATTAATAAGGGAAATCTGACAGAAG
931down_rev	AAGATATCC
931down_rev	GCTGTTCTGGATAAGAAAGGTGTCCTAAATCCGCG

**Tab. 3.8: Oligonukleotide zur Herstellung des Rifampin-Resistenzmarkers**

Primername	Sequenz (5'-3')
rpoB-seq1	GCAACGATTGGGTTTTGTCCAAGC
rpoB-seq2	GCTGAGATGAGCTACTTCCTCAACTTGG
rpoB-H499Yfor	GCTTTCTGAGTTGTCTTACAAACGCCG
rpoB-H499Yrev	CGGCGTTTGTAAGACAACCTCAGAAAGC

### 3.1.4 Nährmedien

#### 3.1.4.1 C+Y-Medium

Bei C+Y-Medium (Lacks und Hotchkiss, 1960) handelt es sich um ein Komplexmedium, welches in dieser Arbeit, soweit nicht anders angegeben, für die Anzucht und Transformation von *Streptococcus pneumoniae* verwendet wurde. Die Zusammensetzung ist in Tab. 3.9 und Tab. 3.10 angegeben. Die Komponenten wurden getrennt autoklaviert oder sterilfiltriert, vor der Verwendung steril zusammenpipettiert und dunkel bei 4°C gelagert.

**Tab. 3.9: Zusammensetzung des C+Y-Mediums**

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

**Tab. 3.10: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C+Y-Medium**

Komponente	Menge
<b>PreC</b>	
Na-Acetat, wasserfrei	1,2 g
Casaminosäuren	5 g
L-Tryptophan	5 mg
L-Cystein	0,05 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
pH 7,5 einstellen mit NaOH, autoklavieren	
<b>Supplement</b>	
3 in 1 Salts	60 ml
20 % Glukose	120 ml
50 % Saccharose	6 ml
Adenosin (2 mg/ml)	120 ml
Uridin (2 mg/ml)	120 ml
alle Komponenten einzeln autoklavieren, Supplement steril zusammenpipettieren	

**AdamsIII**

AdamsI	160 ml
AdamsII	40 ml
Asparagin	2 g
Cholinchlorid	0,2 g
0,1 M CaCl <sub>2</sub>	1,6 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern	

**Phosphatpuffer, pH 8**

1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	53 ml
1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	947 ml
autoklavieren	

**3 in 1 Salts**

MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100 g
CaCl <sub>2</sub> , wasserfrei	0,5 g
0,1 M MnSO <sub>4</sub>	0,2 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
autoklavieren	

**AdamsI**

Biotin	0,15 mg
Nicotinsäure	150 mg
Pyridoxin-HCL (B <sub>6</sub> )	175 mg
Ca-Pantothenat	600 mg
Thiamin-HCL	160 mg
Riboflavin	70 mg
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern	

**AdamsII**

FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	500 mg
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	500 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	500 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	200 mg
HCl <sub>konz.</sub>	10 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern	

**3.1.4.2 Todd Hewitt broth (THB)**

Zur Untersuchung der Kompetenzphänotypen in Abhängigkeit vom Medium wurde THB verwendet. THB ist ein einfaches Komplexmedium. Es wurde als Pulver von der Firma Roth bezogen und nach Herstelleranleitung angesetzt und autoklaviert.

### 3.1.4.3 Brain heart infusion (BHI)

BHI wurde, wie THB, für die Untersuchung des Kompetenzphänotyps von *S. pneumoniae* verwendet. Es wurde ebenfalls als Fertigpulver bezogen (Becton, Dickinson and Company) und nach Herstellerangaben angesetzt und autoklaviert.

### 3.1.4.4 D-Blutagar

Für die Kultivierung von *S. pneumoniae* auf Agar-Platten wurde D-Blutagar verwendet. Dem autoklavierten D-Agar (Tab. 3.11) wurde nach Abkühlen auf 50°C 3 % (v/v) defibriniertes Schafsblut (Oxoid GmbH) und gegebenenfalls Antibiotika (Tab. 3.12) zugesetzt.

**Tab. 3.11: Zusammensetzung des D-Agars**

<b>Komponente</b>	<b>Menge/l</b>
Glucose	1 g
Tris	1,25 g
Hefeextrakt	1,25 g
Neopepton	5 g
NaCl	5 g
Pepton	10 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l

### 3.1.4.5 LB-Medium und –Agar

Für die Anzucht von *Escherichia coli* wurde das Komplexmedium Luria Broth (LB) verwendet. Es wurde als Fertigpulver von der Firma Roth bezogen und nach Herstellerangaben mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> versetzt und autoklaviert. Zur Anzucht von *E. coli* auf Festmedium wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Dem Agar bzw. dem Medium wurden nach dem Autoklavieren gegebenenfalls Antibiotika (Tab. 3.12) in entsprechender Konzentration zugegeben.

**Tab. 3.12: Verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Stammlösung in	Verwendete Endkonzentration
Streptomycin	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	200 µg/ml
Kanamycin	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	200 µg/ml
Tetracyclin	70 % EtOH	3 µg/ml
Rifampin	DMSO	0,5 µg/ml
Chloramphenicol	70 % EtOH	2 µg/ml
Spectinomycin	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	40 µg/ml
Cefotaxim	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	variabel
Oxacillin	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	variabel
Ampicillin	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	100 µg/ml

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Anzucht und Stammkonservierung

#### 3.2.1.1 Wachstum in Flüssigmedium

Die Kultivierung von *S. pneumoniae* erfolgte in Flüssigmedium bei 37°C semianaerob im Wasserbad stehend. *E. coli* wurde bei 37°C schüttelnd kultiviert. Angeimpft wurde entweder 1-4 %ig aus einer Glycerinkultur oder von einer D-Blutagar- bzw. LB-Platte.

Für Wachstumsmessungen wurde die optische Dichte (OD) bei 600 nm im Photometer (Ultraspec 500, Biochrom Ltd.) bestimmt. Als Referenz diente nicht-beimpftes Medium. Die Wachstumsrate  $\mu$  und die Generationszeit  $g$  wurden über den linearen Bereich der halblogarithmisch aufgetragenen exponentiellen Wachstumsphase wie folgt ermittelt:

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

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

$$\begin{aligned} X &= \text{Zellzahl zum Zeitpunkt } t \\ X_0 &= \text{Zellzahl zum Zeitpunkt } t_0 \\ t - t_0 &= \text{Zeitdifferenz [min]} \end{aligned}$$

### 3.2.1.2 Glycerinkulturen

Zur Konservierung von *S. pneumoniae*- und *E. coli*-Stämmen wurden Kulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde warmes Glycerin mit einer Endkonzentration von 20 % zugesetzt, die Kultur in Eppendorf-Reaktionsgefäße (ERG) aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei – 80°C.

## 3.2.2 Transformation von *Streptococcus pneumoniae*

### 3.2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen von *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* ist ein natürlich kompetentes Bakterium, das seine maximale Kompetenz gegen Mitte der exponentiellen Wachstumsphase entwickelt. Daher wurden zur Herstellung und Konservierung kompetenter Zellen Kulturen in C+Y-Medium bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,3 hochgezogen und als Glycerinkulturen abgeerntet.

Bei Stämmen mit aktivierenden *ciaH*-Allelen wurde das C+Y-Medium direkt von einem auf D-Blutagarplatten mit 0,02 µg/ml Cefotaxim gewachsenen Bakterienrasen angeimpft um das Akkumulieren von Pseudorevertanten zu minimieren.

In Ausnahmefällen wurde dem Medium Rinderserumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 0,032 % zugesetzt um die Kompetenz weiter zu steigern.

### 3.2.2.2 Transformation von *S. pneumoniae*

Zur Transformation von *S. pneumoniae* wurden kompetente Zellen auf Eis auftauen gelassen. 20 µl der kompetenten Zellen wurden in 180 µl C+Y-Medium verdünnt und mit 1 – 3 µl DNA versetzt. Zur Aufnahme der DNA wurden die Ansätze 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zur phänotypischen Expression 2 h bei 37°C inkubiert und danach auf D-Blutagar mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum ausplattiert. Nach 24-48 h bei 37°C wurden Einzelkolonien auf frische D-Agar-Platten überstrichen und nochmals über Nacht bei 37°C inkubiert. Von diesem Ausstrich wurde möglichst viel Zellmasse in Flüssigkultur überführt und nach dem Wachstum als Glycerinkulturen konserviert (Kap. 3.2.1.2).



Bei Stämmen, die aufgrund genetischer Veränderungen eine unterdrückte Kompetenz haben, wurde CSP (competence stimulating peptide) in einer Endkonzentration von 100 ng/ml in den Ansatz gegeben um die Kompetenz zu induzieren (Håvarstein *et al.*, 1995).

### 3.2.2.3 Bestimmung der Transformationseffizienz

Der Verlauf der Kompetenz verschiedener *S. pneumoniae*-Stämme wurde über das gesamte exponentielle Wachstum bestimmt. Um die Kompetenzentwicklung während des Wachstums verfolgen zu können, war es wichtig, dass sich die Zellen bei Versuchsstart in einem nicht-kompetenten Zustand befanden. Dies erreichte man durch das Hochziehen einer Vorkultur in Medium mit niedrigem pH-Wert, da die Kompetenz bei *S. pneumoniae* pH-abhängig ist (Tomasz und Mosser, 1966; Chen und Morrison, 1987). Für diese Vorkulturen wurden die zu untersuchenden Stämme in dem jeweiligen Medium mit pH 6,8 bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 kultiviert und als Glycerinkulturen konserviert. Mit diesen Glycerinkulturen wurde das jeweilige Medium 1 %ig beimpft. Ab dem Zeitpunkt des Animpfens (T = 0) wurde nach 5 min, 90 min und anschließend im Abstand von jeweils 30 min Kulturproben bis zum Erreichen der Stationärphase entnommen. Diese wurden als Glycerinkulturen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80°C konserviert. Je nach genetischem Hintergrund der Stämme wurden die Kulturproben mit 50 ng chromosomaler DNA des Stammes R6 Strep<sup>R</sup> oder RKL222 transformiert (Kap. 3.2.20). Nach der Inkubation bei 30°C wurde zudem DNase I (Roche Applied Science) in einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt, um noch vorhandene freie DNA enzymatisch abzubauen. Aus den Transformationsansätzen wurde vor dem Ausplattieren eine Verdünnungsreihe in Saline (0,9 % NaCl) hergestellt. Niedrige Verdünnungen wurden zur Bestimmung der Transformanten auf antibiotikahaltige D-Blutagar-Platten ausplattiert (200 µg/ml Streptomycin, bzw. 0,5 µg/ml Rifampin, Tab. 3.12), hohe Verdünnungen wurden zur Bestimmung der Lebendkeimzahl auf antibiotikafreie Platten plattiert. Die Transformationseffizienz errechnete sich als prozentualer Anteil der Transformanten bezogen auf die Lebendkeimzahl.

### **3.2.3 Transformation von *Escherichia coli***

#### **3.2.3.1 Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli***

Bei *E. coli* handelt es sich um ein Bakterium, das nicht natürlich kompetent ist. Die Bakterien mussten daher zunächst einer Behandlung unterzogen werden, die zu einer künstlichen Kompetenz führt. In dieser Arbeit wurde die Methode nach Hanahan verwendet (Hanahan, 1983).

200 ml LB-Medium wurden dazu beimpft und schüttelnd bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zügig auf Eis abgekühlt und in 50 ml-Greiner-Röhrchen portioniert. Die Zellkultur wurde 10 min bei 8500 rpm und 4°C abzentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments) und der Überstand anschließend möglichst vollständig entfernt. Das Zellpellet wurde in 16 ml kaltem TFB1-Puffer (Tab. 3.13) resuspendiert und für 90 min auf Eis kaltgestellt. Anschließend wurde die Suspension abermals zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in kaltem TFB2-Puffer (Tab. 3.13) resuspendiert und in 100 µl-Portionen in ERG aliquotiert. Nach Schockfrostung in flüssigem Stickstoff wurden die kompetenten Zellen bei – 80°C gelagert.

#### **3.2.3.2 Transformation von *E. coli***

Zur Transformation von *E. coli* wurde ein Aliquot kompetenter Zellen zunächst schonend auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1 – 10 µl der zu transformierenden DNA bzw. des Ligationsansatzes wurden die Zellen nochmals 20 min auf Eis gehalten, bevor sie einem Hitzeschock für 90 sec bei 42°C ausgesetzt wurden. Anschließend wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt und nach Zugabe von 1 ml vorgewärmtem Psi-Broth (Tab. 3.13) zur phänotypischen Expression für 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurde der Ansatz, gegebenenfalls mit Saline verdünnt, auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

**Tab. 3.13: Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen und zur Transformation von *E. coli***

Komponente	Konzentration
<b>TFB 1 Puffer</b>	
RbCl	100 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM
K-Acetat	30 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Glycerin	15 %
pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern	
<b>TFB 2 Puffer</b>	
MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	75 mM
Glycerin	15 %
pH 8 mit NaOH einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern	
<b>Psi-Broth</b>	
LB-Medium autoklavieren, danach zugeben:	
MgSO <sub>4</sub> (autoklaviert)	4 mM
KCl (autoklaviert)	10 mM

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

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae* wurde ein Protokoll verwendet, das auf einer Methode nach Marmur basiert (Marmur, 1961). Dabei handelt es sich um eine schnelle Methode, die jedoch eine physikalische Fragmentierung der DNA zur Folge haben kann.

Zur Präparation der DNA wurden zunächst 6 ml einer Bakterienkultur bis zu einer  $OD_{600} = 0,6 - 0,8$  hochgezogen. Die Kultur wurde in ein 15 ml-Greiner-Röhrchen überführt und 5 min bei 8500 rpm (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 2 ml Saline resuspendiert. Die Suspension wurde auf zwei ERG aufgeteilt und nochmals zentrifugiert (1 min, 14000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415 C). Der Überstand wurde erneut vollständig entfernt und die entstandenen Zellpellets entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder direkt weiterverwendet.

Je ein Pellet wurde in 180  $\mu\text{l}$  TE-Puffer (Tab. 3.14) resuspendiert und mit 20  $\mu\text{l}$  RNase-Lösung (20 mg/ml) versetzt. Das ERG wurde 1 min im  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad inkubiert und anschließend mit 200  $\mu\text{l}$  SDS-Lösung (2 %) versetzt. Nach erfolgter Zelllyse wurde

100 µl ProteinaseK-Lösung (20 mg/ml) zugegeben, durch Invertieren gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Zelllysate mit 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und 30 min auf einem Eppendorfschüttler geschüttelt. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 14000 rpm wurde die DNA-haltige Oberphase in ein frisches ERG überführt und erneut mit 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt. Der Ansatz wurde 10 – 20 min geschüttelt und abermals 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein frisches ERG überführt und die DNA mit 500 µl Isopropanol (100 %) ausgefällt. Nach 10 – 30 min wurde der Ansatz 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das DNA-Pellet zweimal mit 200 µl Ethanol (100 %) gewaschen. Nach Trocknung des Pellets im Exsikkator wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer gelöst.

**Tab. 3.14: Lösungen zur Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae***

Komponente	Konzentration
<b>TE-Puffer</b>	
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0 mit HCl einstellen	
<b>RNase Lösung</b>	
RNase A (Roth)	10 mg/ml
<u>gelöst in:</u>	
Tris	10 mM
NaCl	15 mM
pH 7,5 einstellen, autoklavieren	
15 min bei 100°C kochen, bei -20°C lagern	
<b>Proteinase K (BioRon)</b>	20 mg/ml in H <sub>2</sub> O
<b>Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Roth)</b>	25:24:1

### 3.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus *S. pneumoniae* wurden die Zellen nach der „Ice cold Phenol“-Methode nach Maes und Messens aufgeschlossen (Maes und Messens, 1992). Bei der Arbeit mit RNA wurden grundsätzlich Handschuhe getragen um die Gefahr einer Verunreinigung der Proben mit externer RNase zu minimieren.

### 3.2.5.1 Zellaufschluss

Zum Zellaufschluss wurden zunächst 20 ml C+Y-Medium mit einer Glycerin- oder Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$  inkubiert. Die Zellkultur wurde anschließend in 50 ml Greiner-Röhrchen bei 8000 rpm 6 min abzentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments) und der Überstand verworfen.

Zum Aufschluss der Zellen wurde dem Pellet 1 g Glasperlen (Roth,  $\varnothing$  0,4 – 0,52 mm) und 1 ml NAE-gesättigtes Phenol-Chloroform (6:1, Tab. 3.15) zugegeben und dreimal 1 min gevortext. Um Wärmeentwicklung entgegenzuwirken wurde der Ansatz zwischendurch jeweils 1 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden weitere 3 ml NAE-gesättigtes Phenol-Chloroform sowie 4 ml NAES-Puffer zugesetzt, nochmals 1 min gevortext und bei 8000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert.

### 3.2.5.2 RNA-Isolierung

Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Oberphase in ein 15 ml MaXtract High Density Röhrchen (Qiagen) überführt und 4 ml NAE-gesättigtes Phenol-Chloroform zugesetzt. Durch mehrmaliges Invertieren wurde der Ansatz gut gemischt und anschließend 8 min bei 8000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Durch das in den MaXtract High Density Röhrchen enthaltene Gel, das sich beim Zentrifugieren zwischen die organische und die wässrige Phase legt, konnte die Oberphase durch einfaches Dekantieren in ein neues MaXtract High Density Röhrchen überführt werden. Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde die Oberphase in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und durch Zugabe von 4 ml kaltem Isopropanol, sowie 400  $\mu$ l kaltem Natriumacetat (3 M, pH 5) unter mehrmaligem Invertieren die Gesamt-Nukleinsäuren gefällt. Zur effizienteren Fällung wurde der Ansatz zusätzlich 2 h bei -20°C inkubiert. Es folgte eine 40minütige Zentrifugation bei 8000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Nukleinsäure-Pellet wurde mit 3 ml EtOH (100 %) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet im Exsikkator oder 50°C-Schrank getrocknet und in 100  $\mu$ l  $H_2O_{dest}$  gelöst.

**Tab. 3.15: Lösungen zur Isolierung von RNA aus *S. pneumoniae***

Komponente	Endkonzentration
<b>NAE-Puffer</b>	
Natriumacetat pH 5	50 mM
EDTA	10 mM
<b>NAES-Puffer</b>	
NAE-Puffer	
SDS	1 %
<b>NAE-gesättigtes Phenol/Chloroform (6:1)</b>	
Phenol/Chloroform 6:1	
NAE-Puffer	1/10 Vol.
dunkel bei 4°C lagern	

### 3.2.5.3 DNaseI-Verdau

Zur Entfernung der im Ansatz befindlichen DNA wurde ein DNaseI-Verdau durchgeführt. Dazu wurde der Gesamt-Nukleinsäure-Ansatz (100 µl) mit 10 U RNase-freier DNaseI (New England Biolabs) sowie 10 µl DNaseI-Puffer (10x, New England Biolabs) versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die verbleibende RNA mit 900 µl kaltem EtOH (100 %) und 50 µl Natriumacetat (3 M, pH 5) für 30 min bei - 20°C gefällt. Der Ansatz wurde 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C) und das RNA-Pellet mit 200 µl EtOH (100 %) gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst, die RNA-Konzentration am NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies) bestimmt und mittels TBE-Agarosegels (1 %; Kap. 3.2.10) kontrolliert. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert.

### 3.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) ist ein *in vitro* Verfahren zur Vervielfältigung von DNA mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Mullis *et al.*, 1986). In einem ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA, die bei 96 – 98°C in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen wird. Dadurch können beim anschließenden Absenken der Temperatur in Schritt 2 spezifische Primer an den komplementären Bereich der DNA binden. Die optimale Temperatur dieses sogenannten „Annealings“ hängt dabei von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer ab. In einem dritten Schritt erfolgt die Elongation. Dabei wird die Temperatur auf das Optimum der DNA-Polymerase, meist 72°C, erhöht, welche daraufhin die komplementären DNA-Stränge, ausgehend vom 3'-Ende der Primer synthetisiert. Durch die Wiederholung dieser drei Schritte, in der Regel sind es ca. 30 Zyklen, wird die DNA exponentiell amplifiziert, da in jedem Zyklus die zuvor neu synthetisierten DNA-Fragmente ebenfalls als Template dienen können.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Für PCRs zur Überprüfung von Transformanten und zur Amplifikation von DNA für die anschließende Sequenzierung, wurde die Taq-Polymerase RedGoldStar® (Eurogentec) aus *Thermus aquaticus* verwendet. Bei PCRs von Fragmenten, die für Klonierungen oder Transformationen verwendet werden sollten, wurde die DNA-Polymerase iProof™ (Bio-Rad) verwendet, die im Gegensatz zur RedGoldStar® eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, also eine Korrekturlesefunktion und damit eine geringere Fehlerrate besitzt. Tab. 3.16 bis Tab. 3.19 zeigen die für die jeweiligen Polymerasen verwendeten Pipettier-Schemata, sowie die Cycle-Programme.

Als Template-DNA wurde in der Regel isolierte chromosomale DNA verwendet. Lediglich bei der Überprüfung von Transformanten wurden Zellkulturen direkt als Template eingesetzt. Hierfür wurde 100 µl Kultur abzentrifugiert (1 min, 15 000 rpm), das Zellpellet in 50 µl H<sub>2</sub>O dest resuspendiert und 1-3 µl davon als Template eingesetzt. In diesem Fall wurde der erste Denaturierungsschritt auf 5-10 min verlängert.

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte zur anschließenden Sequenzierung oder PCR wurde das Jet quick PCR-Purification Kit (Genomed) oder das Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Die DNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies) bestimmt.

**Tab. 3.16:** Pipettierschema für einen PCR-Ansatz mit der RedGoldStar<sup>®</sup>-DNA-Polymerase

Komponente	Menge
Template DNA	1 – 2 µl
Primer fw (10 pmol/µl)	1 µl
Primer rev (10 pmol/µl)	1 µl
Puffer (10x)	5 µl
dNTPs (10 nmol/µl)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 nmol/µl)	4 µl
RedGoldStar <sup>®</sup> -Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 50 µl

**Tab. 3.17:** Pipettierschema für einen PCR-Ansatz mit der iProof<sup>™</sup>-DNA-Polymerase

Komponente	Menge
Template DNA	0,5 – 1 µl
Primer fw (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer rev (10 pmol/µl)	2,5 µl
HF-Puffer (5x)	10 µl
dNTPs (10 nmol/µl)	1 µl
iProof <sup>™</sup> -Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 50 µl

**Tab. 3.18:** Cycleprogramm für eine PCR mit der RedGoldStar<sup>®</sup>-DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	96°C	2 min	
2	96°C	30 sec	} 30x
3	T <sub>m</sub> – 5°C	30 sec	
4	72°C	1 min/kb	
5	72°C	5 min	
6	10°C	∞	

T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur der Primer

**Tab. 3.19:** Cycleprogramm für eine PCR mit der iProof<sup>™</sup>-DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	98°C	30 sec	
2	98°C	10 sec	} 30x
3	T <sub>m</sub>	30 sec	
4	72°C	30 sec/kb	
5	72°C	5 min	
6	10°C	∞	

T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur der Primer

### 3.2.7.1 Überlappende PCR

Eine besondere Art von PCR in dieser Arbeit stellte die sogenannte überlappende PCR dar. Mit der überlappenden PCR können DNA-Fragmente mit homologen Überhängen



zusammengefügt werden, sodass ein Fragment über die gesamte Länge der Sequenz entsteht und amplifiziert wird. Die überlappende PCR wurde für Mutagenesen, sowie für das Anfügen von flankierenden Sequenzen an Resistenzkassetten verwendet.

Zunächst wurden in einer konventionellen PCR die Einzelfragmente mit homologen Überhängen generiert (Abb. 3.1 A). In der anschließenden überlappenden PCR wurden diese dann als Template-DNA verwendet (Tab. 3.20). Hierbei wurde zunächst ein PCR-Zyklus ohne Primer durchgeführt (Tab. 3.21, Abb. 3.1 B), bei der sich die homologen Enden der beiden Fragmente aneinander lagerten und selbst als Primer bzw. Template für die DNA-Polymerase fungierten. Auf diese Weise entstanden DNA-Einzelstränge, die über die gesamte Länge der beiden Sequenzen gehen. Diese dienten nach Zugabe der Primer als Template und wurden amplifiziert (Abb. 3.1 C).

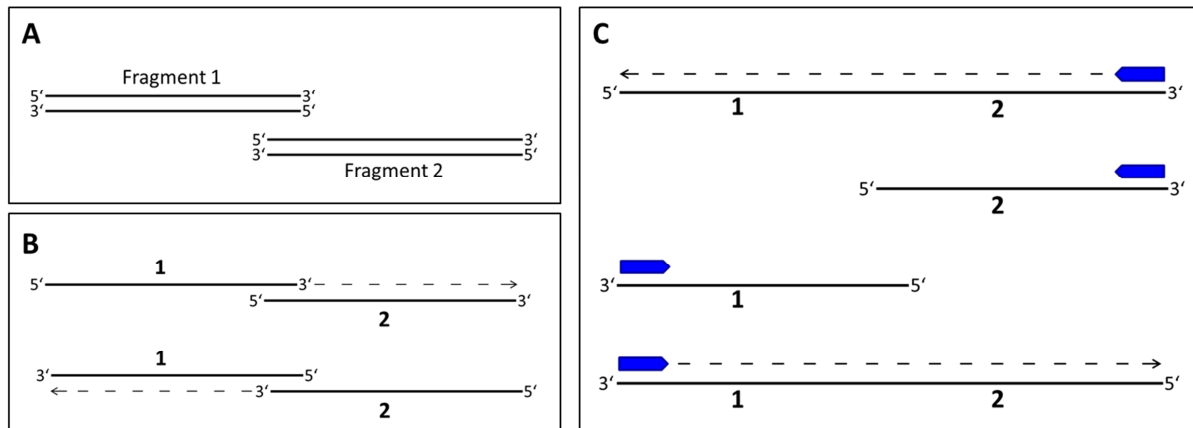
**Tab. 3.20:** : Pipettierschema eines Ansatzes für eine überlappende PCR mit der iProof<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase

Komponente	Menge
Template DNA 1	0,5 µl
Template DNA 2	0,5 µl
HF-Puffer (5x)	10 µl
dNTPs (10 nmol/µl)	1 µl
iProof <sup>TM</sup> -Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 50 µl
nach dem ersten Zyklus zugeben:	
Primer fw (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer rev (10 pmol/µl)	2,5 µl

**Tab. 3.21:** Cycleprogramm für eine überlappende PCR mit der iProof<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95°C	5 min	
2	60°C	1 min	
3	72°C	30 sec/kb	
4	30°C	Pause	(Primerzugabe)
5	98°C	30 sec	} 30x
6	98°C	10 sec	
7	T <sub>m</sub>	30 sec	
8	72°C	30 sec/kb	
9	72°C	5 min	
10	10°C	∞	

T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur der Primer



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer überlappenden PCR.** A) Durch eine konventionelle PCR werden zwei PCR-Fragmente mit homologen Enden hergestellt. B) Im ersten Zyklus der überlappenden PCR kommt es zu einer Aneinanderlagerung der homologen Enden der Fragmente und zu einer „Auffüllung“ jeweils eines Stranges ausgehend vom 3'-Ende. C) Nach dem ersten Zyklus befinden sich neben den nicht-amplifizierten Strängen der beiden Fragmente nun auch neu entstandene lange Fragmente. Durch die nun zugegebenen Primer (blaue Pfeile) kommt es zu einer Amplifikation wie bei einer konventionellen PCR.

### 3.2.8 Restriktion von DNA

Zum Verdauen von DNA (PCR-Produkte, Plasmide) mittels Endonukleasen wurden Enzyme von Roche bzw. New England Biolabs verwendet und mit den zugehörigen Puffern nach Herstellerangaben verwendet. Die Restriktion wurde in der Regel für 2 h bei 37°C durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte durch das Jet quick PCR-Purification Kit (Genomed) oder bei Gelextraktionen durch das Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel).

### 3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA Ligase von Invitrogen mit zugehörigem Puffer nach Herstellerangaben verwendet. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 18°C. Vektor und Insert wurden in der Regel in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Bei Klonierung von PCR-Produkten als Inserts in einen dephosphorylierten Vektor musste zusätzlich noch eine Kinasereaktion durchgeführt werden, da die bei der PCR verwendeten Oligonukleotide und damit auch das PCR-Produkt unphosphoryliert vorliegen und somit keine Verknüpfungsreaktion durch die Ligase katalysiert werden kann. Die Kinasereaktion

erfolgte mittels der T4 Polynukleotid Kinase (New England Biolabs) die vor der Ligase in den Ligationsansatz gegeben und 20 min bei 37°C inkubiert wurde. In diesem Fall wurde erst anschließend die Ligase zupipettiert.

### 3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Das Prinzip einer Elektrophorese beruht auf der Wanderung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld. Bei einer Agarosegelelektrophorese wandern die durch ihre Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäuren durch ein Agarosegel zur Anode. Durch die im Gel enthaltenen Poren wandern kleine Moleküle leichter, als große Moleküle, die sterisch behindert werden und sich dadurch langsamer durch das Gel bewegen. Die in einer bestimmten Zeit zurückgelegte Laufstrecke der Nukleinsäurefragmente ist dabei annäherungsweise antiproportional zu ihrer Größe.

Zur Auftrennung von DNA wurden 1 %ige Agarosegele in TAE-Puffer verwendet (Tab. 3.22). RNA wurde mit 1 %igen TBE-Agarosegelen aufgetrennt, als Auftragspuffer diente der 2x RNA-Ladepuffer von Fermentas. Die Agarose (LE Agarose, Biozym) wurde in den jeweiligen Puffern in der Mikrowelle aufgeköcht und in die Gelapparatur gegossen. Zur Ausformung der Taschen wurde in die noch flüssige Agarose ein Kamm eingesteckt. Die angelegte Spannung betrug in der Regel 120 V für eine Dauer von ca. 1 h. Als Marker diente der Generuler 1 kb-Marker (Fermentas).

Zur Detektion der Nukleinsäurebanden wurden die Gele ca. 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert und anschließend auf dem UV-Transilluminator (Appligene Oncor M-20) angeschaut und dokumentiert (Mitsubishi Video Copy).

**Tab. 3.22: Zur Herstellung von Agarosegelen verwendete Puffer**

Komponente	Menge
<b>TAE-Puffer (50x)</b>	
Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	100 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
<b>TBE-Puffer (10x)</b>	
Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0	40 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### 3.2.11 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese können, ähnlich wie bei der Agarose-Gelelektrophorese, geladene Makromoleküle anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Man erreicht mit Polyacrylamidgelen in der Regel eine bessere Trennschärfe als mit Agarosegelen und kann darüber hinaus auch kleinere Moleküle recht gut auftrennen. In dieser Arbeit wurden Polyacrylamidgele zur Auftrennung von RNA und Proteinen verwendet.

#### 3.2.11.1 SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen

Proteine wurden für Western Blots oder zur Coomassie-Färbung mit Hilfe 10 %iger SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt (Tab. 3.23). Das anionische Detergenz SDS lagert sich an die Proteine, denaturiert sie und schirmt ihre Eigenladung ab. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine ist damit nur noch weitgehend von ihrer Größe abhängig. Für die SDS-PAGE wurden Mini-Protean 3 Gelapparaturen (Bio-Rad) für eine Gelstärke von 1 mm verwendet. Über das Trenngel wurde zur besseren Bandenschärfe ein 5 %iges Sammelgel (Tab. 3.24) gegossen und zur Ausformung der Taschen ein Kamm eingesteckt. Die Zellysate (siehe Kap. 1.7.1) wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem gleichen Volumen an Natriumphosphatpuffer ohne Triton, sowie mit dem doppelten Volumen an 2x Lämmli-Probenpuffer (Tab. 3.25) versetzt und 3 min bei 95°C denaturiert. Als Marker wurden peqGoldII (peqLab) für Coomassie-Gele oder peqGoldIV für Western Blots verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Lämmli-Laufpuffer bei 120 V für ca. 1 h.

Für die Färbung der Proteine mit Coomassie wurde das Gel nach dem Laufen für ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung gelegt und leicht geschwenkt. Anschließend wurde das Gel für ca. 30 min in Entfärber 1 entfärbt. In Entfärber 2 wurde der Hintergrund des Gels weiter entfärbt und das Gel bis zur Dokumentation gelagert.

**Tab. 3.23: Zusammensetzung eines 10 %igen Trenngels für die SDS-PAGE**

Komponente	Menge
H <sub>2</sub> O	2 ml
30 % AA:0,8 % BAA	1,65 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,25 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	25 µl
TEMED (Sigma-Aldrich)	2,5 µl

**Tab. 3.24: Zusammensetzung eines 5 %igen Sammelgels für die SDS-PAGE**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
H <sub>2</sub> O	2,85 ml
30 % AA:0,8 % BAA	0,85 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	25 µl
TEMED	2,5 µl

**Tab. 3.25: Zur Durchführung einer SDS-PAGE verwendete Puffer und Lösungen**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
<b>2x Lämmli-Probenpuffer</b>	
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,875 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,875 ml
50 % Glycerin	3 ml
SDS	0,3 g
Bromphenolblau	0,2 mg
2-Mercaptoethanol	0,750 ml
<b>5x Lämmli-Laufpuffer</b>	
Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 2 l
<b>Coomassie- Färbelösung</b>	
Coomassie R-250	2 g
Coomassie G-250	50 mg
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l
Über Nacht in geschlossenem Gefäß rühren, dann filtrieren	
<b>Entfärber 1</b>	
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l
<b>Entfärber 2</b>	
Methanol	100 ml
Essigsäure	50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l

### 3.2.11.2 PAGE zur Auftrennung von RNA

Die Auftrennung von RNA für Northern Blots erfolgte mittels 10 %iger denaturierender Polyacrylamidgele mit Harnstoff (Tab. 3.26). Die verwendete, selbst hergestellte Gelapparatur für die großen Gele wurde mit 2 %iger Agarose abgedichtet. Auf das Gießen eines Sammelgels wurde verzichtet. Zur Ausformung von Taschen wurde vor dem Aushärten ein

Kamm in das Trenngel eingesteckt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 2x RNA-Ladepuffer (Fermentas) versetzt und 2 min bei 95°C im Thermoblock denaturiert.

Vor der Elektrophorese der Proben wurde die Gelapparatur mit TBE-Puffer (Tab. 3.22) befüllt und die Taschen des Gels gespült um überschüssigen Harnstoff zu entfernen. Dies führt zu einer schärferen Auftrennung der RNA. Nach einem 30 minütigen Vorlauf (200 V) ohne Proben wurden die Taschen nochmals gespült und anschließend die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V für 2-3 h. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 2 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und anschließend auf dem UV-Transilluminator (Appligene Oncor M-20) angeschaut und dokumentiert (Mitsubishi Video Copy).

**Tab. 3.26: Zusammensetzung eines 10 %igen TBE-Acrylamidgels zur Auftrennung von RNA**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
8 M Harnstoff in 1x TBE ( <b>Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.</b> )	22,5 ml
38 % AA:2 % BAA (Roth)	7,5 ml
10 % APS	200 µl
TEMED	15 µl

### 3.2.12 Western Blot

Der Begriff Western Blot bezeichnet eine Methode, bei der Proteine auf eine Membran übertragen werden. Dort können spezifische Proteine beispielsweise mit Hilfe von Antikörpern identifiziert und sichtbar gemacht werden. Die Blotting-Technik wurde von Edwin Southern erfunden, der DNA auf Membranen blottete. In Anlehnung an seinen Namen wurde das Blotten von DNA als Souther Blot und später das Blotten von Proteinen als Western Blot bezeichnet. Der Western Blot wurde von Renart (Renart *et al.*, 1979) und Towbin (Towbin *et al.*, 1979) etabliert.

#### 3.2.12.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Durchführung von Polyacrylamid-Gelelektrophoresen und Westernblots mussten die Zellen der gewünschten Stämme zunächst lysiert werden. Dazu wurden Zellkulturen bis zu

einer  $OD_{600} = 0,8$  wachsen gelassen und anschließend in 15 ml-Greiner-Röhrchen oder Eppendorf-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einer definierten Menge 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer mit 0,2 % TritonX100 resuspendiert. Die Menge des Puffers wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Kulturvolumen}}{\text{ml}} \times \frac{OD_{600}}{0,2} \times 5\mu\text{l}$$

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C im Wasserbad lysiert und anschließend bis zur Verwendung bei - 80°C weggefroren.

### **3.2.12.2 Blotten der Proteine**

Vor dem Blotten der Proteine wurden diese zunächst mittels eines 10 %igen SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt (Kap. 3.2.11.1). Die PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm), auf die die Proteine geblottet werden sollten, wurde mit Methanol aktiviert und bis zur Verwendung in Blotpuffer (Tab. 3.27) aufbewahrt. Nach der Auftrennung der Proteine wurde der Blot aufgebaut. Dabei wurden SDS-Gel und Membran luftblasenfrei zwischen in Blotpuffer getränkte Schwämme und Whatman-Filterpapier (3 mm, Schleicher und Schuell) gelegt und das Ganze in die Blotapparatur (Bio-Rad) geschoben, wobei die Membran im Blot zur Anode und das Gel zur Kathode zeigte. Um die Proteine zu blotten wurde für 1 h eine Spannung von 100 V angelegt.

### **3.2.12.3 Färben des Western Blots**

Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran zum Blocken für 30 min bei Raumtemperatur in PBS/Tween (Tab. 3.27) leicht geschwenkt. Danach wurde die Membran nochmals in frischem PBS/Tween für 2 min gewaschen. Anschließend wurde der Blot für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in einer Verdünnung des primären Antikörpers (in PBS/Tween) schwenkend inkubiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an sein Antigen, das nachzuweisende Protein. Überschüssiger Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen (2 min / 10 min / 2 min) entfernt und die Membran für 1 h in einer Verdünnung des

sekundären Antikörpers (Anti-rabbit, 1:30 000 in PBS/Tween, Sigma) geschwenkt. Dieser Antikörper bindet an den ersten und ist mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert. Der Überschuss des sekundären Antikörpers wurde anschließend ebenfalls durch mehrmaliges Waschen (2 min / 5 min / 5 min / 2 min) entfernt. Für die Färbereaktion wurde die Membran mit auf 37°C vorgewärmtem Blotsubstratpuffer (Tab. 3.27) äquilibriert. Der Puffer wurde entfernt und durch 10 ml vorgewärmte (37°C) Blotfärbelösung (Tab. 3.27) ersetzt. Die Alkalische Phosphatase reagiert mit dem NBT/BCIP in der Färbelösung, wodurch ein sichtbares dunkles Substrat entsteht. Die Färbung erfolgte im Dunkeln bei 37°C. Nach Erscheinen der Banden (nach ca. 5 - 10 min) wurde der Färbevorgang mit Wasser abgestoppt.

**Tab. 3.27: Zur Durchführung eines Western Blots verwendete Puffer und Lösungen**

Komponente	Menge/Konzentration
<b>Blotpuffer</b>	
Glycin	36,05 g
Tris	7,55 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 5 l
<b>PBS (20x)</b>	
NaCl	160 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	28,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 l
<b>PBS/Tween</b>	
PBS	
Tween20	0,05 %
<b>Blotsubstratpuffer</b>	
Tris	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
pH mit HCl auf 9,5 einstellen	
<b>Blotfärbelösung</b>	
Blotsubstratpuffer	10 ml
NBT/BCIP (Roche)	60 µl

### 3.2.13 Northern Blot

Beim Northern Blot werden, ähnlich wie beim Western Blot, Moleküle auf eine Membran übertragen. Jedoch ist es in diesem Fall RNA, die auf eine Nylon Membran geblottet wird. Durch spezifische komplementäre Digoxigenin-markierte DNA-Sonden kann man bestimmte RNAs gezielt sichtbar machen.



### 3.2.13.1 Blotten der RNA

Vor dem eigentlichen Blotten wurde 3 µg Gesamt-RNA der zu untersuchenden Stämme mittels eines 10 %igen TBE-Acrylamidgels mit Harnstoff aufgetrennt (Kap. 3.2.10). Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel ca. 2 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert und unter UV-Licht (Appligene Oncor M-20) dokumentiert (Mitsubishi Video Copy).

Für den Northern Blot wurde in 0,5x TBE-Puffer (Tab. 3.22) angefeuchtetes Whatman-Papier und das Gel auf die Kathodenseite der Blotapparatur gelegt. Auf das Gel wurde eine positiv geladene Nylon Membran (Roche) sowie eine weitere Schicht feuchtes Whatman-Papier gelegt. Es folgte die Anodenseite der Blotapparatur, die durch ein zusätzliches Gewicht beschwert wurde. Zum Blotten der RNA wurde für 30 min eine Stromstärke von 400 mA angelegt, die regelmäßig überprüft und korrigiert wurde. Nach dem Blotten wurde die RNA durch UV-Crosslinking kovalent an der Membran fixiert. Hierzu wurde die Membran für 1 min mit UV-Licht von 0,120 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt (BLX254, Biotech).

### 3.2.13.2 Färben des Northern Blots

Zum Färben des Blots wurde die Membran zunächst mit der RNA-Seite nach innen in ein Hybridisierungsröhrchen mit 20 ml Prähybridisierungspuffer (Tab. 3.28) gelegt und für 30 min bei 50°C im Hybridisierungsöfen gedreht. Anschließend wurde der Puffer durch die Hybridisierungslösung mit den Digoxigenin-markierten Sonden (hergestellt mittels des DIG Oligonukleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd Generation, Roche) ersetzt und über Nacht drehend bei 50°C hybridisiert. Dabei binden die Sonden spezifisch an ihre komplementäre RNA.

Die anschließenden Waschschrte erfolgten schwenkend in Plastikschälchen bei Raumtemperatur. Die Hybridisierungslösung wurde abgekippt und Reste der Sonden durch je 15 minütiges Waschen mit jeweils zweimal Waschlösung 1 und zweimal Waschlösung 2 entfernt (Tab. 3.28). Anschließend wurde die Membran für 1 min in Waschpuffer äquilibriert und für 30 – 60 min in Blocking Puffer inkubiert. Es folgte eine mindestens 30 minütige Inkubation mit Anti-Digoxigenin-Antikörper-Verdünnung (1:5000 in Blocking Puffer, Roche). Diese Antikörper binden an die Digoxigenin-markierten Sonden und sind zusätzlich mit Alkalischer Phosphatase konjugiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen für 15 min mit Waschpuffer entfernt. Vor der Färbung wurde die Membran für

1 min in Detektionspuffer äquilibriert. Der Puffer wurde entfernt und durch 10 ml vorgewärmte (37°C) Blotfärbelösung ersetzt. Die Färbung selbst funktioniert analog zum Western Blot. Nach Erscheinen der Banden (nach ca. 5 - 15 min) wurde der Färbeprogang mit Wasser abgestoppt.

**Tab. 3.28: Zur Durchführung eines Northern Blots verwendete Puffer und Lösungen**

<b>Komponente</b>	<b>Menge/Konzentration</b>
<b>Prähybridisierungspuffer</b>	
SDS	5 %
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 mM
Blocking Agent (10x)	1 ml
<b>Hybridisierungslösung</b>	
Prähybridisierungspuffer	20 ml
DIG-markierte Sonden (10 µM)	20 µl
<b>SSC (20x)</b>	
NaCl	3 M
Na <sub>3</sub> Citrat	0,3 M
mit HCl auf pH 7,0 einstellen	
<b>Waschlösung 1</b>	
SSC	2x
SDS	0,1 %
<b>Waschlösung 2</b>	
SSC	0,5x
SDS	0,1 %
<b>Waschpuffer</b>	
Waschpuffer 10x (Roche)	1x in H <sub>2</sub> O
<b>Blocking Puffer</b>	
Blocking Solution 10x (Roche)	1x in H <sub>2</sub> O
Maleinsäurepuffer 10x (Roche)	1x in H <sub>2</sub> O
<b>Detektionspuffer</b>	
Tris	0,1 M
NaCl	0,1 M
mit HCl auf pH 9,5 einstellen	

### 3.2.14 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Als minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet man die Konzentration eines Antibiotikums, bei der gerade kein Wachstum der Bakterien mehr zu erkennen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die MHK mit Hilfe der Tropfenmethode untersucht, bei der ein bestimmtes Volumen Bakterienkultur auf Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen des

zu untersuchenden Antibiotikums aufgetropft wurden. Diese Methode orientiert sich an der von Andrews (2001) beschriebenen Vorgehensweise zur Bestimmung von MHKs.

Die Bakterien wurden in der Regel in C+Y-Medium bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 inkubiert und anschließend 1:1000 in eiskalter Saline verdünnt. Für das zu untersuchende Antibiotikum wurden frische D-Agarplatten mit abgestuften Antibiotikakonzentrationen hergestellt (Tab. 3.29). Auf diese Platten wurde je 30 µl der Bakterienverdünnung aufgetropft und 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten dokumentiert (Kamera: Sony DFW-X700).

**Tab. 3.29: Pipettierschema zur Herstellung von D-Blutagar-Platten für MHK-Versuche**

Komponente	Menge
D-Medium	47,5 ml
Agar	0,75 g
Schafsblut	1,5 ml
Antibiotikum	je nach Konzentration
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1ml
Gesamtvolumen	50 ml

### 3.2.15 β-Galaktosidaseassay

Zur Bestimmung der Promotorstärke CiaR-regulierter Promotoren in bestimmten Stämmen bzw. unter bestimmten Bedingungen wurden β-Galaktosidaseassays durchgeführt. Hierzu wurde das Plasmid pPP2 (Pneumo-Promotor-Probe; Halfmann *et al.*, 2007a) verwendet, das eine Reporterfusion aus dem β-Galaktosidasegen *lacZ* von *E. coli* trägt, vor das der zu untersuchende Promotor kloniert wurde. Die Translationsinitiationssignale des *lacZ*-Gens, also die Ribosomenbindestelle und das Startcodon stammen von dem Gen *htrA* aus *S. pneumoniae*. Der Bereich des Plasmids pPP2 der die Reporterfusion sowie *tetM*, ein Tetracyclin-Resistenzgen, enthält, integriert in *S. pneumoniae* anstelle des nativen β-Galaktosidasegens *bgaA* ins Genom. Die Menge der in diesen Stämmen gebildeten β-Galaktosidase hängt also ausschließlich von der Stärke des zu untersuchenden Promotors ab.

Die β-Galaktosidaseassays in dieser Arbeit wurden in Anlehnung an die Methode nach Miller durchgeführt (Miller, 1972). Dabei wird die Menge an β-Galaktosidase indirekt über die enzymatische Spaltung von o-Nitrophenol-β-D-Galaktopyranosid (ONPG) zu Galaktose und

o-Nitrophenol (ONP) bestimmt. Die Zunahme von o-Nitrophenol kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen werden und ist ein Maß für die Menge an  $\beta$ -Galaktosidase im Reaktionsansatz. Im Gegensatz zu der Methode nach Miller handelt es sich bei den hier durchgeführten Assays nicht um Endpunktassays, da die Zunahme der Extinktion bei 420 nm photometrisch über die Zeit verfolgt wurde. Zudem dient als Bezugsgröße die Gesamtproteinmenge im Ansatz und nicht die optische Dichte der eingesetzten Kultur.

### 3.2.15.1 Durchführung des $\beta$ -Galaktosidaseassays

Zur Durchführung eines  $\beta$ -Galaktosidaseassays wurde eine Zellkultur in der Regel bis  $OD_{600} = 0,8$  herangezogen. 2 ml der Kultur, bei niedrigeren Zelldichten entsprechend mehr, wurden 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C). Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet in 500  $\mu$ l Lysepuffer (Tab. 3.30) resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend solange bei 37°C inkubiert, bis die Lyse sichtbar abgeschlossen war, d. h. bis der Ansatz klar wurde. Nach vollständiger Lyse wurden die Lysate bis zur Verwendung auf Eis gestellt.

Zum Starten der Assays wurden 200  $\mu$ l Lysat mit 800  $\mu$ l auf 30°C vorgewärmtem ONPG (Tab. 3.30) versetzt. Eine Messung erfolgte über einen Gesamtzeitraum von 15 min mit Messintervallen von 30 s.

**Tab. 3.30: Puffer und Lösungen zur Durchführung des  $\beta$ -Galaktosidaseassays**

Komponente	Konzentration
<b>Z-Puffer (pH 7)</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	46 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	2,7 ml/l
<b>Lysepuffer</b>	
Z-Puffer	
TritonX100 (Stammlsg. 10 %)	0,05 %
<b>ONPG</b>	
ONPG (Sigma)	1 mg/ml in Z-Puffer

### 3.2.15.2 Auswertung des $\beta$ -Galaktosidaseassays

Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wird als Units in nmol freigesetztes o-Nitrophenol (ONP) pro mg Protein pro Minute angegeben. Diese errechnen sich wie folgt:

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

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

$$V = \text{Reaktionsvolumen} = 1 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} \epsilon &= \text{Absorptionskoeffizient von o-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 420 nm} \\ &= 4,5 \cdot 10^3 \left[ \frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right] \end{aligned}$$

$$d = \text{Lichtweg} = \text{Dicke der Küvette} = 1 \text{ cm}$$

$$m = \text{Masse des Proteins im Reaktionsansatz [mg]}$$

Zur Bestimmung der Masse des Proteins im Reaktionsansatz benötigt man die Gesamtproteinkonzentration der Lysate. Diese wurde mit der Methode nach Bradford (1976) ermittelt.

### 3.2.15.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode nach Bradford ermöglicht die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration einer Lösung (Bradford, 1976). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 kommt in verschiedenen Zuständen vor, deren Absorptionsmaxima jeweils bei unterschiedlichen Wellenlängen liegen. Binden Proteine an den Farbstoff, so geht er vom kationischen in den anionischen Zustand über und sein Absorptionsmaximum verschiebt sich von 470 nm auf 595 nm. Diese Absorptionsänderung ist über weite Bereiche proportional zur Proteinkonzentration und kann photometrisch bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde die Coomassie Brilliant Blue-G250-Färbelösung Roti<sup>®</sup>-Quant (Roth) verwendet. Die Versuchsdurchführung orientierte sich an dem Protokoll für einen

Mikroansatz (1-20 µg Protein). Ein 1 ml-Ansatz enthielt jeweils 200 µl 5x Färbelösung Roti<sup>®</sup>-Quant, 790 µl Z-Puffer (Tab. 3.30) und 10 µl Lysat (bzw. Lysepuffer für den Blindwert). Die Ansätze wurden jeweils 20 min inkubiert bevor die Absorption bei OD<sub>595</sub> bestimmt wurde. Als Standard wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt, wobei die OD<sub>595</sub> gegen die BSA-Menge in µg/ml Reaktionsansatz aufgetragen wurde.

### 3.2.16 Konstruktion der Stämme mit veränderten *ciaH*-Allelen

Um die *ciaH*-Allele verschiedener resistenter Laborstämme unabhängig von deren teilweise unbekanntem veränderten genetischen Loci zu untersuchen, mussten diese in einen *S. pneumoniae*-Stamm mit bekanntem genetischen Hintergrund gebracht werden. Stämme mit veränderten *ciaH*-Allelen wurden mit Hilfe der Janus-Kassette (Sung *et al.*, 2001) hergestellt. Die Janus-Kassette besteht aus dem Kanamycinresistenzgen *aphIII* und dem dominant-Streptomycinsensitivität-verleihenden Wildtyp-Allel des Gens *rpsL*. Diese spezielle Konstruktion ermöglicht eine Selektion sowohl beim Einbringen der Kassette, als auch bei ihrem Entfernen. Einzige Voraussetzung für die Benutzung dieser Kassette ist, dass der verwendete Stamm das *rpsL41*-Allel (Salles *et al.*, 1992) im Genom trägt, welches Streptomycinresistenz verleiht. Der Austausch von einem Gen mit Hilfe der Janus-Kassette erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird die Janus-Kassette durch Selektion auf Kanamycin ins Genom eingebracht. Der dadurch entstehende Stamm ist kanamycinresistent und durch das dominante *rpsL*-Allel auf der Kassette nun auch streptomycinsensitiv. Im zweiten Schritt wird die Kassette durch homologe Rekombination mit dem gewünschten DNA-Fragment wieder aus dem Genom entfernt, wobei die Selektion auf Streptomycin erfolgt.

Um die veränderten *ciaH*-Allele der resistenten *S. pneumoniae*-Labormutanten C102, C103, C202, C305, C306, P208 und P408 gegen das Wildtyp-Allel verschiedener *S. pneumoniae* R6-Stämme auszutauschen, erhielten diese zunächst durch Transformation das *rpsL41*-Allel (RKL242). Anschließend wurde die Janus-Kassette anstelle von *ciaH* ins Genom integriert. Die Janus-Kassette mit den flankierenden DNA-Abschnitten, einem 898 bp langen „upstream“-Bereich und einem 745 bp langen „downstream“-Bereich der *CiaRH*-Region, wurde mit den Primern *CiaHup\_f* und *CiaHdown\_r* aus dem Stamm R6 *ciaH::janus* amplifiziert und transformiert. Bei den so entstandenen Stämmen wurde die Janus-Kassette anschließend wieder durch, mit den selben Primern hergestellte, Amplifikate der *ciaRH*-

Region der verschiedenen resistenten Labormutanten ersetzt. So entstanden die Stämme mit den *ciaH*-Allelen *ciaH103*, *ciaH202*, *ciaH305*, *ciaH306*, *ciaH208* und *ciaH408*.

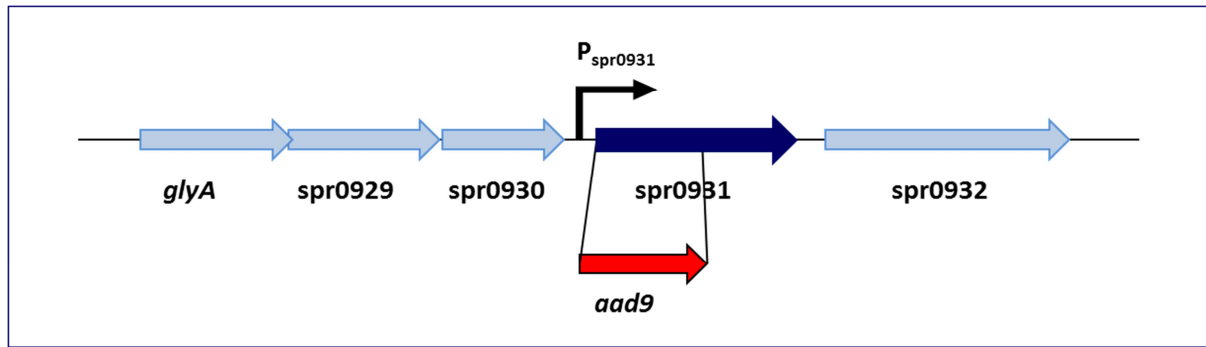
Die *ciaH*-Allele der beiden Labormutanten C202 und P408 tragen zwei Punktmutationen, die nacheinander entstanden sind. Um die jeweils zweite Punktmutation isoliert von der ersten untersuchen zu können, wurden mit Hilfe von Mutageneseprimern (MutC202\_for, MutC202\_rev, MutP408\_for, MutP408\_rev) *ciaH*-Allele generiert, die nur jeweils die zweiten Mutationen tragen. Die verwendeten Mutageneseprimer sind zueinander und zu der Region der jeweiligen Mutation homolog, wobei die Primer die Punktmutation „up“- und „downstream“ um 15 – 20 bp überragen. In einer ersten PCR wurden mit den Mutageneseprimern, sowie mit den Primern CiaHup\_f und CiaHdown\_r zwei Fragmente generiert, die durch die Mutageneseprimer zueinander homologe Überhänge besitzen. Dies ermöglichte es in einer zweiten, überlappenden PCR die beiden PCR-Produkte zusammenzufügen (siehe Kap. 3.2.7.1). Die so entstandenen Fragmente mit den *ciaH*-Allelen *ciaH202s* und *ciaH408s* wurden in die jeweiligen R6 *ciaH::janus*-Stämme transformiert.

Da die in der Stammsammlung befindliche Labormutante C102 ein Stoppcodon aufwies, das nachträglich entstanden sein muss, wurde das Allel *ciaH102* mit der ursprünglichen Mutation analog zu den Mutationen in *ciaH202s* und *ciaH408s* mit Mutageneseprimern (MutC102\_for, MutC102\_rev) hergestellt.

### 3.2.17 Konstruktion des Deletionsderivats R6 spr0931::*aad9*

Das Gen spr0931 wurde durch die Spectinomycin-Resistenzkassette *aad9* ausgeschaltet. Die Konstruktion wurde so gewählt, dass das Resistenzgen mit dem Startcodon von spr0931 beginnt. Damit liegt Transkription und Translation des Resistenzgens unter der selben Kontrolle wie das ursprüngliche spr0931. Die letzten 322 nt des Gens spr0931 blieben erhalten, liegen aber nicht im selben Leseraster wie *aad9*.

Die Resistenzkassette *aad9* (Mascher *et al.*, 2003) wurde mit den Primern spec\_for und spec\_rev amplifiziert. Um diese an die gewünschte Position ins Genom zu integrieren, wurde mit den Primern 931up\_for, 931up\_rev, 931down\_for und 931down\_rev „Up“- und „Downstream“-Fragmente amplifiziert und durch überlappende PCR mit der Kassette fusioniert. Das resultierende Produkt wurde in *S. pneumoniae* R6 transformiert und auf D-Blutagarplatten mit 40 µg/ml Spectinomycin selektioniert. Die Sequenz des fertigen Deletionskonstrukts ist im Anhang dargestellt (Abb. A1).



**Abb. 3.2: Insertionsdeletion des Gens spr0931.** Das Gen spr0931 ist dunkelblau dargestellt, die flankierenden Gene hellblau. Die Resistenzkassette *aad9* (roter Pfeil) ersetzt einen Teil des Gens spr0931 und steht unter der Kontrolle des CiaR-regulierten Promotors  $P_{spr0931}$  (schwarzer Pfeil).

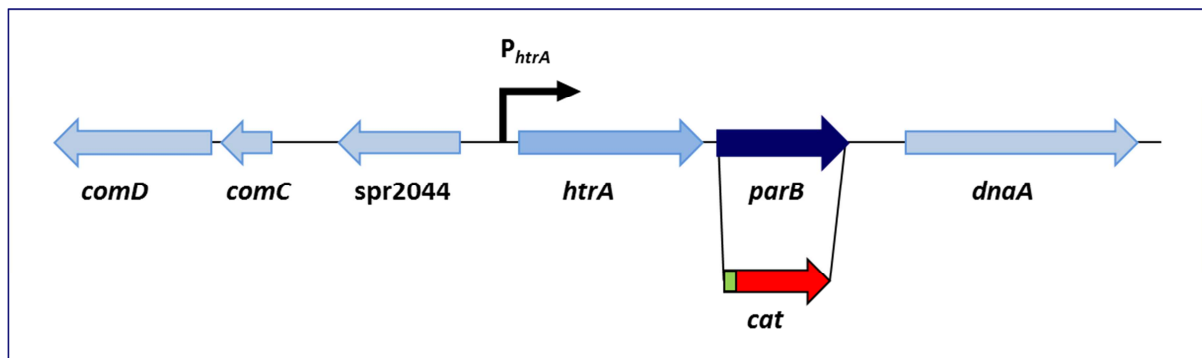
### 3.2.18 Konstruktion des Deletionsderivats R6 *parB::cat*

Zur Inaktivierung des Gens *parB* wurde eine Chloramphenicol-Resistenzkassette verwendet. *ParB* ist das zweite Gen des *htrA/parB*-Operons. Dieses liegt in unmittelbarer Nähe zum Replikationsursprung, weshalb genetische Veränderungen in diesem Bereich weitreichende Folgen für die Chromosomenvermehrung und -verteilung haben können und auf ein minimales Maß beschränkt werden sollten. Da für *parB* keine eindeutige Shine-Dalgarno-Region identifiziert werden konnte, wurde die eigene Shine-Dalgarno-Sequenz der Resistenzkassette mit integriert. Somit liegt das Resistenzgen unter transkriptioneller Kontrolle des *htrA*-Promotors, aber unter eigener translationeller Kontrolle. Die integrierte Sequenz beginnt 4 bp „upstream“ des ursprünglichen Startcodons von *parB* und endet am ursprünglichen Stoppcodon.

Zur Konstruktion des Deletionsfragments wurden drei Einzelfragmente amplifiziert: mit den Primern *cat\_for* und *cat\_rev* wurde die Chloramphenicol-Kassette (Halfmann *et al.*, 2007b; Brückner *et al.*, 1984) amplifiziert, mit den Primern *parBup\_for* und *parBup\_rev* das „Upstream“-Fragment und mit den Primern *parBdown\_for* und *parBdown\_rev* das „Downstream“-Fragment. Diese Fragmente sollten wiederum mittels überlappender PCR verbunden werden. Hier traten allerdings technische Probleme auf, da eine Verknüpfung des „Downstream“-Fragments mit dem Ende der Resistenzkassette trotz mehrmaliger Versuche mit variierenden Versuchsbedingungen nicht gelang. Als Alternative zur überlappenden PCR wurden diese beiden Fragmente („Upstream“-Region mit fusionierter Kassette, „Downstream“-Fragment) durch Restriktion und Ligation verbunden. Hierzu wurden Primer



mit integrierter *Bam*HI-Schnittstelle verwendet. Das „Upstream“-Fragment mit fusionierter Kasette wurde mit den Primern *parBup\_for* und *parB-Bam\_rev*, das „Downstream“-Fragment mit den Primern *parB-Bam\_for* und *parBdown\_rev* reamplifiziert. Beide Fragmente wurden über glatte Enden in die Vektoren pUC18 und pUC19 kloniert und in *E. coli* vermehrt, anschließend isoliert, geschnitten und nach erfolgreicher Ligation in *S. pneumoniae* transformiert. Die Sequenz des fertigen Deletionskonstrukts ist im Anhang dargestellt (Abb. A2).



**Abb. 3.3: Insertionsdeletion des Gens *parB*.** Das Gen *parB* ist dunkelblau dargestellt, die flankierenden Gene hellblau. Die Resistenzkassette *cat* (roter Pfeil) mit eigener Shine-Dalgarno-Region (grün) ersetzt das Gen *parB* und steht unter der Kontrolle des CiaR-regulierten Promotors  $P_{htrA}$  (schwarzer Pfeil).

### 3.2.19 Konstruktion der *htrA*-Komplementationsstämme

Zur Verifizierung der mit den *htrA*-Deletionsstämmen erzielten Ergebnisse wurde *htrA* in einigen Stämmen komplementiert. Dazu standen zwei Komplementationskonstrukte zur Verfügung, das Konstrukt *bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-htrA* und das Plasmid pKP01. Beide Konstruktionen umfassen *htrA* mit eigener Promotorregion und integrieren an einem vom nativen *htrA*-unabhängigen Bereich ins Genom.

Das Konstrukt *bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-htrA* trägt das *htrA*-Gen einschließlich 108 bp vor und 52 bp nach dem codierenden Bereich. Es integriert zwischen *spr0564* und *bgaA* ins Genom von *S. pneumoniae*. Somit integriert es an die selbe Position wie das Plasmid pPP2 und seine Derivate. Durch Integration dieses Konstrukts in den Stamm R6 *htrA::aphIII* entstand der Komplementationsstamm R6 *htrA::aphIII P<sub>htrA</sub>-htrA*.

Das Plasmid pKP01 enthält *htrA* einschließlich 164 bp vor und 53 bp nach dem codierenden Bereich. Dieses Plasmid integriert zwischen *bgaA* und *spr0566* ins Genom von

*S. pneumoniae*. Diese Integrationsstelle hat den Vorteil, dass der Integrationsbereich der Pneumo-Promotor-Probe Plasmide (pPP2) weiterhin zu Verfügung steht und somit mit diesen Komplementationsstämmen  $\beta$ -Galaktosidaseassays durchgeführt werden können. Des Weiteren gibt es von diesem Plasmid eine Variation, bei der das Codon des Serins der katalytischen Triade von HtrA so verändert wurde, dass es nun für ein Alanin codiert.

### 3.2.20 Konstruktion des rifampinresistenten Stammes RKL222 zur Verwendung als Transformationsmarker

Durch den streptomycinresistenten genetischen Hintergrund der Stämme, die mit Hilfe der Janus-Kassette hergestellt wurden, konnte man die Kompetenz dieser Stämme nicht mehr mit dem üblichen Resistenz-Marker Strep<sup>R</sup> untersuchen. Daher wurde im Zuge dieser Arbeit ein neuer Resistenz-Marker entwickelt.

In verschiedenen klinischen *S. pneumoniae*-Isolaten wurden Punktmutationen im Gen *rpoB* identifiziert, die zu einer hohen Resistenz gegen das Antibiotikum Rifampin führten (Chen *et al.*, 2004). *RpoB* codiert für die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase, das Target von Rifampin. Besonders Austausch des Histidins an Position 499, was bei der aktuellen Annotation des R6 Genoms der Position 486 entspricht, führten zu einer stark erhöhten MHK von mehr als 256  $\mu\text{g/ml}$ .

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Mutageneseprimer *rpoB*-H499Y\_for und *rpoB*-H499Y\_rev und der „up“- und „downstream“ liegenden Primern *rpoB*-seq1 und *rpoB*-seq2 durch überlappende PCR ein Fragment generiert, das in *S. pneumoniae* R6 transformiert wurde. Durch Selektion auf Rifampin entstand der Stamm RKL222, der ein *rpoB*-Allel mit der Punktmutation C1456T trägt, die zum Aminosäureaustausch von Histidin486 zu Tyrosin führt. Während beim Wildtyp die MHK von Rifampin zwischen 0,01 und 0,05  $\mu\text{g/ml}$  liegt, zeigt RKL222 eine MHK von über 10  $\mu\text{g/ml}$ . Bei der Verwendung der chromosomalen DNA von RKL222 als Transformationsmarker liegt die Transformationseffizienz bei einer Rifampinkonzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  nur um etwa Faktor 10 unter der Effizienz des üblichen Markers, der chromosomalen DNA von R6 Strep<sup>R</sup> (*rpsL41*). Bedingt durch das langsamere Wachstum der Transformanten wurden die Agarplatten 48 h bei 37°C inkubiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die *ciaH*-Allele aus $\beta$ -lactamresistenten Spontanmutanten von *S. pneumoniae* R6

Bei Untersuchungen zur  $\beta$ -Lactamresistenz bei *S. pneumoniae* wurde *ciaH* als die erste nicht-PBP-Resistenzdeterminante identifiziert (Guenzi *et al.*, 1994, Hakenbeck *et al.*, 1999). Unter Laborbedingungen entstanden durch Selektion auf sukzessiv gesteigerten Antibiotikakonzentrationen verschiedene Mutantenfamilien, die auf veränderte Genloci hin untersucht wurden (Laible und Hakenbeck, 1987). Spontanmutationen im Histidinkinasegen *ciaH* traten, neben Mutationen in *pbp*-Genen, sowohl bei der Selektion gegen Cefotaxim (Zähler *et al.*, 2002), als auch gegen Piperacillin auf (Tab. 4.1).

**Tab. 4.1: Übersicht über die verschiedenen *ciaH*-Allele, die in *S. pneumoniae* R6 Spontanmutanten identifiziert wurden, welche durch sukzessive Selektion auf Antibiotika entstanden sind.**

Spontanmutante	Selektions-Antibiotikum	<i>ciaH</i> -Allel	Punktmutation in <i>ciaH</i>	Aminosäureaustausch in CiaH
<i>S. pneumoniae</i> R6 C102	Cefotaxim	<i>ciaH</i> 102	<i>ciaH</i> C706A	Q236K
<i>S. pneumoniae</i> R6 C103	Cefotaxim	<i>ciaH</i> 103	<i>ciaH</i> C608T	A203V
<i>S. pneumoniae</i> R6 C202	Cefotaxim	<i>ciaH</i> 202	<i>ciaH</i> C706A G1237A	Q236K, A413T
<i>S. pneumoniae</i> R6 P208	Piperacillin	<i>ciaH</i> 208	<i>ciaH</i> A721C	T241P
<i>S. pneumoniae</i> R6 C305	Cefotaxim	<i>ciaH</i> 305	<i>ciaH</i> A283G	N95D
<i>S. pneumoniae</i> R6 C306	Cefotaxim	<i>ciaH</i> 306	<i>ciaH</i> A688C	T230P
<i>S. pneumoniae</i> R6 P408	Piperacillin	<i>ciaH</i> 408	<i>ciaH</i> G310A A721C	D104N, T241P
		<i>ciaH</i> 202s <sup>a</sup>	<i>ciaH</i> G1237A	A413T
		<i>ciaH</i> 408s <sup>a</sup>	<i>ciaH</i> G310A	D104N

<sup>a</sup> Hergestellt durch gerichtete Mutagenese

Von dem bereits gut untersuchten *ciaH*-Allel *ciaH*306 aus der Spontanmutante *S. pneumoniae* R6 C306 weiß man, dass mit ihm eine starke Aktivierung der CiaR-abhängigen Genregulation einhergeht (Mascher *et al.*, 2003, Halfmann *et al.*, 2007b). Das bedeutet, dass der durch die Punktmutation in *ciaH*306 vermittelte Aminosäureaustausch in der Histidinkinase CiaH zu einer stärkeren Phosphorylierung des Responseregulators CiaR führt und damit zu einer

gesteigerten Genregulation des CiaR-Regulons. Dies bildet vermutlich die Grundlage für die etwa 2-fache Erhöhung der Resistenz gegenüber verschiedenen  $\beta$ -Lactamantibiotika, die man durch Einbringen von *ciaH306* in den Wildtyp R6 erreicht (Guenzi *et al.*, 1994, Giammarinaro *et al.*, 1999). Für die anderen Allele aus den *S. pneumoniae* R6 Spontanmutanten C102, C103, C202, P208, C305 und P408 ist zwar bekannt, dass es in dem Selektionsschritt, in dem sie entstanden sind zu einer Erhöhung der Resistenz kam (Zähler *et al.*, 2002), ob dieser Effekt jedoch auf eine Aktivierung des CiaRH-Systems, oder auf andere, unbekannte Resistenzdeterminanten zurückgeht ist noch weitestgehend ungeklärt. Im Zuge dieser Arbeit wurde untersucht, ob und wenn ja welchen Effekt diese Punktmutationen in den bislang noch nicht oder nur rudimentär untersuchten *ciaH*-Allelen auf die Aktivität des TCS CiaRH und die damit verknüpften Phänotypen haben. Die ermöglicht eventuell auch Rückschlüsse auf die Funktionsweise der Histidinkinase. Dazu wurden die verschiedenen *ciaH*-Allele aus den Spontanmutanten anstelle des *ciaH*-Wildtyp-Allels in *S. pneumoniae* R6 Strep<sup>R</sup> eingebracht, den R6-Wildtypstamm, der aufgrund der für den Allel-Austausch verwendeten Methode das Streptomycinresistenz vermittelnde *rpsL41* Allel trägt. Ohne die weiteren, teilweise unbekanntes Mutationen der Spontanmutanten können die Effekte der *ciaH*-Mutationen genauer untersucht werden.

#### **4.1.1 Die Instabilität der *ciaH*-Allele und die daraus resultierenden technischen Konsequenzen**

Die Herstellung der für die Untersuchungen benötigten Stämme mit den verschiedenen *ciaH*-Allelen stellte sich als nicht trivial heraus. Schon beim Einbringen der *ciaH*-Allele in den Wildtyp fiel auf, dass neben der gewünschten *ciaH*-Mutation häufig unerwünschte Zusatzmutationen in *ciaR* oder *ciaH* auftraten. Besonders oft wurden nach Transformationen, wie etwa beim Einbringen der Promotor-Probe-Plasmide, trotz Zugabe des kompetenzinduzierenden Peptids CSP Transformanten gepickt, die eine oder mehrere Zusatzmutationen trugen. Dieser Umstand im Zusammenhang mit *ciaH*-Allelen ist nicht ganz neu. Bereits bei Giammarinaro *et al.* (1999) konnte bei Versuchen zum Zusammenhang zwischen Kompetenz und Resistenz eine Transformante eines Stammes mit dem kompetenzinhibierenden Allel *ciaH306* identifiziert werden, die eine spontane Punktmutation in *ciaR* besaß. Die Deletion eines Thymins führte nachfolgend zu einem Stoppcodon und somit zu einem verkürzten CiaR-Protein (Giammarinaro *et al.*, 1999). Diese Transformante

zeigte im Gegensatz zum Ausgangsstamm eine wiederhergestellte Kompetenzentwicklung, sowie eine reduzierte  $\beta$ -Lactamresistenz. Es handelte sich dabei also um eine Pseudorevertante. Es ist anzunehmen, dass es durch die Mutation in *ciaR* zur Synthese eines nicht-funktionellen Responseregulators kam und dadurch die *ciaH306* vermittelten Phänotypen aufgehoben wurden.

Wenn man davon ausgeht, dass die, in Kombination mit den *ciaH*-Allelen auftretenden, Zusatzmutationen eine Aktivierung des CiaRH-Systems reduzieren und somit Bakterien mit diesen Zusatzmutationen wieder ihre natürliche Kompetenz entwickeln, dann ist es nachvollziehbar, dass diese Pseudorevertanten in ungewöhnlich großer Zahl nach Transformationen auftreten, da sie hier einen selektiven Vorteil haben. Dass mit einer reduzierten Aktivierung des CiaRH-Systems offensichtlich auch eine Reduktion der Resistenz einhergeht, wurde für eine entgegensteuernde Strategie verwendet. Um den Anteil an Pseudorevertanten mit Zusatzmutationen zu verringern, wurden die Kulturen vor der Anzucht der Zellen zur Transformation auf D-Agarplatten mit einer moderaten Cefotaximkonzentration (0,02  $\mu\text{g/ml}$ , entspricht der MHK für R6) ausgestrichen. Nach jeder Transformation wurde zudem die *ciaRH*-Region sequenziert um sicherzustellen, dass die Sequenz der ausgewählten Transformante korrekt war. Erstaunlicherweise traten echte Revertanten, bei denen durch Rückmutation das Wildtyp-Allel von *ciaH* wiederhergestellt wurde, nicht auf.

Obwohl sich die Häufigkeit der auftretenden Zusatzmutationen durch die Zwischenschritte auf Antibiotikaplatten verringerte, blieb das Arbeiten mit einigen *ciaH*-Allelen kritisch. Insbesondere die *ciaH*-Allele *ciaH102* und *ciaH103* wiesen trotz CSP-Zugabe ausgesprochen häufig Zusatzmutationen in den Transformanten auf und auch beim Wachstum über zu viele Generationen schienen die Pseudorevertanten zu akkumulieren. Was diese Beobachtung noch bestätigt ist die Tatsache, dass das *ciaH*-Allel der Spontanmutante *S. pneumoniae* R6 C102, die in der Stammsammlung der Arbeitsgruppe aufbewahrt wurde, ein Stoppcodon aufwies, das zum Zeitpunkt als dieser Stamm erstmals untersucht wurde noch nicht vorhanden war. Für die im Zuge dieser Arbeit vorgesehenen Experimente musste das *ciaH*-Allel *ciaH102* daher durch gerichtete Mutagenese neu hergestellt werden.

Da sich die Arbeit mit einigen der Allele als besonders schwierig herausgestellt hat, wurden, nach der Charakterisierung der Allele selbst, alle weiterführenden Versuche mit einem

verhältnismäßig stabilen *ciaH*-Allel, *ciaH202*, durchgeführt. Zusätzlich wurde *ciaH306* weiterhin verwendet, ein *ciaH*-Allel das zwar auch recht häufig Pseudorevertanten hervorruft, auf das aber aufgrund seiner historischen Bedeutung bei der Untersuchungen von CiaRH nicht verzichtet werden konnte.

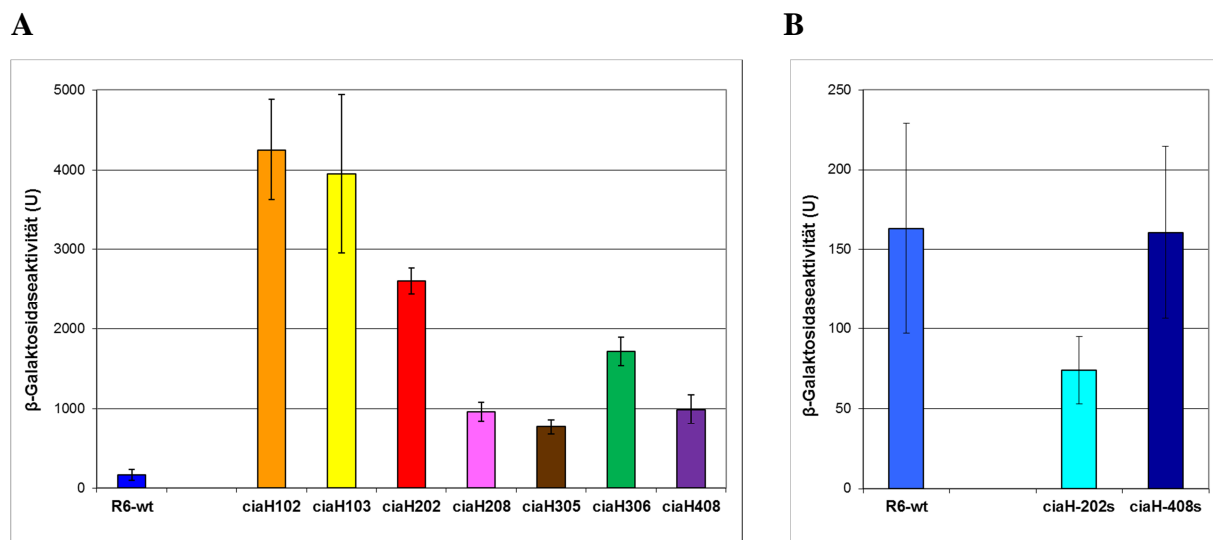
#### 4.1.2 Untersuchung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität in Stämmen mit verändertem *ciaH*

Die Auswirkungen der verschiedenen Punktmutationen in *ciaH* auf die Funktionsweise der Histidinkinase CiaH wurde indirekt über die Aktivität des korrespondierenden Responseregulators CiaR untersucht. Dazu wurde die Promotoraktivität zweier CiaR-abhängiger Promotoren,  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$ , gemessen da diese deutlich auf Veränderungen bezüglich CiaR reagieren (Halfmann *et al.*, 2007b). Sie stehen stellvertretend für die Aktivierung des gesamten CiaR-Regulons. Als Kontrolle des Versuchs diente der Promotor  $P_{vegM}$ , der konstitutiv-aktiv und nicht-CiaR-abhängig ist (Halfmann *et al.*, 2007b).

Um die Aktivitäten besagter Promotoren zu untersuchen wurden diese als Promotor-*lacZ*-Fusionen über das Plasmid pPP2 ins Genom der verschiedenen Stämme integriert und die Menge an exprimierter  $\beta$ -Galaktosidase durch  $\beta$ -Galaktosidaseassays bestimmt. Da Veränderungen im TCS CiaRH nachweislich ein Einfluss auf die Kompetenz haben können (Guenzi *et al.*, 1994), wurde bei der Transformation der Stämme mit verändertem *ciaH*-Allel CSP zur Stimulierung der Kompetenz (Håvarstein *et al.*, 1995, Zähler *et al.*, 2002) zugesetzt.

Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidaseassays sind in Tab. 4.2 und Abb. 4.1 zusammengefasst; Abb. 4.1 zeigt dabei zur besseren Übersicht nur die Aktivität des Promotors  $P_{htrA}$  in den untersuchten Stämmen. Die Untersuchung der Aktivität der CiaR-abhängigen Promotoren in den Stämmen mit den *ciaH*-Allelen der Spontanmutanten ergab in allen Fällen eine Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.1 A). Die Aktivierung durch die verschiedenen *ciaH*-Allele ist dabei jedoch nicht immer gleich stark. Die Allele *ciaH102*, *ciaH103* und *ciaH202* führen zu einer 14- bis 26-fachen Erhöhung der Promotoraktivität von  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  im Vergleich zum Wildtyp und zeigen damit eine noch stärkere Aktivierung als das bereits bekannte Allel *ciaH306* mit einer 11- bis 13-fachen Erhöhung (Tab. 4.2). Die Allele *ciaH208*, *ciaH305* und *ciaH408* zeigen eine moderatere, aber immer noch deutliche Aktivierung von  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  auf das 4- bis 6-fache (Abb. 4.1 A, Tab. 4.2).

Bei einer Studie von Mascher *et al.* (2006a) konnten bei dem *S. pneumoniae* R6-Stamm C103, der das *ciaH*-Allel *ciaH103* trägt, keine signifikante Erhöhung der *htrA*-Expression festgestellt werden. Daraus wurde gefolgert, dass diese *ciaH*-Mutation alleine keine Erhöhung der CiaRH-Aktivität vermittelt (Mascher *et al.*, 2006a). Wie Tab. 4.2 zeigt, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch für *ciaH103* eine Aktivierung des *htrA*-Promotors um das 24-fache beobachtet. Damit handelt es sich bei *ciaH103* neben *ciaH102* um das am stärksten aktivierende *ciaH*-Allel der Testreihe. In Anbetracht der Tatsache, dass sich das Allel *ciaH103* als in höchstem Maße instabil herausgestellt hat (vgl. Kap. 4.1.1), ist das Auftreten unerkannter Zusatzmutationen, die die Aktivität des CiaRH-Systems wieder reduzieren, eine durchaus plausible Erklärung für diese abweichenden Untersuchungsergebnisse in der früheren Studie. Auch der Vergleich der in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen phänotypischen Effekte von *ciaH103* mit denen, des von Mascher *et al.* (2006a) untersuchten Stamms stützen diesen Verdacht.



**Abb. 4.1:** Durch den Promotor  $P_{htrA}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 sowie der Stämme mit verschiedenen *ciaH*-Allelen. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ . **A)**  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Wildtyps R6 (RKL43) im Vergleich zu den Stämmen mit den *ciaH*-Allelen *ciaH102* (RKL185), *ciaH103* (RKL182), *ciaH202* (RKL170), *ciaH208* (RKL176), *ciaH305* (RKL173), *ciaH306* (RKL188) und *ciaH408* (RKL179) aus den durch Selektion entstandenen Spontanmutanten. **B)**  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Wildtyps R6 im Vergleich zu den Stämmen mit den durch Mutagenese hergestellten *ciaH*-Allelen *ciaH202s* (RKL306) und *ciaH408s* (RKL309).

**Tab. 4.2: Durch die Promotoren  $P_{vegM}$ ,  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität der Stämme mit verändertem *ciaH*-Allel.**

Stamm <sup>a</sup>	<i>ciaH</i> -Allel	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	$\beta$ -Galaktosidaseaktivität (U) $\pm$ Standardabweichung	Allel/wt
RKL45	<i>ciaH</i> -wt (R6)	$P_{vegM}$	931 $\pm$ 145	
RKL43		$P_{htrA}$	170 $\pm$ 14	
RKL30		$P_{spr0931}$	177 $\pm$ 37	
RKL185	<i>ciaH102</i>	$P_{vegM}$	1160 $\pm$ 163	1,2
RKL186		$P_{htrA}$	4429 $\pm$ 546	26,1
RKL187		$P_{spr0931}$	4260 $\pm$ 888	24,1
RKL181	<i>ciaH103</i>	$P_{vegM}$	1184 $\pm$ 126	1,3
RKL182		$P_{htrA}$	4031 $\pm$ 712	23,7
RKL183		$P_{spr0931}$	4236 $\pm$ 601	23,9
RKL169	<i>ciaH202</i>	$P_{vegM}$	1208 $\pm$ 163	1,3
RKL170		$P_{htrA}$	2607 $\pm$ 161	15,3
RKL171		$P_{spr0931}$	2426 $\pm$ 297	13,7
RKL175	<i>ciaH208</i>	$P_{vegM}$	938 $\pm$ 22	1
RKL176		$P_{htrA}$	961 $\pm$ 121	5,7
RKL177		$P_{spr0931}$	875 $\pm$ 132	4,9
RKL172	<i>ciaH305</i>	$P_{vegM}$	1023 $\pm$ 198	1,1
RKL173		$P_{htrA}$	763 $\pm$ 93	4,5
RKL174		$P_{spr0931}$	705 $\pm$ 112	4
RKL187	<i>ciaH306</i>	$P_{vegM}$	1193 $\pm$ 12	1,3
RKL188		$P_{htrA}$	1717 $\pm$ 177	10,1
RKL189		$P_{spr0931}$	2240 $\pm$ 243	12,7
RKL178	<i>ciaH408</i>	$P_{vegM}$	936 $\pm$ 113	1
RKL179		$P_{htrA}$	988 $\pm$ 185	5,8
RKL180		$P_{spr0931}$	974 $\pm$ 228	5,5
RKL305	<i>ciaH202s</i>	$P_{vegM}$	941 $\pm$ 103	1
RKL306		$P_{htrA}$	74 $\pm$ 21	0,4
RKL307		$P_{spr0931}$	89 $\pm$ 34	0,5
RKL308	<i>ciaH408s</i>	$P_{vegM}$	976 $\pm$ 66	1
RKL309		$P_{htrA}$	161 $\pm$ 54	0,9
RKL310		$P_{spr0931}$	174 $\pm$ 30	1

<sup>a</sup> Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ .

<sup>b</sup> Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Bei den angegebenen Units (U) handelt es sich um die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Aktivitäten.



Von den sieben untersuchten Allelen aus den Spontanmutanten stammen *ciaH102* und *ciaH202* sowie *ciaH208* und *ciaH408* aus den selben Mutantenfamilien. Eine Mutantenfamilie ist eine Bakterienlinie, die durch Selektion auf schrittweise ansteigenden Antibiotikakonzentrationen entstanden ist. Die Mutation in *ciaH102* ist dabei im ersten Selektionsschritt der Mutantenfamilie C002 entstanden. Im zweiten Schritt kam dann noch eine weitere Punktmutation in *ciaH* hinzu, sodass das *ciaH202*-Allel entstanden ist. *ciaH208* und *ciaH408* sind entsprechend in Selektionsschritt 2 und 4 der Mutantenfamilie P008 entstanden. Aufgrund dieser Entstehungsweise tragen die Allele *ciaH202* und *ciaH408* jeweils zwei Punktmutationen, die Mutationen von *ciaH102* bzw. *ciaH208*, sowie eine weitere. Wenn man sich die Aktivität der CiaR-kontrollierten Promotoren  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  in den Stämmen mit veränderten *ciaH*-Allelen anschaut, fällt auf, dass *ciaH202* anscheinend eine geringere Aktivität vermittelt als *ciaH102*, obwohl es die selbe Punktmutation besitzt und in einem höheren Selektionsschritt entstanden ist. Die Allele *ciaH208* und *ciaH408* verhalten sich bezüglich ihrer vermittelten CiaR-Aktivität dagegen nahezu gleich. Um die Rolle der jeweils zuletzt entstandenen Punktmutationen der Allele *ciaH202* und *ciaH408* etwas klarer verstehen zu können, wurden diese künstlich durch Mutagenese in das *ciaH*-Wildtyp-Allel eingebracht und untersucht. Sie wurden als *ciaH202s* und *ciaH408s* bezeichnet. Wie man in Tab. 4.2 und Abb. 4.1 B sieht, führten die Allele *ciaH202s* und *ciaH408s* im Gegensatz zu den natürlichen Allelen der Spontanmutanten zu keiner Aktivierung der untersuchten CiaR-abhängigen Promotoren. Vielmehr führte die Mutation in *ciaH202s* zu einer deutlichen Reduktion der CiaR-Aktivität. Die Promotoraktivität von  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  war in R6 *ciaH202s* im Vergleich zum Wildtyp um etwa die Hälfte geringer. Diese Mutation scheint demnach die Kinaseaktivität von CiaH zu inhibieren oder die Phosphataseaktivität zu steigern. Die Punktmutation in *ciaH408s* führte zu keiner signifikanten Veränderung der CiaR-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Der resultierende Aminosäureaustausch scheint die Funktion von CiaH unter den untersuchten Bedingungen nicht zu verändern.

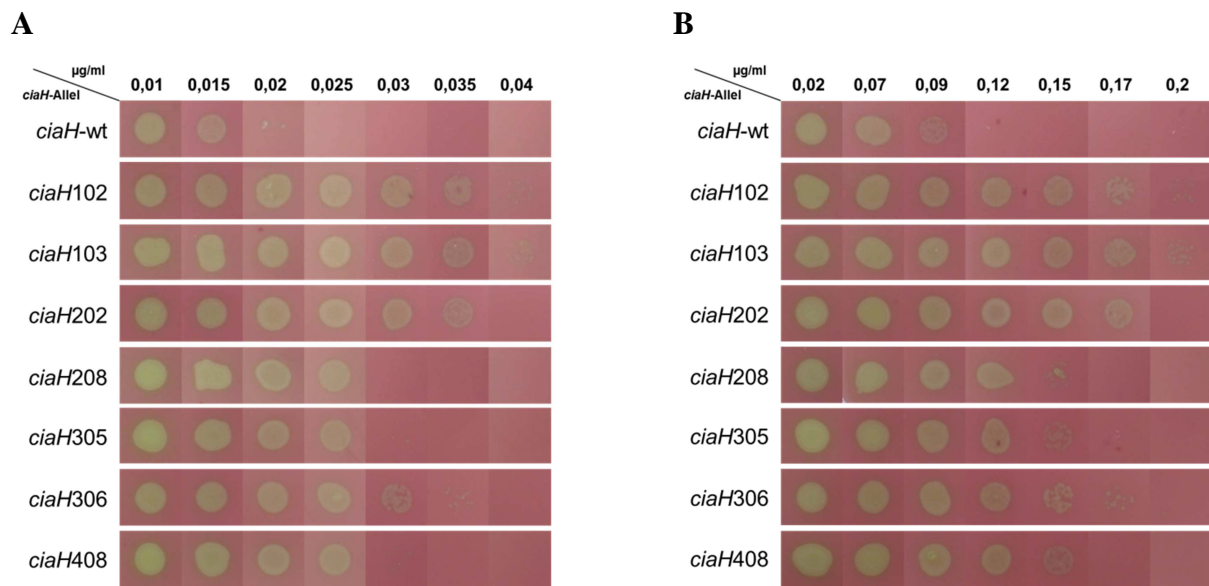
Mit dem CiaRH-System sind bekannterweise verschiedene Phänotypen von *S. pneumoniae* verknüpft, wie etwa das Lyseverhalten (Mascher *et al.*, 2006a, Giammarinaro *et al.*, 1999), die Kompetenz (Guenzi *et al.*, 1994, Zähler *et al.*, 2002) und die Resistenz gegen  $\beta$ -Lactamantibiotika (Hakenbeck *et al.*, 1999, Giammarinaro *et al.*, 1999). Um die phänotypischen Konsequenzen der CiaR-Aktivierung genauer zu bestimmen, wurden Resistenz, Wachstum und Kompetenz der Stämme mit den verschiedenen *ciaH*-Allelen untersucht. Dabei interessierte unter anderem die Frage, ob aus der Abstufung in der

Genaktivierung auch unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen resultieren. Da die Allele *ciaH202s* und *ciaH408s* zu keiner Genaktivierung führten, wurde bei ihnen auf eine phänotypische Untersuchung verzichtet.

#### 4.1.3 Der Einfluss der *ciaH*-Allele auf die $\beta$ -Lactamresistenz

Die hier untersuchten *ciaH*-Allele sind alle während der Selektion auf die beiden  $\beta$ -Lactamantibiotika Cefotaxim und Piperacillin entstanden. Dies alleine beweist jedoch nicht, dass es sich bei allen Allelen um Resistenzdeterminanten handelt. Zwar haben die vorangegangenen Versuche gezeigt, dass es bei allen Allelen der Spontanmutanten zu einer Aktivierung der CiaR-abhängigen Genexpression kommt, jedoch sind einige Aktivierungen nur moderat. Es ist vorstellbar, dass sich erst eine bestimmte Aktivierungsstärke auf die Resistenz auswirkt oder nur bei gleichzeitiger Mutation in einem weiteren Genlocus, wie es bei den Spontanmutanten möglich wäre, eine Erhöhung der Resistenz eintritt. Die Resistenz der Stämme mit verändertem *ciaH* wurde gegen die beiden  $\beta$ -Lactamantibiotika Cefotaxim und Oxacillin untersucht. Bei Cefotaxim handelt es sich um ein Cephalosporin der dritten Generation, Oxacillin ist ein Antibiotikum der Klasse der Isoxazolympenicilline. Die Minimale Hemmkonzentration wurde mit Hilfe des Tropfentests näherungsweise untersucht.

Wie Abb. 4.2 deutlich zeigt, führen alle untersuchten *ciaH*-Allele zu einem Anstieg der Resistenz gegenüber den beiden getesteten Antibiotika. Bei *S. pneumoniae* R6 mit dem *ciaH*-Wildtypallel ist auf D-Blutagarplatten mit 0,02  $\mu\text{g/ml}$  Cefotaxim, bzw. 0,12  $\mu\text{g/ml}$  Oxacillin kein Wachstum mehr zu erkennen. Die Stämme mit den *ciaH*-Allelen *ciaH102* und *ciaH103*, die die höchste Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität erwirken, wachsen noch bei Cefotaximkonzentrationen von 0,035  $\mu\text{g/ml}$  und auch bei Oxacillin ist erst bei einer Konzentration von 0,2  $\mu\text{g/ml}$  ein deutlich beeinträchtigtes Wachstum zu erkennen. Die Stämme mit den anderen Allelen zeigen eine abgestufte Resistenz, wobei die Allele die eine mittelstarke Aktivierung des CiaRH-Systems verursachen (*ciaH202*, *ciaH306*) auch einen deutlicheren Resistenzanstieg bewirken, als die „moderaten“ *ciaH*-Allele *ciaH208*, *ciaH305* und *ciaH408*. Doch selbst diese erhöhen die Resistenz ihrer Stämme sichtbar und zeigen noch ein deutliches Wachstum auf 0,025  $\mu\text{g/ml}$  Cefotaxim, sowie auf 0,12  $\mu\text{g/ml}$  Oxacillin.



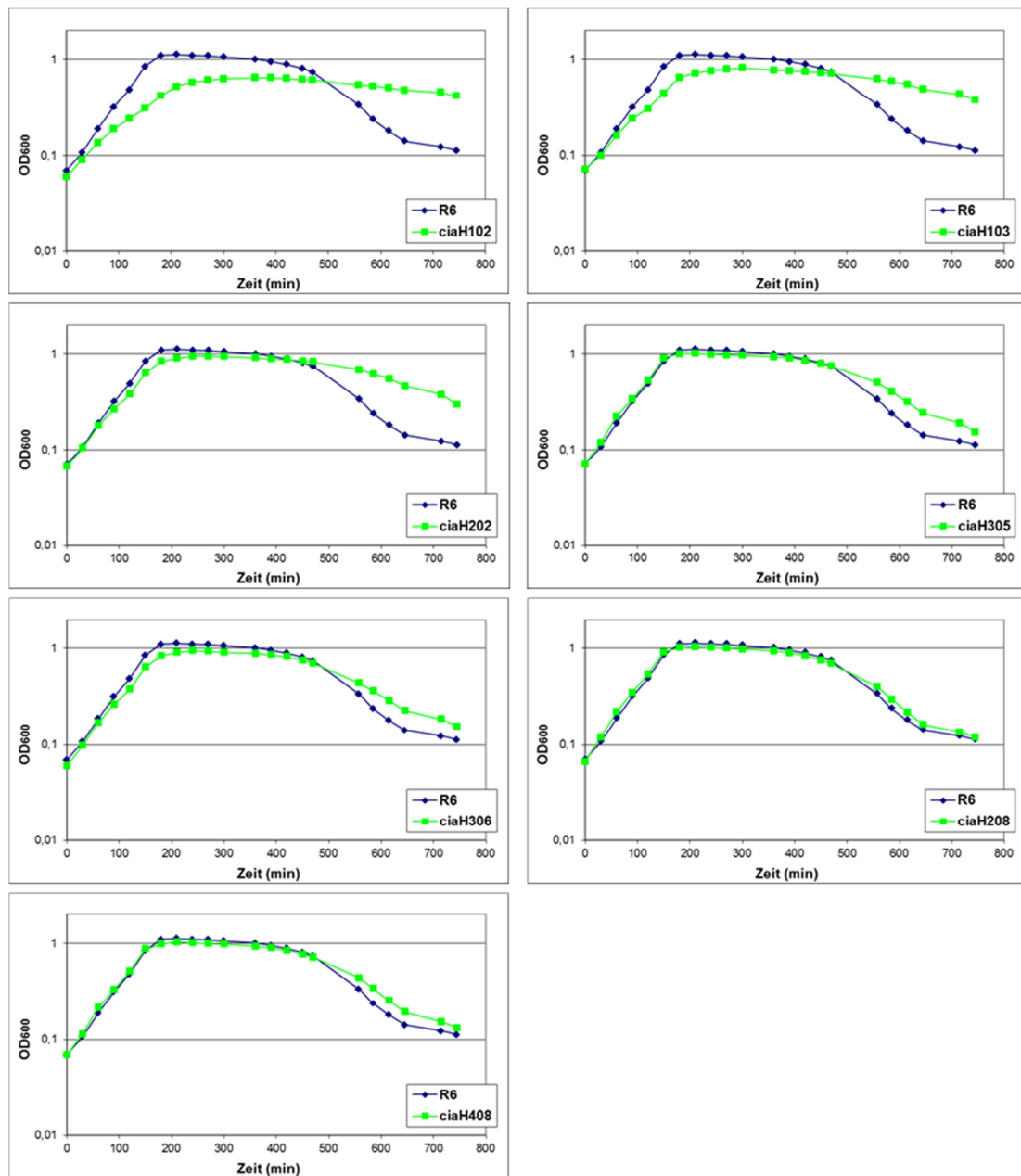
**Abb. 4.2: Untersuchung der Resistenz von *S. pneumoniae* R6 sowie von seinen Derivaten mit veränderten *ciaH*-Allelen gegen die Lactamantibiotika Cefotaxim (A) und Oxacillin (B).** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Tropfentests für die verschiedenen Stämme mit unterschiedlichen *ciaH*-Allelen (von oben nach unten: R6, RKL167, RKL166, RKL162, RKL164, RKL163, RKL168, RKL165) bei von links nach rechts ansteigenden Antibiotikakonzentrationen. Die Bereiche der D-Blutagarplatten, auf denen ein Bakterienwachstum stattgefunden hat, sind durch die  $\alpha$ -Hämolyse der Bakterien grün verfärbt. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen bei 37°C in C+Y-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 inkubiert.

#### 4.1.4 Der Einfluss der *ciaH*-Allele auf das Wachstums- und Lyseverhalten

Veränderungen in der Aktivität des TCS CiaRH wurden in der Vergangenheit schon mehrfach sowohl mit natürlicher, als auch mit induzierter Autolyse in Verbindung gebracht (Mascher *et al.*, 2006a, Giammarinaro *et al.*, 1999). In Zuge dieser Arbeit wurde daher das Wachstums- und Lyseverhalten der Stämme mit mutierten *ciaH*-Allelen untersucht.

Wie in Abb. 4.3 und Tab. 4.3 zu sehen ist, sind die *ciaH*-Mutanten teilweise deutlich in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit beeinträchtigt. Insbesondere die Stämme mit den Allelen *ciaH*102 und *ciaH*103 zeigen mit einer Generationszeit von 68 bzw. 56 min ein langsames Wachstum als *S. pneumoniae* R6 mit 40 min. Auch erreichen diese beiden Stämme nur eine deutlich geringere Zelldichte in der Stationärphase als der Wildtyp (Abb. 4.3). Alle untersuchten *ciaH*-Allele führen zu einer, wenn auch teilweise nur geringfügig verzögerten Lyse. Hier ist es neben den *ciaH*-Allelen *ciaH*102 und *ciaH*103 auch das Allel *ciaH*202 das

einen deutlichen Lysephänotyp mit einer kaum feststellbaren Autolyse zeigt. Bei den Allelen *ciaH305* und *ciaH306* ist eine verzögerte Autolyse festzustellen, während sie bei den Allelen *ciaH208* und *ciaH408* nur noch marginal zu erahnen ist. Insgesamt korrelieren die Ausprägungen des Wachstums- und Lysephänotyps schlechter mit den zuvor ermittelten Genaktivierungsstärken als etwa die Resistenz.



**Abb. 4.3: Wachstums- und Lyseverhalten der Stämme mit verändertem *ciaH*-Allel im Vergleich zum Wildtyp R6.** Die Stämme mit den *ciaH*-Allelen *ciaH102* (RKL185), *ciaH103* (RKL182), *ciaH202* (RKL170), *ciaH208* (RKL176), *ciaH305* (RKL173), *ciaH306* (RKL188), *ciaH408* (RKL179) und der Wildtyp R6 wurden bei 37°C in C+Y-Medium inkubiert. Um den Wachstumsverlauf zu verfolgen, wurde in regelmäßigen Abständen die OD<sub>600</sub> photometrisch ermittelt.

**Tab. 4.3: Wachstumsgeschwindigkeit von *S. pneumoniae* R6 in Abhängigkeit von *ciaH*.**

Stamm <sup>a</sup>	<i>ciaH</i> -Allel	Generationszeit <sup>b</sup> (min)
R6	<i>ciaH</i> -wt	40
RKL167	<i>ciaH</i> 102	68
RKL166	<i>ciaH</i> 103	56
RKL162	<i>ciaH</i> 202	46
RKL164	<i>ciaH</i> 208	41
RKL163	<i>ciaH</i> 305	41
RKL168	<i>ciaH</i> 306	45
RKL165	<i>ciaH</i> 408	41

<sup>a</sup> Die Stämme wurden bei 37°C in C-Medium inkubiert.

<sup>b</sup> Die Generationszeit wurde rechnerisch aus den Wachstumskurven aus Abb. 4.3 ermittelt.

#### 4.1.5 Der Einfluss der *ciaH*-Allele auf die Kompetenz

Die Kompetenz ist ein für die klinische Relevanz von pathogenen *S. pneumoniae*-Stämmen nicht ganz unbedeutender Phänotyp. Zum Einen, da sich Antibiotikaresistenzen über horizontalen Gentransfer verbreiten können (Dowson *et al.*, 1989; Claverys *et al.*, 2000), zum Anderen, da die Kompetenz direkt zur Virulenz der Bakterien beiträgt (Bartilson *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Guiral *et al.*, 2005; Kowalko und Sebert, 2008). Bei den meisten Mutantenfamilien, die im Laufe ihrer Selektion Punktmutationen in *ciaH* entwickelt haben, sind späte Stufen als nicht mehr transformierbar beschrieben (Guenzi *et al.*, 1994). Einflüsse des TCS CiaRH auf die Kompetenz wurden schon bei seiner Entdeckung beobachtet. In dieser Arbeit wurden die verschiedenen *ciaH*-Allele auf ihren isolierten Einfluss auf die Transformierbarkeit hin untersucht.

Wie in Kap. 4.1.1 ausführlich beschrieben, zeigte sich im Laufe der Untersuchungen, dass in Stämmen mit aktiviertem CiaRH-System häufig unerwünschte Zusatzmutationen in *ciaR* oder *ciaH* auftraten, die die Aktivität des Systems wieder reduzierten. Diese wurden besonders häufig nach Transformationen gepickt. Daher wurde zur Herstellung von „kompetenten“ Zellen mit den gewünschten, aktivierenden *ciaH*-Allelen die Kultur von Antibiotika-Platten angeimpft, um durch ein Wachstum über möglichst wenige Generationen ein Akkumulieren der Pseudorevertanten durch Wachstumsvorteile zu reduzieren.

Aufgrund der besonderen Konstruktion der Stämme, durch Einbringen der verschiedenen *ciaH*-Allele mit Hilfe der Janus-Kassette, konnte der standardmäßig verwendete Transformationsmarker Strep<sup>R</sup> (RKL242), der auf einer Streptomycinresistenz (Salles, 1992)

basiert, hier nicht benutzt werden. Alternativ wurde chromosomale DNA eines selbst konstruierten, Rifampin-resistenten Stammes (RKL222) zur Analyse der Transformierbarkeit verwendet. Dieser neue Transformationsmarker weist eine etwa 10fach geringere Transformationseffizienz auf, als der konventionelle Marker, wodurch sich die Detektionsgrenze der messbaren Kompetenz etwas ändert.

Die Untersuchung der Transformierbarkeit der Stämme mit aktiviertem CiaRH-System zeigte, dass nicht nur das bereits gut untersuchte Allel *ciaH306*, sondern auch die anderen Allele die Kompetenz stark inhibieren. Mit einer Ausnahme lag bei keinem der untersuchten Stämme mit den mutierten *ciaH*-Allelen die Transformationseffizienz im messbaren Bereich. Lediglich bei dem *S. pneumoniae*-Stamm mit dem Allel *ciaH305*, das die geringste Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität bewirkt, wurden in einigen Versuchen einige wenige Transformanten erhalten, was einer Transformationseffizienz von  $3,3 \cdot 10^{-5}$  % entspricht (vgl.  $R_6 = 0,05$  %). Somit scheint das CiaRH-System selbst bei verhältnismäßig geringen Aktivierungen die Kompetenz schon deutlich zu inhibieren.

## 4.2 Der Anteil von HtrA und den csRNAs an den CiaRH-vermittelten Phänotypen

Wie die bisherigen Untersuchungen gezeigt haben, sind einige zentrale Phänotypen von *S. pneumoniae* wie die Widerstandsfähigkeit gegen bestimmte Antibiotika, die Fähigkeit zur Aufnahme extrazellulärer DNA oder die Autolyse in bedeutendem Maß von dem Zweikomponentensystem CiaRH abhängig. Wie genau CiaRH diese Phänotypen beeinflusst ist noch weitestgehend unbekannt. Bislang kennt man 30 Gene, deren Expression direkt von CiaR abhängt (Halfmann *et al.*, 2007b). Kompetenzgene oder andere Gene, die man direkt mit den besagten Phänotypen in Verbindung bringen kann, finden sich nicht darunter.

Von den bekannten Genen des CiaR-Regulons gehören das Serinproteasegen *htrA* und die Gene der kleinen regulatorischen csRNAs (*ccnA-E*) zu den mit am stärksten kontrollierten und exprimierten Genen (Halfmann *et al.*, 2007b). Damit sind sie gute Kandidaten für intensivere weiterführende Untersuchungen bezüglich einer Beteiligung an den CiaRH-vermittelten Phänotypen. Für beide Gene bzw. Genklassen gibt es zudem erste Hinweise auf

einen Zusammenhang mit den CiaRH-verknüpften Phänotypen. So wurde für das Serinprotasegen *htrA* ein möglicher Einfluss auf die Kompetenz beschrieben (Ibrahim *et al.*, 2004b, Sebert *et al.*, 2005), sowie eine Beteiligung der kleinen regulatorischen csRNAs an dem Kompetenz- und Lysephänotyp (Tsui *et al.*, 2010, Halfmann *et al.*, 2007b). Die bisherigen Erkenntnisse sind jedoch bislang nur rudimentär oder ergeben ein widersprüchliches Bild. Die Bedeutung von *htrA* und *ccnA-E* für die CiaRH-vermittelten Phänotypen wurden daher im Zuge dieser Arbeit detaillierter analysiert.

#### 4.2.1 Der Einfluss von *htrA* und *ccnA-E* auf die Kompetenz

Die Kompetenzuntersuchungen dieser Arbeit wurden in drei verschiedenen Medien durchgeführt: Dem kompetenz-nicht-inhibierenden C+Y-Medium und den kompetenzinhibierenden Medien brain heart infusion (BHI) und Todd Hewitt broth (THB). Da es sich bei der Kompetenz um einen komplex regulierten und durch die Medienzusammensetzung stark beeinflussten Zustand von *S. pneumoniae* handelt (Claverys und Håvarstein, 2002), kann eine in unterschiedlichen Medien variierende Regulation durch CiaR nicht ausgeschlossen werden.

Sowohl für *htrA*, als auch für die csRNAs gibt es bereits Hinweise auf eine Beteiligung an der CiaRH-vermittelten Kompetenzregulation. Der Einfluss von *htrA* wurde allerdings in einigen Veröffentlichungen als kompetenzinhibierend (Sebert *et al.*, 2005), in anderen als -aktivierend (Ibrahim *et al.*, 2004b, Dagkessamanskaia *et al.*, 2004) beschrieben und ist somit noch ungeklärt. Für die csRNAs wurde bei einer *in silico*-Suche das Kompetenzgen *comC* als mögliches Target identifiziert. Eine *in vitro*-Bindung der csRNAs an die mRNA von *comC* konnte auch schon nachgewiesen werden (Kovács, 2009), ebenso wie der kompetenzinhibitorische Effekt einer *ccnA*-Kopie unter der Kontrolle eines fremden Promotors in *S. pneumoniae* D39 (Tsui *et al.*, 2010). Um die Bedeutung von *htrA* und *ccnA-E* für die Kompetenz zu klären, wurden Deletionskonstrukte in den *S. pneumoniae* Wildtyp-Stamm R6 eingebracht, ebenso wie in Stämme mit aktivierenden *ciaH*-Allelen (*ciaH306*, *ciaH202*) und anschließend phänotypische Veränderungen analysiert. Bei dem verwendeten *htrA*-Deletionskonstrukt (*htrA::aphIII*) wurde die codierende Sequenz von *htrA* größtenteils durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Da die Sequenzen der fünf csRNAs eine starke Ähnlichkeit untereinander aufweisen, was auf eine möglicherweise redundante

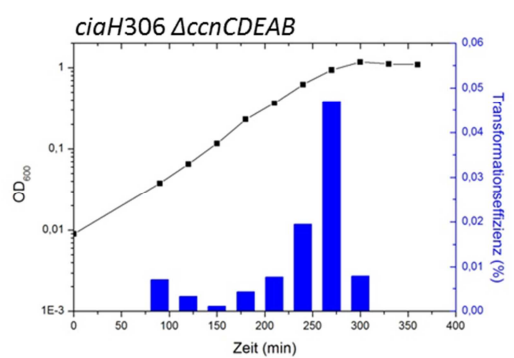
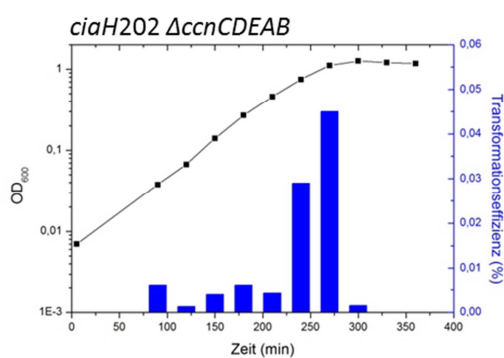
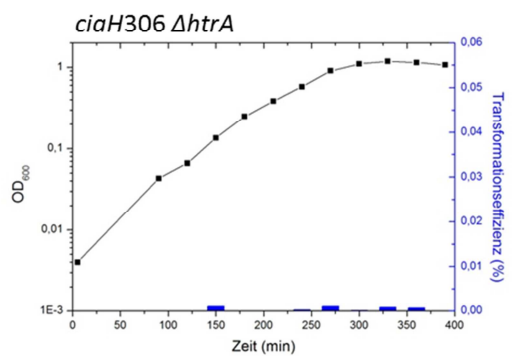
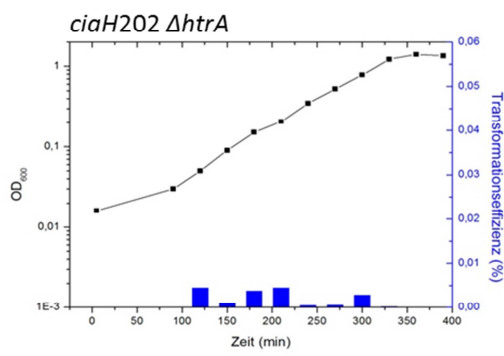
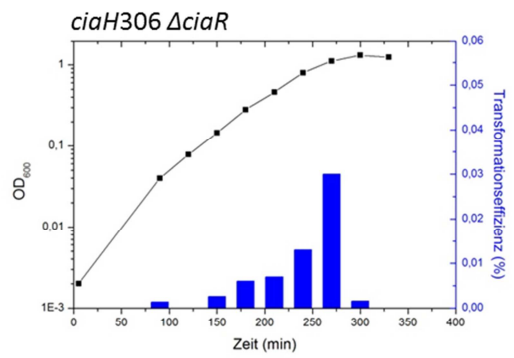
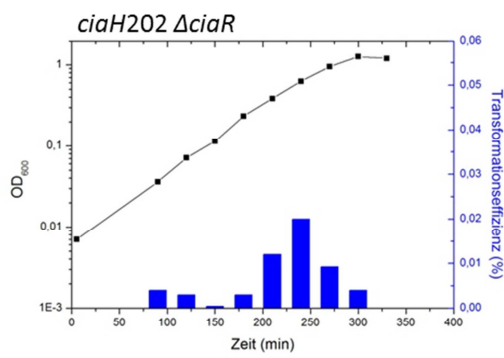
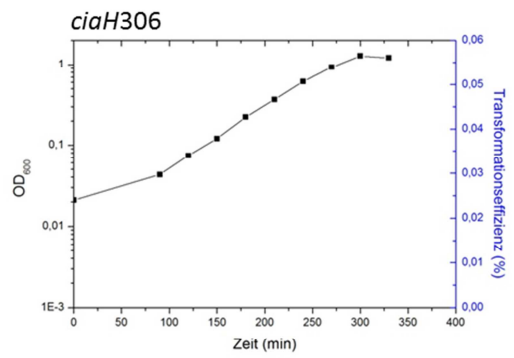
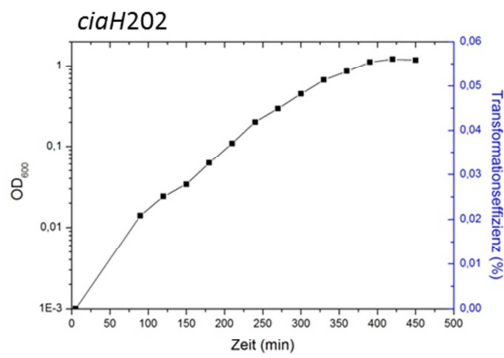
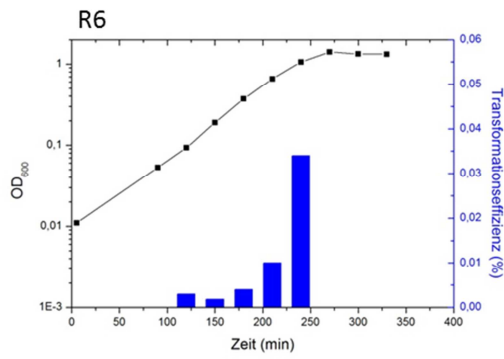
Funktionsweise hindeutet, wurde für ihre phänotypische Untersuchung eine fünfmal-Deletion verwendet (*AccnCDEAB*). Diese wurde mit Hilfe der Cheshire-Kassette (Weng *et al.*, 2009) hergestellt und trägt somit keine Resistenzkassetten.

Zur Untersuchung der Kompetenz wurde die Transformationseffizienz in regelmäßigen zeitlichen Abständen während des Wachstums ermittelt. Um die Kompetenzentwicklung verfolgen zu können, wurde mit nicht-kompetenten Zellen angeimpft (Kap. 3.2.2.3).

#### 4.2.1.1 Untersuchungen der Kompetenz in C+Y-Medium

In kompetenz-nicht-inhibierenden Medien wie dem C+Y-Medium führt eine Aktivierung des CiaRH-Systems zu einem Kompetenzblock (Guenzi *et al.*, 1994), während zwischen dem Wildtyp R6 und der *ciaR*-Deletionsmutante kein Kompetenzunterschied zu sehen ist (Giammarinaro *et al.*, 1999). Um die Bedeutung von *htrA* und *ccnA-E* für diese Unterdrückung der Kompetenz zu untersuchen wurden daher die Deletionskonstrukte in Stämme mit den aktivierenden *ciaH*-Allelen *ciaH202* und *ciaH306* eingebracht. Die Auswahl dieser beiden Allele begründet sich auf der für *ciaH202* erfahrungsgemäß festgestellten recht guten Stabilität des Mutationsprofils von *ciaH* (Kap. 4.1.1) bei gleichzeitig starker Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität (Tab. 4.2) und für *ciaH306* auf dessen Bedeutung in der Literatur. Da die hier untersuchten Stämme mit aktivierendem *ciaH*-Allel mit Hilfe der Janus-Kassette hergestellt wurden und so bereits das Streptomycin-Resistenzallel *rpsL41* im Genom tragen, musste auf den Standard-Transformationsmarker *Strep<sup>R</sup>* verzichtet und der neue Transformationsmarker RKL222 verwendet werden.





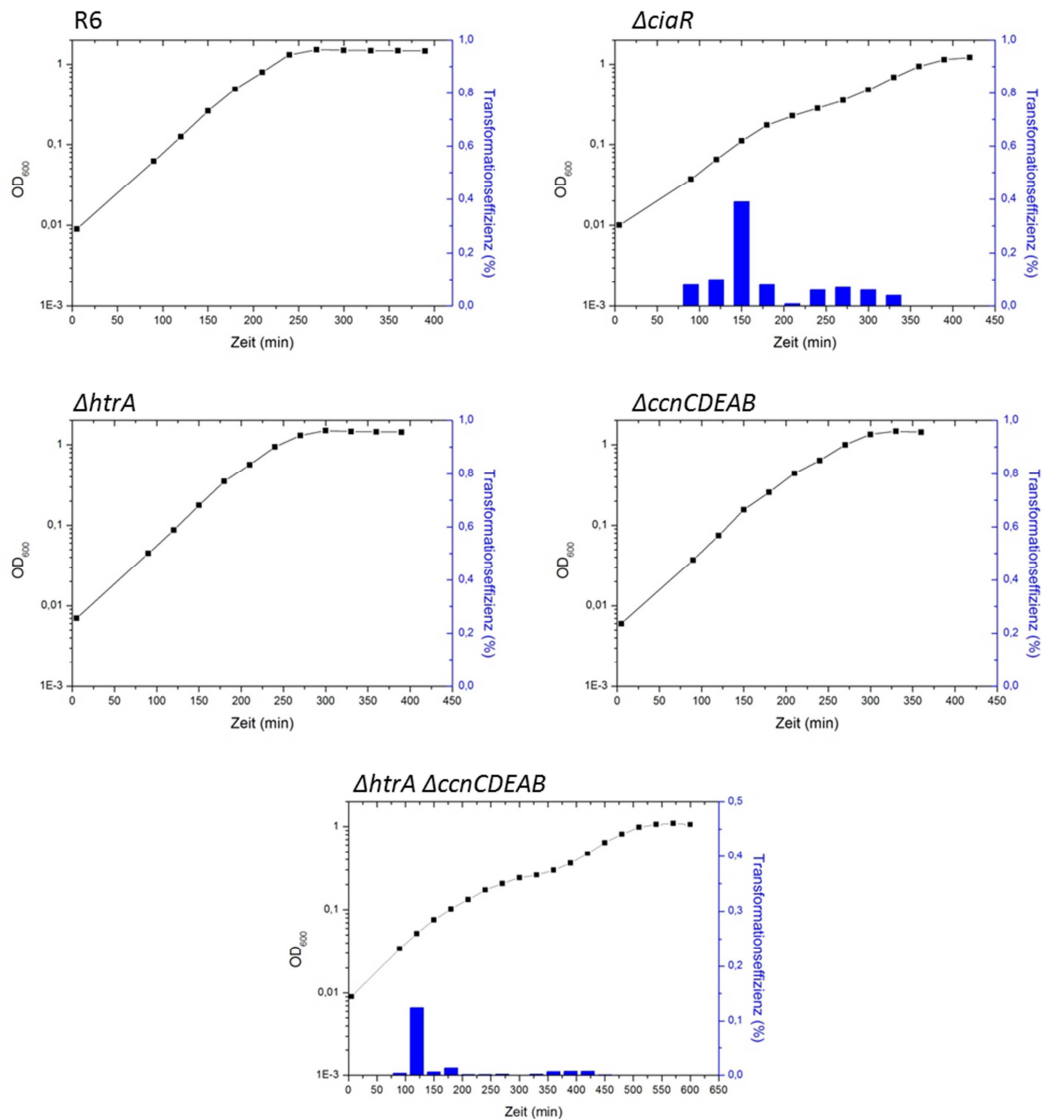
**Abb. 4.4: Einfluss von *htrA* und *ccnCDEAB* auf den CiaRH-regulierten Kompetenzverlauf während des Wachstums in C+Y-Medium.** Von den *S. pneumoniae*-Stämmen R6, RKL162 (*ciaH202*), RKL168 (*ciaH306*), RKL191 (*ciaH202 ΔciaR*), RKL353 (*ciaH306 ΔciaR*), RKL192 (*ciaH202 ΔhtrA*), RKL348 (*ciaH306 ΔhtrA*), RKL341 (*ciaH202 ΔccnCDEAB*) und RKL349 (*ciaH306 ΔccnCDEAB*) wurde die Kompetenzentwicklung in C+Y-Medium untersucht. Zum Starten des Experiments wurde C+Y-Medium 1%ig mit einer Glycerinkultur aus C+Y-Medium pH 6,8 beimpft. Proben wurden 90 min nach dem Animpfen im Abstand von 30 min bis zur Stationärphase geerntet und die Transformationseffizienz mit Hilfe des Transformationsmarkers RKL222 bestimmt. Die Transformationseffizienz (blaue Balken) ist der prozentuale Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl. Zum Verfolgen des Wachstums (schwarze Kurve) wurde die optische Dichte bei 600 nm photometrisch bestimmt. Für jedes Experiment wurden mindestens zwei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildung je ein repräsentatives Beispiel zeigt.

Im Wildtyp R6 sieht man einen Anstieg der Transformierbarkeit im Laufe des Wachstums bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 4.4). Dort kommt es zu einem schnellen Abfall der Transformationseffizienz und zum Verlust der Kompetenz bei Beginn der Stationärphase. Bei den Stämmen mit den *ciaH*-Allelen *ciaH202* und *ciaH306* führt die Aktivierung des CiaR-Regulons wie erwartet zur vollständigen Unterdrückung der Kompetenz. Dass dieser Phänotyp von CiaR abhängig ist sieht man an der Wiederherstellung der Kompetenz bei Deletion von *ciaR*. Nahezu den selben Effekt beobachtet man beim Fehlen der fünf csRNAs in den Stämmen mit aktivierenden *ciaH*-Allelen (*ciaH202 ΔccnCDEAB*, *ciaH306 ΔccnCDEAB*). Hier kommt es zur Wiederherstellung der Transformierbarkeit auf ein Effizienzniveau, das dem des *ciaR*-Deletionsstammes und des Wildtyps entspricht oder sogar etwas darüber hinausgeht. Obwohl die Expression der anderen Gene des CiaR-Regulons nach wie vor aktiviert wird, reicht das Fehlen der csRNAs aus, um den Kompetenzblock aufzuheben. Die Deletion von *htrA* dagegen zeigt einen schwächeren Effekt. Zwar befindet sich das Kompetenzniveau der Stämme mit aktivierendem *ciaH*-Allel durch die Deletion von *htrA* wieder im messbaren Bereich, allerdings liegt die Transformierbarkeit, insbesondere in Kombination mit dem *ciaH306*-Allel, deutlich unter dem Niveau des *ciaR*-Deletionsstammes oder des Wildtyps.

#### 4.2.1.2 Untersuchungen der Kompetenz in brain heart infusion (BHI)

BHI ist ein Medium in dem *S. pneumoniae* keine natürliche Kompetenz entwickelt. Im Gegensatz dazu zeigt ein *ciaR*-Deletionsstamm Kompetenzentwicklung unter diesen wie auch unter anderen medienabhängigen kompetenzinhibierenden Bedingungen (Tsui *et al.*, 2010).

Um in BHI den Einfluss von *htrA* und *ccnA-E* auf die Kompetenzregulation durch CiaRH zu untersuchen, wurden die *htrA*- und *ccnA-E*-Deletionskonstrukte in den Wildtyp R6 eingebracht. Da in dieser Versuchsreihe kein Stamm mit aktivierendem *ciaH*-Allel untersucht wurde, konnte als Transformationsmarker der Standard-Marker Strep<sup>R</sup> verwendet werden.



**Abb. 4.5: Einfluss von *htrA* und *ccnCDEAB* auf den CiaRH-regulierten Kompetenzverlauf während des Wachstums in BHI.** Von den *S. pneumoniae* Stämmen R6, R6 *ciaR::aad9* ( $\Delta$ *ciaR*), R6 *htrA::aphIII* ( $\Delta$ *htrA*), RKL229 ( $\Delta$ *ccnCDEAB*) und RKL362 ( $\Delta$ *htrA*  $\Delta$ *ccnCDEAB*) wurde die Kompetenzentwicklung in BHI untersucht. Zum Starten des Experiments wurde BHI 1%ig mit einer Glycerinkultur aus BHI pH 6,8 beimpft. Proben wurden 90 min nach dem Animpfen im Abstand von 30 min bis zur Stationärphase geerntet und die Transformationseffizienz mit Hilfe des Transformationsmarkers Strep<sup>R</sup> bestimmt. Die Transformationseffizienz (blaue Balken) ist der prozentuale Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl. Man beachte, dass zur deutlicheren Darstellung der Werte des Stamms RKL362 die Skala der Transformationseffizienz-Achse von denen der anderen Diagramme abweicht. Zum Verfolgen des Wachstums (schwarze Kurve) wurde die optische Dichte bei 600 nm photometrisch bestimmt. Für jedes Experiment wurden mindestens zwei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildung je ein repräsentatives Beispiel zeigt.

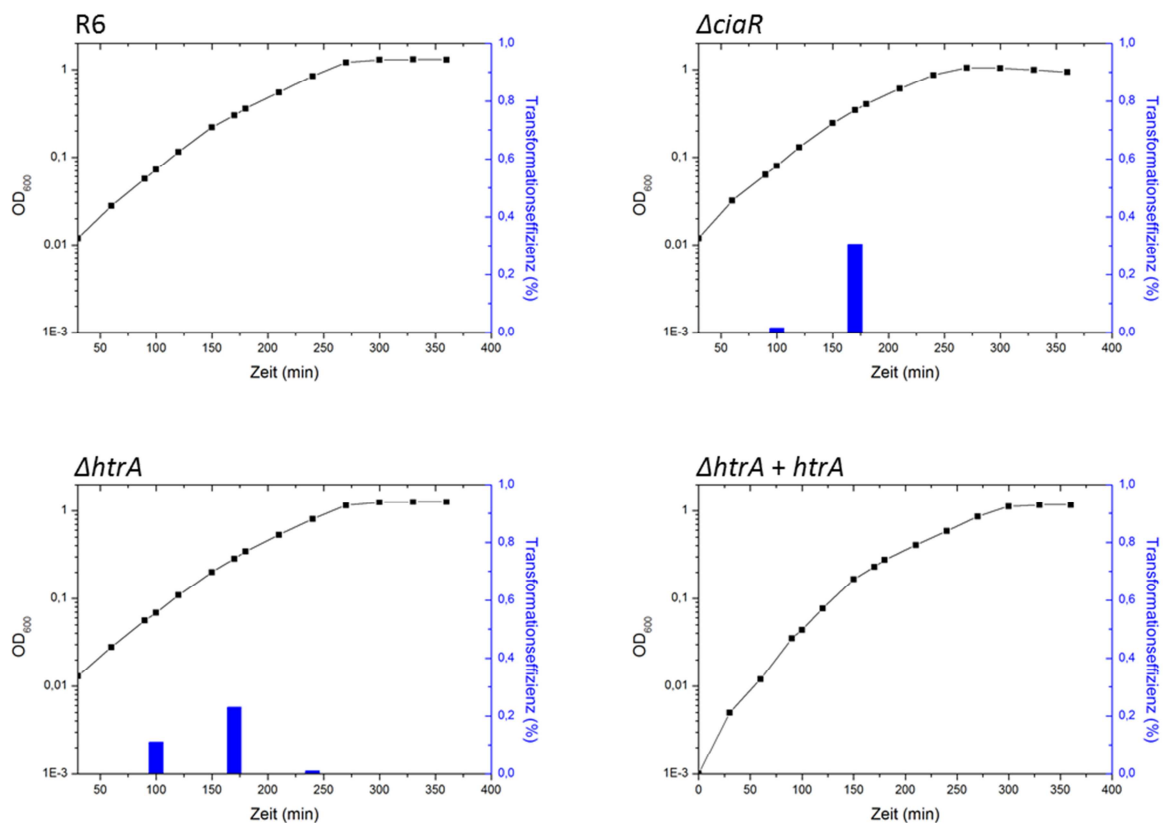
Die Kompetenzentwicklung des *ciaR*-Deletionsstammes R6 *ciaR::aad9* zeigt ein Maximum im frühen Bereich der exponentiellen Wachstumsphase und eine relativ gleichbleibende Transformationseffizienz über das restliche Wachstum (Abb. 4.5). Zu Beginn der Stationärphase kommt es zum Abschalten der Kompetenz. Im Gegensatz zur Inaktivierung des gesamten CiaR-Regulons, führte die Deletion von *htrA* oder *ccnA-E* nicht zur Kompetenzentwicklung in BHI. Lediglich in einzelnen Versuchsdurchgängen zeigte sich eine äußerst geringfügige Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* beim Fehlen von *htrA* oder *ccnA-E*. Erst die kombinierte Deletion von *htrA* und *ccnA-E* führte zu einer reproduzierbaren Kompetenzentwicklung. Erwähnenswert ist das deutliche verlangsamte und inhomogene Wachstum des Stammes mit gemeinsam deletiertem *htrA* und *ccnA-E*. Dieses leicht biphasische Wachstumsdefizit tritt auch in etwas geringerem Maße bei R6 *ciaR::aad9* auf und wurde auch schon für einen *ciaR*-Deletionsstamm von *S. pneumoniae* D39 in BHI beschrieben (Tsui *et al.*, 2010).

#### 4.2.1.3 Untersuchungen der Kompetenz in Todd Hewitt broth (THB)

Wie BHI ist THB ein kompetenzinhibierendes Medium dessen Kompetenzblock durch ein Fehlen von *ciaR* aufgehoben werden kann (Mascher *et al.*, 2003). Dies konnte auch bei den Versuchen in dieser Arbeit gezeigt werden. Wie bei BHI kommt es auch hier bei dem Stamm R6 *ciaR::aad9* zu einer Kompetenzentwicklung im Laufe des Wachstums und zu einem Verlust der Transformierbarkeit zu Beginn der Stationärphase (Abb. 4.6). Die Transformationsversuche zeigen, dass in diesem Medium jedoch auch schon die Deletion von *htrA* ausreicht um die Unterdrückung der Kompetenz aufzuheben. Die Deletion von *htrA* führte zu einer ähnlich guten Transformierbarkeit wie die Deletion von *ciaR*, d. h. wie die Inaktivierung des gesamten Regulons.

Bei *htrA* handelt es sich um das erste Gen des *htrA/parB*-Operons. In der Vergangenheit zeigte sich, dass unterschiedliche *htrA*-Deletionskonstruktionen zu nachweislich variierenden phänotypischen Effekten führen können, die möglicherweise durch polare Effekte der Konstruktionen auf *parB* oder andere benachbarte Loci verursacht wurden (Sebert *et al.*, 2005). Zudem wurde *parB* selbst, ein Gen dessen Homologe in anderen Species bei der Chromosomensegregation eine Rolle spielen (Yamaichi und Niki, 2000; Leonard *et al.*, 2005), in *S. mutans* mit Kompetenz in Verbindung gebracht (Ahn *et al.*, 2005). Um

ausschließen zu können, dass der hier beobachtete Kompetenzphänotyp auf die Konstruktion und nicht auf das Fehlen von *htrA* zurückgeht, wurde ein *htrA*-Komplementationskonstrukt (*bgaA::tetM-P<sub>htrA</sub>-htrA*) in den Stamm R6 *htrA::aphIII* eingebracht. Bei diesem Komplementationskonstrukt handelt es sich um eine *htrA*-Kopie mit eigenem Promotorbereich, die an eine vom originalen *htrA* unabhängige Region ins Genom integriert. Die HtrA-Menge des daraus resultierenden Stammes R6 *htrA::aphIII P<sub>htrA</sub>-htrA* wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht und zeigte eine vergleichbare Menge an HtrA wie der Wildtyp R6 (Abb. 4.13). Transformationstests dieses Stammes zeigten keine messbare Kompetenzentwicklung mehr, was bedeutet, dass das Einbringen von *htrA* in den *htrA*-Deletionsstamm den Phänotyp des Wildtyps wiederherstellt.



**Abb. 4.6: Einfluss von *htrA* auf den CiaRH-regulierten Kompetenzverlauf während des Wachstums in THB.** Von den *S. pneumoniae* Stämmen R6, R6 *ciaR::aad9* ( $\Delta$ *ciaR*), R6 *htrA::aphIII* ( $\Delta$ *htrA*) und R6 *htrA::aphIII P<sub>htrA</sub>-htrA* ( $\Delta$ *htrA* + *htrA*) wurde die Kompetenzentwicklung in THB untersucht. Zum Starten des Experiments wurde THB 1%ig mit einer THB-Glycerinkultur beimpft. Proben wurden im Abstand von 100, 170, 240 und 300 min nach dem Animpfen geerntet und die Transformationseffizienz mit Hilfe des Transformationsmarkers Strep<sup>R</sup> bestimmt. Die Transformationseffizienz (blaue Balken) ist der prozentuale Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl. Zum Verfolgen des Wachstums (schwarze Kurve) wurde die optische Dichte bei 600 nm photometrisch bestimmt. Für jedes Experiment wurden mindestens zwei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildung je ein repräsentatives Beispiel zeigt.

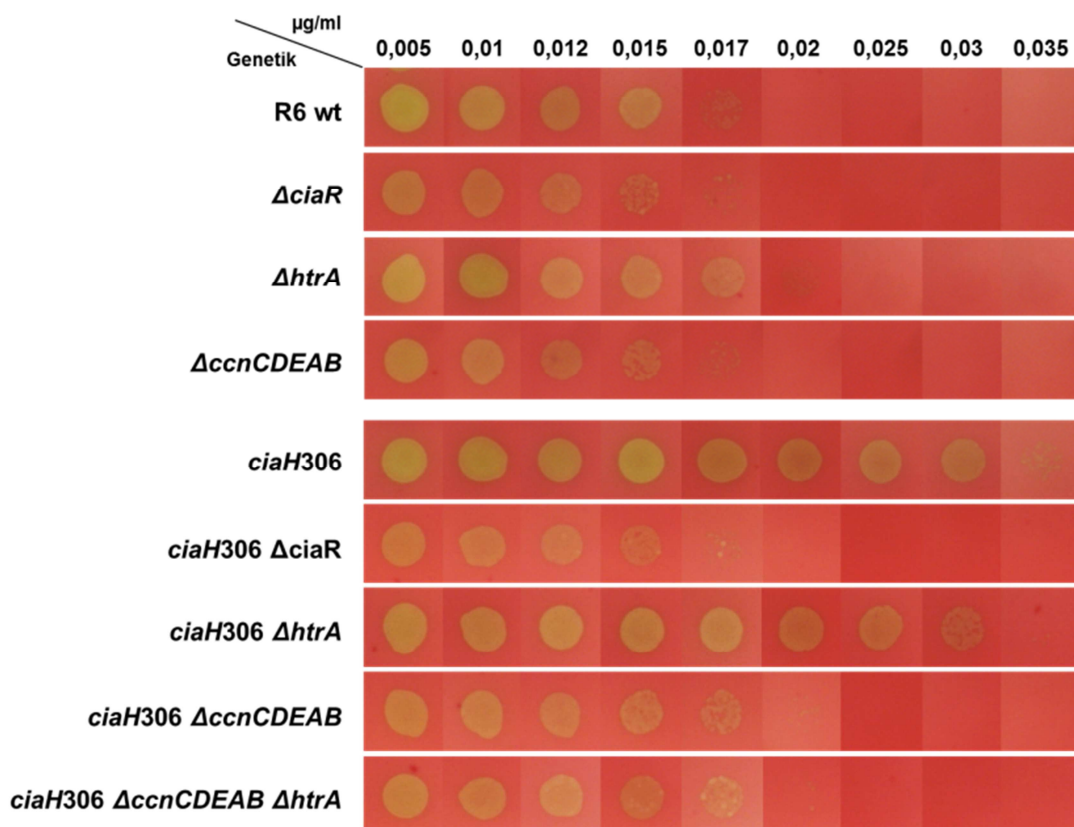
Bei THB handelt es sich um ein Fertigmedium, das für die hier durchgeführten Versuche als Pulver vom Hersteller bezogen wurde. Im Laufe dieser Arbeit wurde eine Charge des Mediums verbraucht. Trotz häufiger und zeitaufwendiger Versuche lieferte die neue Charge keine vernünftigen Wachstums- und Kompetenzergebnisse mehr, sodass auf eine Untersuchung des Effekts von *ccnA-E* auf den Kompetenzphänotyp in diesem Medium verzichtet werden musste. Auch bezüglich der Versuchsdurchführung gab es daher geringfügige Veränderungen. So wurden hier, im Gegensatz zu den vorangegangenen Kompetenztests, mit THB-Glycerinkulturen des gleichen pHs angeimpft und nur zu vier über das Wachstum verteilten Zeitpunkten (100, 170, 240 und 300 min nach Inokulation) die Kompetenz untersucht.

#### **4.2.2 Der Einfluss von *htrA* und *ccnA-E* auf die CiaRH-vermittelte Resistenz**

Da in *S. pneumoniae* für *htrA* und *ccnA-E* noch keine Daten bezüglich einer Beteiligung an der Resistenz gegen Antibiotika vorliegen, wurden sie im Zuge dieser Arbeit dahingehend untersucht. Für die Resistenztests wurden zwei  $\beta$ -Lactamantibiotika ausgewählt, Cefotaxim und Oxacillin, da bei diesen in den vorausgegangenen Versuchen ein deutlicher Unterschied zwischen dem Wildtyp und Stämmen mit aktivierendem *ciaH*-Allel zu erkennen war (Kap. 4.1.3). Zur Untersuchung der Resistenz wurde erneut der Tropfentest durchgeführt, um die MHK näherungsweise zu bestimmen.

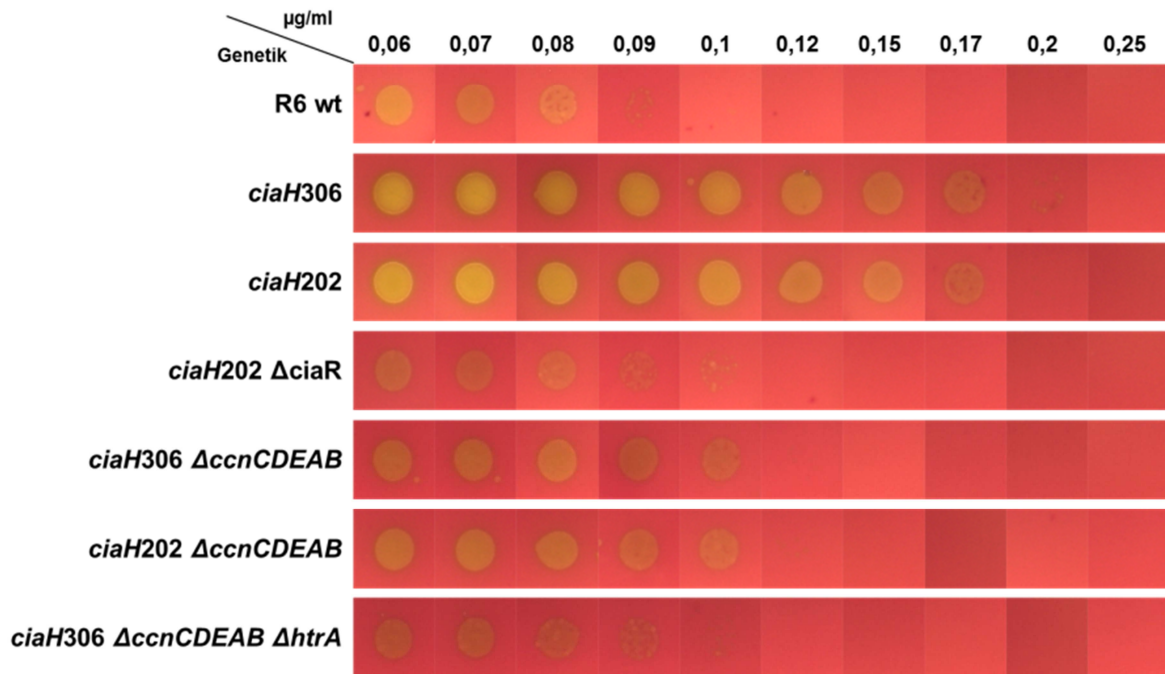
Bezüglich der  $\beta$ -Lactamresistenz sind sich Wildtyp und *ciaR*-Deletionsmutante  $\Delta$ *ciaR* (mit *ciaR*-Minigen) phänotypisch sehr ähnlich. Lediglich bei sehr kleinen Abständen in der Antibiotikakonzentration des Tropfentests kann eine etwas geringere Widerstandsfähigkeit des  $\Delta$ *ciaR*-Stammes beobachtet werden. Entsprechend führt auch das Fehlen von HtrA oder den csRNAs im Wildtyp nicht zu einer deutlichen Reduktion der Cefotaximresistenz (Abb. 4.7). Im Gegenteil scheint das Fehlen von HtrA die  $\beta$ -Lactamresistenz sogar leicht zu erhöhen. Der Stamm ohne csRNAs scheint sich bezüglich der Cefotaximresistenz ähnlich wie der  $\Delta$ *ciaR*-Stamm zu verhalten. Die Interpretation von so geringen Resistenzunterschieden stellt sich jedoch als schwierig dar. Da sich die Resistenz von Stämmen mit aktiviertem CiaRH-System deutlicher von der des Wildtyps unterscheiden lässt, wurden die Resistenzeinflüsse von *htrA*- und *ccnA-E*-Deletionen auch in diesen genetischen

Hintergründen untersucht. Es zeigte sich, dass beim Fehlen der csRNAs im Stamm R6 *ciaH306* der durch das aktivierte CiaRH-System hervorgerufene Cefotaximresistenzanstieg nahezu verschwindet, während das Fehlen von HtrA hier keinen sichtbaren Effekt hat (Abb. 4.7). Der starke Resistenzabfall gegen Oxacillin bei Deletion von *ccnA-E* in R6 *ciaH306* und R6 *ciaH202* bestätigt die Bedeutung der csRNAs für die CiaRH-vermittelte Resistenz (Abb. 4.8). Der Expressionsanstieg der csRNAs in den Stämmen mit aktivierendem *ciaH*-Allel scheint also maßgeblich an der gesteigerten  $\beta$ -Lactamresistenz beteiligt zu sein. Ein vollständiger Rückgang der Resistenz auf das Niveau des *ciaR*-Deletionsstammes wird durch das Fehlen der csRNAs jedoch nicht erreicht. Bei den Resistenztests gegen Oxacillin scheint die kombinierte Deletion von *htrA* und *ccnA-E* die Resistenz des aktivierten CiaRH-Systems auf *ciaR*-Niveau zu senken. Dies trifft jedoch nicht für die Resistenz gegen Cefotaxim zu und auch für sich betrachtet hat die Deletion von *htrA* alleine keinen sichtbaren Effekt auf die  $\beta$ -Lactamresistenz. Es scheint also noch weitere CiaR-abhängige Resistenzdeterminanten zu geben, die mit zum Resistenzphänotyp beitragen.



**Abb. 4.7:** Einfluss von *htrA* und *ccnA-E* auf die CiaRH-vermittelte Resistenz von *S. pneumoniae* R6 gegen Cefotaxim. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Tropfentests für die Stämme R6, R6  $\Delta$ *ciaR*, R6 *htrA::aphIII* ( $\Delta$ *htrA*), RKL229 ( $\Delta$ *ccnCDEAB*), RKL168 (*ciaH306*), RKL353 (*ciaH306*  $\Delta$ *ciaR*), RKL348 (*ciaH306*  $\Delta$ *htrA*), RKL349 (*ciaH306*  $\Delta$ *ccnCDEAB*) und RKL350 (*ciaH306*  $\Delta$ *ccnCDEAB*  $\Delta$ *htrA*) bei von links nach rechts ansteigenden Antibiotikakonzentrationen. Die Bereiche der D-Blutagarplatten, auf denen ein

Bakterienwachstum stattgefunden hat, sind durch die  $\alpha$ -Hämolyse der Bakterien grün verfärbt. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen bei 37°C in C+Y-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 inkubiert. wt = Wildtyp



**Abb. 4.8: Einfluss von *htrA* und *ccnA-E* auf die CiaRH-vermittelte Resistenz von *S. pneumoniae* R6 gegen Oxacillin.** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Tropfentests für die Stämme R6, RKL168 (*ciaH306*), RKL162 (*ciaH202*), RKL191 (*ciaH202 ΔciaR*), RKL349 (*ciaH306 ΔccnCDEAB*), RKL341 (*ciaH202 ΔccnCDEAB*) und RKL350 (*ciaH306 ΔccnCDEAB ΔhtrA*) bei von links nach rechts ansteigenden Antibiotikakonzentrationen. Die Bereiche der D-Blutagarplatten, auf denen ein Bakterienwachstum stattgefunden hat, sind durch die  $\alpha$ -Hämolyse der Bakterien grün verfärbt. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen bei 37°C in C+Y-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 inkubiert. wt = Wildtyp

#### 4.2.3 Der Einfluss von *htrA* und *ccnA-E* auf die CiaRH-vermittelte Autolyse

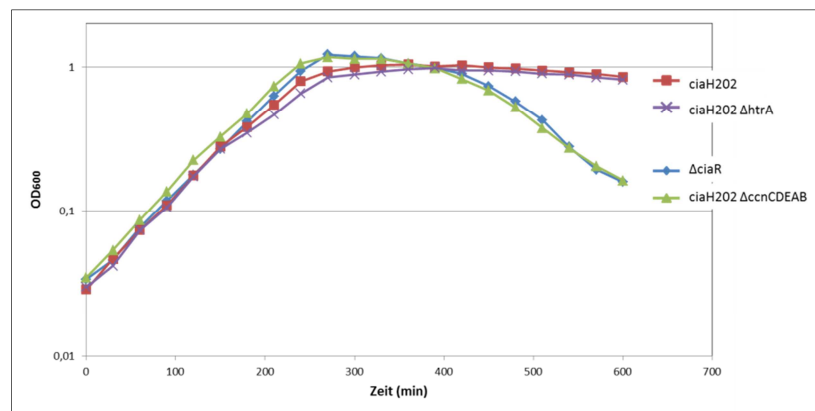
Wie die vorangegangenen Versuche gezeigt haben, wird die Kompetenz offensichtlich sowohl durch HtrA als auch durch die csRNAs beeinflusst, während bei der CiaRH-vermittelten Resistenz die csRNAs sowie weitere unbekannte Resistenzdeterminanten eine Rolle spielen. Bei der CiaRH-regulierten Autolyse in der Stationärphase gibt es bereits Hinweise auf eine Beteiligung von csRNA4 und csRNA5. Ihr Fehlen führt zu einer verfrühten Autolyse, was einen Zusammenhang mit dem Lysephänotyp einer *ciaR*-Deletionsmutante vermuten lässt (Halfmann *et al.*, 2007b). Ob die csRNAs auch an der verzögerten Lyse bei aktiviertem



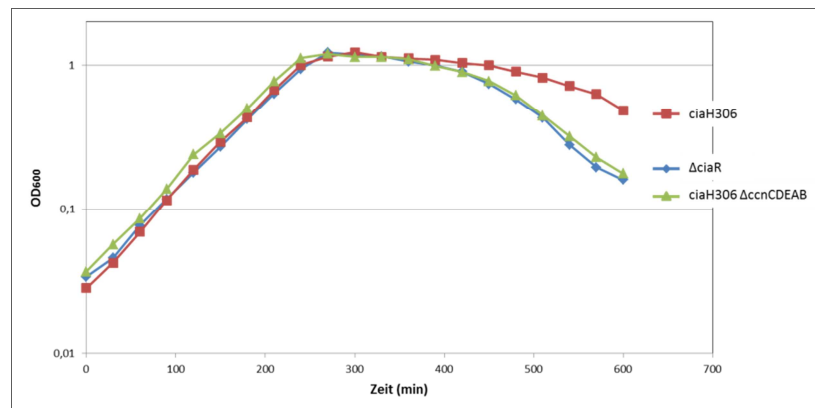
CiaRH-System beteiligt sind, ist allerdings bislang unklar und wurde daher im Zuge dieser Arbeit untersucht.

In den Stämmen mit aktiviertem CiaRH-System führte die Deletion aller fünf csRNAs zu einer deutlich verfrühten Autolyse (Abb. 4.9 A und B). Diese korreliert gut mit der Autolyse des *ciaR*-Deletionsstammes. Die Deletion von *htrA* dagegen beeinflusste das Wachstums- und Lyseverhalten der Stämme mit aktiviertem CiaRH-System nicht (Abb. 4.9 A). Der deutliche Effekt auf die Autolyse, den das Fehlen der csRNAs in Stämmen mit aktiviertem CiaRH-System verursacht, zeigt, dass sie für den CiaRH-vermittelten Lysephänotyp von großer Bedeutung sind.

A



B



**Abb. 4.9:** Einfluss von *htrA* bzw. *ccnA-E* auf die CiaRH-vermittelte Autolyse von Stämmen mit dem *ciaH*-Allel *ciaH202* (A) und *ciaH306* (B). Die Stämme R6  $\Delta$ *ciaR*, RKL162 (*ciaH202*), RKL168 (*ciaH306*), RKL192 (*ciaH202*  $\Delta$ *htrA*), RKL341 (*ciaH202*  $\Delta$ *ccnCDEAB*) und RKL349 (*ciaH306*  $\Delta$ *ccnCDEAB*) wurden bei 37°C in C+Y-Medium inkubiert. Zum Verfolgen des Wachstumsverlaufs wurde in regelmäßigen Abständen die OD<sub>600</sub> photometrisch ermittelt.

## 4.3 Der regulatorische Einfluss von HtrA auf die Aktivität von CiaRH

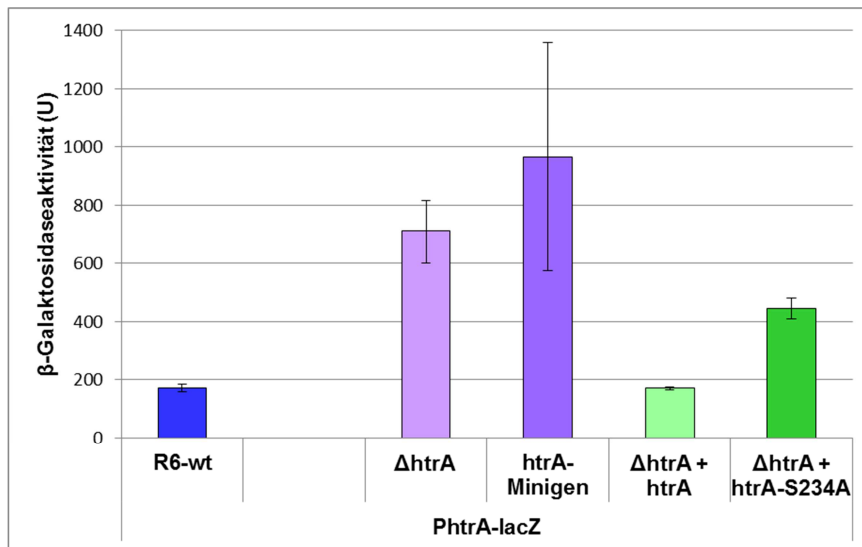
Bei früheren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass das CiaRH-System durch sublethale Konzentrationen von zellwandaktiven Antibiotika wie Penicillin oder Vancomycin bei *S. pneumoniae* aktiviert werden kann (Haas *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2007). Bislang geht man davon aus, dass das TCS CiaRH generell auf Zellwandstress reagiert (Hakenbeck *et al.*, 1999; Zähler *et al.*, 2002; Jordan *et al.*, 2008). Der genaue Mechanismus oder Stimulus ist trotz langjähriger Untersuchungen von CiaRH noch unbekannt.

Ein Gen des CiaR-Regulons, *htrA*, codiert für die extracytoplasmatisch lokalisierte Serinprotease HtrA (Sebert *et al.*, 2005). Ihr Homolog in *E. coli*, DegP, spielt bei der Stimulierung des Zweikomponentensystems CpxAR eine wichtige Rolle. *DegP* steht selbst unter der Kontrolle von CpxAR (Danese *et al.*, 1995; Price und Raivio, 2009), das, ähnlich wie für CiaRH postuliert, durch stressbedingte Veränderungen in der Zellhülle aktiviert wird (Jones *et al.*, 1997; Danese und Silhavy, 1998; Raivio und Silhavy, 2001). Für DegP ist bekannt, dass es gemeinsam mit dem Adaptorprotein CpxP die durch Proteinaggregation ausgelöste Aktivierung von CpxAR vermittelt und dass die Deletion von *degP* zu einer etwa 2-fach reduzierten Aktivität der CpxR-vermittelten Genregulation führt (Buelow und Raivio, 2005; Isaac *et al.*, 2005). Da es offensichtlich gewisse Ähnlichkeiten zwischen dem CiaRH- und dem CpxAR-System gibt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob HtrA in *S. pneumoniae* ebenfalls die Stimulierung und Aktivität des TCS CiaRH beeinflusst. Dazu wurde die CiaR-abhängige Genregulation in An- und Abwesenheit von HtrA untersucht.

### 4.3.1 Der Einfluss von HtrA auf die CiaR-abhängige Genregulation

Um Veränderungen in der CiaR-abhängigen Genregulation feststellen zu können, wurden *lacZ*-Fusionen der CiaR-abhängigen Promotoren  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  mit Hilfe des Pneumo-Promotor-Probes pPP2 in die zu untersuchenden Stämme, den Wildtyp *S. pneumoniae* R6 sowie den *htrA*-Deletionsstamm R6 *htrA::aphIII*, eingebracht. Diese beiden Promotoren wurden ausgewählt, da sie in der Vergangenheit eine gute Abhängigkeit von CiaR und dem Aktivierungsstatus des CiaRH-Systems zeigten (Halfmann *et al.*, 2007b). Als Kontrolle wurde

zudem das pPP2-Derivat mit dem CiaR-unabhängigen konstitutiven Promotor  $P_{vegM}$  verwendet. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten wurden bestimmt und miteinander verglichen.



**Abb. 4.10: Durch den Promotor  $P_{htrA}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 sowie der Stämme mit verschiedenen *htrA*-Deletions- und Komplementationskonstrukten.** Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ . Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Wildtyps R6 (RKL43) im Vergleich zu den Stämmen RKL 197 ( $\Delta htrA$ ), RKL271 (*htrA*-Minigen), RKL 356 ( $\Delta htrA + htrA$ ) und RKL 360 ( $\Delta htrA + htrA$ -S234A).

Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidaseassays sind in Abb. 4.10 und Tab. 4.4 zusammengefasst. In Abb. 4.10 ist dabei zur besseren Übersicht nur die Aktivität des Promotors  $P_{htrA}$  in den untersuchten Stämmen dargestellt. Die Untersuchungen zeigen, dass das Fehlen von HtrA tatsächlich zu einer veränderten CiaR-abhängigen Regulation von  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  führt. Überraschenderweise kam es jedoch nicht wie beim Fehlen von DegP in *E. coli* zu einer Reduktion der Aktivität des TCS, vielmehr stieg die Aktivität von  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  beim Fehlen von HtrA um etwa das 4-fache an. Da manchen *htrA*-Deletionskonstrukten in *S. pneumoniae* in der Vergangenheit polare Effekte auf die umliegenden Genbereiche nachgesagt wurden (Sebert *et al.*, 2005), wurde das Ergebnis zusätzlich mit einem anderen *htrA*-Deletionskonstrukt, einem *htrA*-Minigen, überprüft. Dieses zeigte einen vergleichbaren Effekt auf die Aktivität des CiaRH-Systems, wie die Insertionsdeletion *htrA::aphIII*, einen Anstieg der Promotoraktivität von  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  um etwa das 5- bis 6-fache. Eine Komplementation durch eine *htrA*-Kopie mit eigenem Promotor, die durch das Plasmid pKP01 ins Genom eingebracht wurde führte wieder zu einem Rückgang der  $P_{htrA}$ - und  $P_{spr0931}$ -

Aktivität auf Wildtyp-Niveau. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Anstieg der Promotoraktivität von  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  tatsächlich auf das Fehlen von HtrA zurückzuführen ist. Durch einen weiteren Komplementationsversuch konnte zudem gezeigt werden, dass der Effekt zumindest teilweise abhängig von der Proteaseaktivität von HtrA ist (Tab. 4.4, Abb. 4.10). Die Komplementation durch eine gerichtet mutierte *htrA*-Kopie, die zum Aminosäureaustausch des katalytisch aktiven Serins234 zu Alanin führt, konnte die  $P_{htrA}$ - und  $P_{spr0931}$ -Aktivität zwar etwas reduzieren, jedoch deutlich schwächer, als die Komplementation mit dem Wildtyp-Allel. Der Stamm mit proteolytisch defektem HtrA (HtrAS234A) zeigte noch eine etwa 2- bis 3-fach erhöhte CiaR-abhängige Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp oder der Wildtyp-*htrA*-Komplementation.

**Tab. 4.4: Durch die Promotoren  $P_{vegM}$ ,  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Wildtyps R6, sowie der Stämme mit verschiedenen *htrA*-Deletions- und Komplementationskonstrukten.**

Stamm <sup>a</sup>	Genetik	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	$\beta$ -Galaktosidaseaktivität <sup>b</sup> (U) $\pm$ Standardabweichung	Stamm/R6
RKL45	R6-wt	$P_{vegM}$	931 $\pm$ 145	
RKL43		$P_{htrA}$	170 $\pm$ 14	
RKL30		$P_{spr0931}$	177 $\pm$ 37	
RKL196	<i>htrA::aphIII</i>	$P_{vegM}$	1037 $\pm$ 32	1,1
RKL197		$P_{htrA}$	707 $\pm$ 109	4,2
RKL198		$P_{spr0931}$	653 $\pm$ 42	3,7
RKL270	<i>htrA</i> -Minigen	$P_{vegM}$	1200 $\pm$ 170	1,3
RKL271		$P_{htrA}$	964 $\pm$ 392	5,7
RKL272		$P_{spr0931}$	889 $\pm$ 250	5
RKL355	$\Delta htrA$ pKP01 (pSW1- <i>htrA</i> )	$P_{vegM}$	873 $\pm$ 64	0,9
RKL356		$P_{htrA}$	168 $\pm$ 6	1
RKL357		$P_{spr0931}$	164 $\pm$ 8	0,9
RKL359	$\Delta htrA$ pKP01- <i>htrA</i> <sub>S234A</sub>	$P_{vegM}$	918 $\pm$ 26	1
RKL360		$P_{htrA}$	443 $\pm$ 36	2,6
RKL361		$P_{spr0931}$	432 $\pm$ 28	2,4

<sup>a</sup> Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ .

<sup>b</sup> Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Bei den angegebenen Units (U) handelt es sich um die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Aktivitäten. wt = Wildtyp

Der aktivierende Einfluss auf die Promotoraktivität von  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  beim Fehlen von HtrA konnte durch die vorausgegangenen Versuche zweifelsfrei nachgewiesen werden. Um sicher zu stellen, dass die beobachteten Effekte durch CiaR vermittelt werden und damit das

ganze Regulon betroffen ist, wurde die Aktivität weiterer CiaR-abhängiger Promotoren untersucht. Da bei der zum Messen der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität angewandten Methode sehr niedrige Promotoraktivitäten oftmals mit einem recht großen Messfehler einhergehen und sehr hohe Aktivitäten eine Verdünnung der Proben vor dem Messen nötig macht, wurden Promotoren ausgewählt, die im Wildtyp eine mittlere Aktivität aufweisen. Aus den bislang bekannten 16 Promotoren mit CiaR-Bindemotiv fiel die Wahl auf die vier Promotoren  $P_{ccnA}$ ,  $P_{I_{spr1149}}$ ,  $P_{spr0782}$  und  $P_{ciaR}$ . Bei ersteren beiden handelt es sich um stark CiaR-abhängige Promotoren handelt, die in Abwesenheit von CiaR keinerlei messbare Aktivität mehr aufweisen (Halfmann *et al.*, 2007b). Die beiden letzteren Promotoren dagegen zeigen auch in Abwesenheit von CiaR noch eine deutlich messbare Basalaktivität, insbesondere der Promotor des *ciaRH*-Operons selbst, dessen Aktivität sich in *ciaR*-Deletionsstamm und Wildtyp kaum unterscheidet. Die Promotoren wurden wie  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  als Promotor-*lacZ*-Fusion durch pPP2 ins Genom integriert und anschließend die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt, die Rückschlüsse auf die Promotoraktivität ermöglicht.

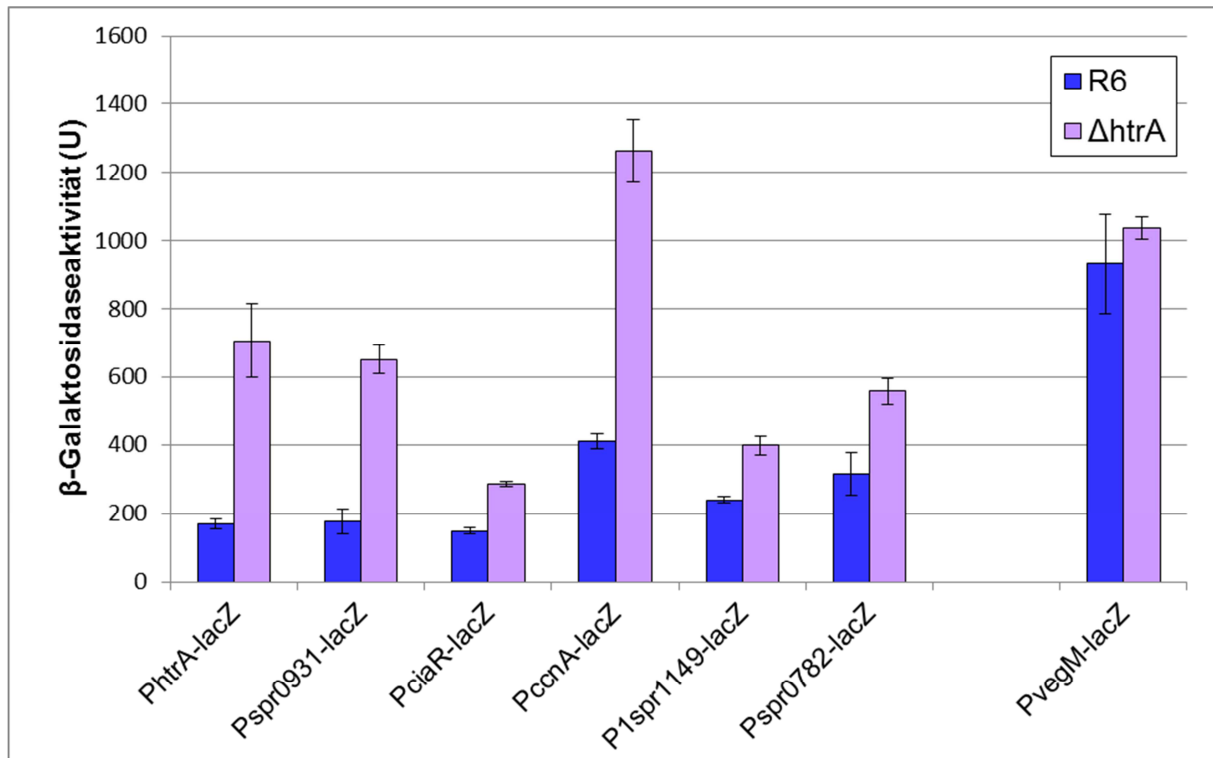
**Tab. 4.5: Durch verschiedene CiaR-regulierte Promotoren vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Wildtyps R6, sowie des *htrA*-Deletionsstammes R6 *htrA::aphIII*.**

Stamm <sup>a</sup>	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	Genetik	$\beta$ -Galaktosidaseaktivität <sup>b</sup> (U) $\pm$ Standardabweichung	<i>htrA::aphIII</i> /R6
RKL43	$P_{htrA}$	R6-wt	170 $\pm$ 14	4,2
RKL197		<i>htrA::aphIII</i>	707 $\pm$ 109	
RKL30	$P_{spr0931}$	R6-wt	177 $\pm$ 37	3,7
RKL198		<i>htrA::aphIII</i>	653 $\pm$ 42	
RKL26	$P_{ciaR}$	R6-wt	149 $\pm$ 9	1,9
RKL311		<i>htrA::aphIII</i>	287 $\pm$ 7	
RKL20	$P_{ccnA}$	R6-wt	412 $\pm$ 22	3,1
RKL312		<i>htrA::aphIII</i>	1264 $\pm$ 93	
RKL32	$P_{I_{spr1149}}$	R6-wt	241 $\pm$ 9	1,7
RKL313		<i>htrA::aphIII</i>	398 $\pm$ 27	
RKL27	$P_{spr0782}$	R6-wt	317 $\pm$ 62	1,8
RKL314		<i>htrA::aphIII</i>	559 $\pm$ 38	
RKL45	$P_{vegM}$	R6-wt	931 $\pm$ 145	1,1
RKL196		<i>htrA::aphIII</i>	1037 $\pm$ 32	

<sup>a</sup> Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ .

<sup>b</sup> Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Bei den angegebenen Units (U) handelt es sich um die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Aktivitäten. wt = Wildtyp

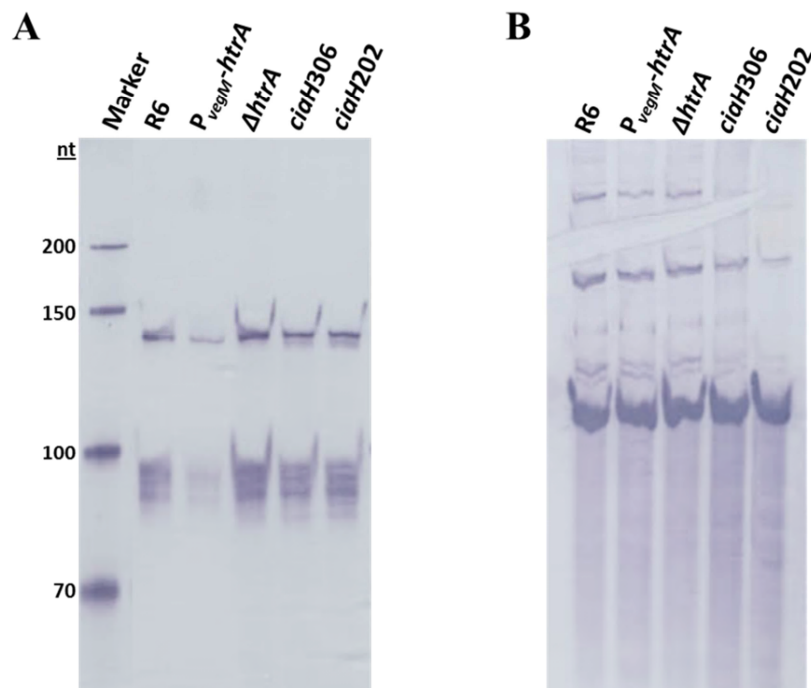
Wie in Tab. 4.5 und in Abb. 4.11 zu sehen ist, kommt es bei allen untersuchten CiaR-abhängigen Promotoren in Abwesenheit von HtrA zu einer gesteigerten Aktivität. Dabei variiert die Stärke der Aktivierung jedoch etwas. Während bei  $P_{ccnA}$  ähnlich wie bei  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  eine über 3-fach erhöhte Promotoraktivität zu beobachten ist, steigt sie bei  $P_{spr1149}$ ,  $P_{spr0782}$  und  $P_{ciaR}$  nur um das 1,7- bis 1,9-fache. Auch wenn die Stärke der Aktivierung etwas variiert, scheint sich das Fehlen von HtrA auf das gesamte Regulon auszuwirken.



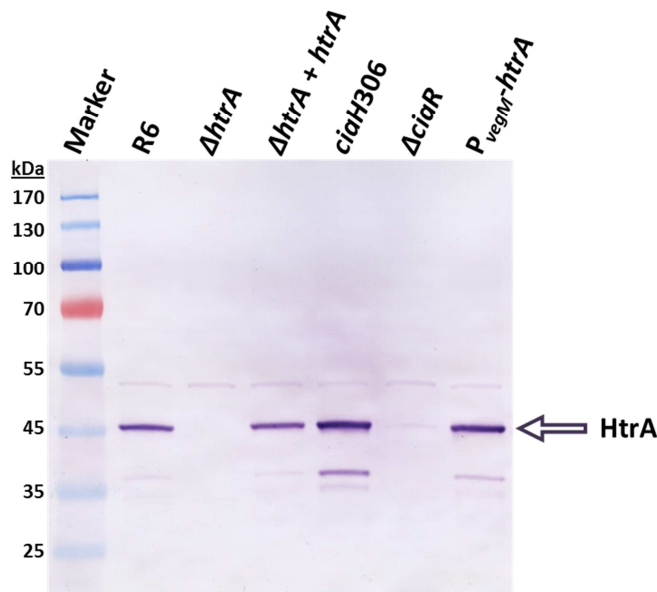
**Abb. 4.11:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität vermittelt durch verschiedene CiaR-regulierte Promotoren in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6  $htrA::aphIII$ .** Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ . Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die durch die Promotoren  $P_{htrA}$ ,  $P_{spr0931}$ ,  $P_{ciaR}$ ,  $P_{ccnA}$ ,  $P_{1spr1149}$ ,  $P_{spr0782}$  und  $P_{vegM}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Wildtyps R6 (blau) im Vergleich zu R6  $htrA::aphIII$  (lila).

Aufgrund der Beobachtung, dass das Fehlen von HtrA einen aktivierenden Effekt auf das gesamte CiaR-Regulon hat, stellte sich die Frage, ob die Überexpression von HtrA auch zu einer Inhibierung der CiaR-abhängigen Genregulation führt. Dazu wurde das  $htrA$ -Überexpressionskonstrukt  $P_{vegM}$ - $htrA$ , bei dem  $htrA$  unter der Kontrolle des starken Promotors  $P_{vegM}$  steht, in *S. pneumoniae* R6 eingebracht und untersucht. Da dieses Konstrukt an den selben Locus integriert wie die Promotor- $lacZ$ -Fusionen von pPP2, konnte in diesem Stamm

die Messung der Promotorstärken nicht als Maß für die Aktivierung des CiaRH-Systems herangezogen werden. Daher diente in diesem Fall die Menge der CiaR-regulierten csRNAs als Indikator für die Aktivität des CiaR-Regulons. Mit verschiedenen Stämmen wurde ein Northern Blot mit csRNA-spezifischen Sonden durchgeführt. Wie in Abb. 4.12 zu sehen ist, kommt es bei dem Stamm mit überexprimiertem *htrA* ( $P_{vegM}$ -*htrA*) zu einer starken Reduktion der csRNA-Menge. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Menge an HtrA (vgl. Abb. 4.13) in diesem Stamm tatsächlich zu einer Inhibierung des CiaRH-Systems führt (Abb. 4.12 A). Gleichzeitig sieht man in dem *htrA*-Deletionsstamm ( $\Delta htrA$ ) eine im Vergleich zum Wildtyp R6 erhöhte Menge an csRNAs, was mit den Ergebnissen der vorangegangenen Promotoraktivitätsmessungen korreliert. Die Menge der csRNAs in diesem Stamm scheint sogar die Menge an csRNAs in den Stämmen R6 *ciaH306* und R6 *ciaH202*, bei denen das CiaRH-System stark aktiviert ist, zu übertreffen. Möglicherweise ist dieser Umstand jedoch auch darauf zurückzuführen, dass in letzteren beiden Stämmen die aufgetragene Gesamt-RNA-Menge etwas geringer zu sein scheint (Abb. 4.12 B).



**Abb. 4.12: Northern Blot Analysen mit *S. pneumoniae*-Gesamt RNA und (A) csRNA- bzw. (B) 5s-RNA-spezifischen Sonden.** Die Stämme R6 (wt), R6  $P_{vegM}$ -*htrA*, R6 *htrA::aphIII* ( $\Delta htrA$ ), RKL168 (*ciaH306*) und RKL162 (*ciaH202*) wurden in C+Y-Medium bei 37°C bis  $OD_{600} = 0,8$  inkubiert und Gesamt-RNA isoliert. Für den Northern Blot wurden jeweils 3  $\mu$ g Gesamt-RNA durch ein 10%iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mittels spezifischer komplementärer Digoxigenin-markierter DNA-Sonden. Zu sehen sind die fünf csRNAs (A) der untersuchten Stämme bzw. als Ladekontrolle die 5sRNA (B). Als Marker wurden *in vitro*-synthetisierte RNAs von 70 bis 200 nt Länge verwendet.



**Abb. 4.13: Western Blot Analyse zur Detektion von HtrA.** Die Bakterienlysate der *S. pneumoniae*-Stämme R6, R6 *htrA::aphIII* ( $\Delta htrA$ ), R6 *htrA::aphIII*  $P_{htrA}$ -*htrA* ( $\Delta htrA + htrA$ ), RKL168 (*ciaH306*), R6 *ciaR::aad9* ( $\Delta ciaR$ ) und R6  $P_{vegM}$ -*htrA* wurden bezüglich ihrer HtrA-Menge miteinander verglichen. Der primäre Antikörper (Anti-HtrA) wurde 1:500 verdünnt, der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen) wurde in einer Verdünnung von 1:30000 eingesetzt. Die aufgetragene Lysatmenge entsprach einem Kulturvolumen von 125  $\mu$ l bei  $OD_{600} = 0,8$ . HtrA von *S. pneumoniae* hat ein Molekulargewicht von ca. 42 kDa. Als Marker wurde der peqGoldIV-Marker verwendet.

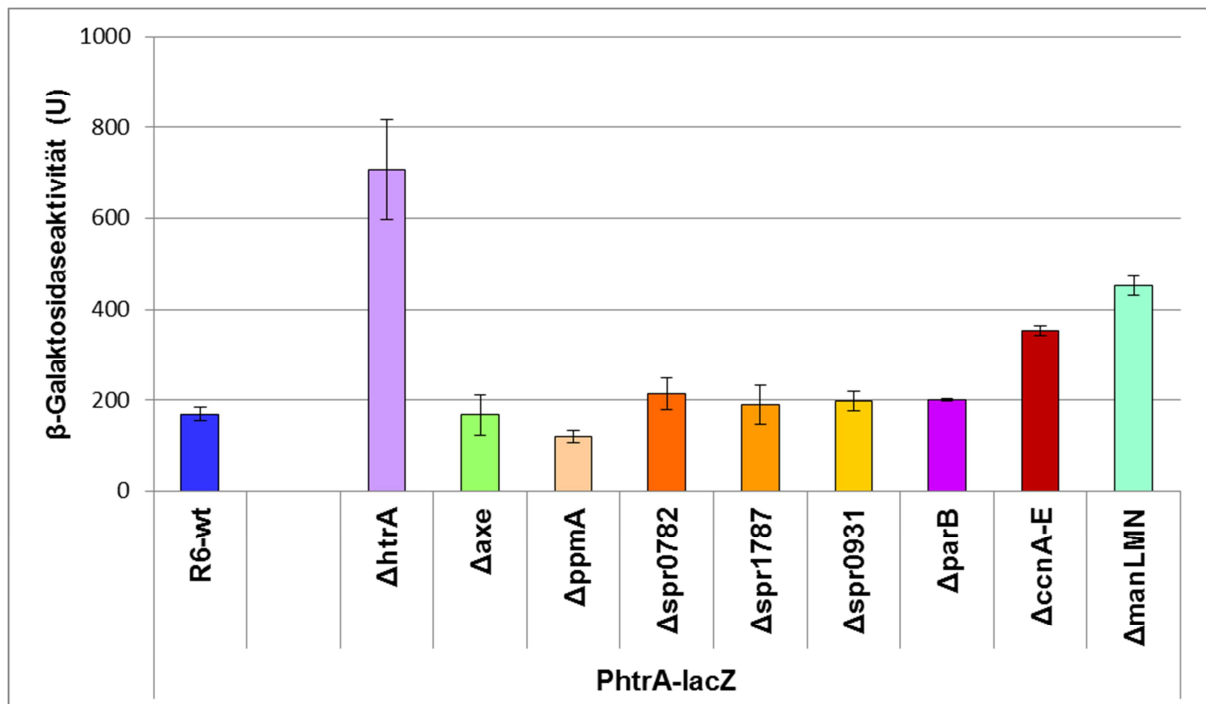
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente, dass HtrA auf alle untersuchten Promotoren und damit höchstwahrscheinlich auf das gesamte Regulon einen inhibitorischen Einfluss hat.

### 4.3.2 Der Einfluss weiterer Gendeletionen des CiaR-Regulons auf die Aktivität von CiaRH

Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass das Fehlen von HtrA zur Aktivierung der CiaR-abhängigen Genregulation führt. Ob es sich dabei um einen generellen Regulationsmechanismus handelt, mit dem CiaRH auf die Abwesenheit von Genprodukten seines Regulons reagiert oder ob die Regulation HtrA-spezifisch ist, ist noch unbekannt. Daher wurde der Einfluss von Deletionen weiterer Gene des CiaR-Regulons auf die Aktivität des CiaRH-Systems untersucht. Von den in 16 Transkriptionseinheiten organisierten bekannten Genen des Regulons wurden Deletionen der Gene von 12 Transkriptionseinheiten untersucht. Die meisten Konstrukte lagen als Deletionen einzelner Gene vor (*htrA*, *ppmA*, *spr0782*, *spr1787*, *spr0931*, *parB*). Nur die Gene des *manLMN*-Operons und die Gene der Cia-regulierten kleinen RNAs *ccnA-E* wurden jeweils gemeinsam deletiert. Mit der Deletion des



Gens *axe* wurde gleichzeitig das davorliegende, bei Hoskins (2001) nicht annotierte Gen *spr1538a* ausgeschaltet, das für ein 20 Aminosäuren kurzes Peptid codiert (Halfmann, 2008). Nicht untersucht wurden lediglich Deletionen des in *S. pneumoniae* R6 ohnehin nicht funktionellen *dltXABCDE*-Operons (Kovács *et al.*, 2006), des essentiellen *tarIJ/licABC*-Operons ( $P_{spr1149}$ -Operon) (Damjanovic *et al.*, 2007), des im Wildtyp nur geringfügig aktiven *malMP*-Operons (Halfmann *et al.*, 2007b) und des *ciaRH*-Operons selbst. Veränderungen im Aktivierungsstatus des CiaRH-Systems wurden durch die  $P_{spr0931}$ - und  $P_{htrA}$ -*lacZ*-Fusion in pPP2 nachgewiesen. Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidaseassays sind in Abb. 4.14 und Tab. 4.6 zusammengefasst, wobei in Abb. 4.14 zur besseren Übersicht nur die Aktivität des Promotors  $P_{htrA}$  in den untersuchten Stämmen dargestellt ist.



**Abb. 4.14: Durch den Promotor  $P_{htrA}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 mit verschiedenen Gendeletionen des CiaR-Regulons.** Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ . Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Wildtyps R6 (RKL43) im Vergleich zu den Derivaten mit deletierten Genen des CiaR-Gegulons, RKL197 ( $\Delta htrA$ ), RKL274 ( $\Delta axe$ ), RKL283 ( $\Delta ppmA$ ), RKL277 ( $\Delta spr0782$ ), RKL280 ( $\Delta spr1787$ ), RKL300 ( $\Delta spr0931$ ), RKL303 ( $\Delta parB$ ), RKLX ( $\Delta ccnA-E$ ) und RKL324 ( $\Delta manLMN$ ). wt = Wildtyp

**Tab. 4.6: Durch die Promotoren  $P_{vegM}$ ,  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 mit verschiedenen Gendeletionen des CiaR-Regulons.**

Stamm <sup>a</sup>	Genetik	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	$\beta$ -Galaktosidaseaktivität <sup>b</sup> (U) $\pm$ Standardabweichung	Stamm/R6
RKL196	<i>htrA::aphIII</i>	$P_{vegM}$	1037 $\pm$ 32	1,1
RKL197		$P_{htrA}$	707 $\pm$ 109	4,2
RKL198		$P_{spr0931}$	653 $\pm$ 42	3,7
RKL273	<i>axe::aphIII</i>	$P_{vegM}$	900 $\pm$ 98	1
RKL274		$P_{htrA}$	168 $\pm$ 45	1
RKL275		$P_{spr0931}$	191 $\pm$ 54	1,1
RKL282	<i>ppmA::cat</i>	$P_{vegM}$	1024 $\pm$ 185	1,1
RKL283		$P_{htrA}$	123 $\pm$ 13	0,7
RKL284		$P_{spr0931}$	149 $\pm$ 1	0,8
RKL276	$\Delta$ spr0782	$P_{vegM}$	1144 $\pm$ 51	1,2
RKL277		$P_{htrA}$	215 $\pm$ 35	1,3
RKL278		$P_{spr0931}$	201 $\pm$ 29	1,1
RKL279	<i>spr1787::aad9</i>	$P_{vegM}$	1022 $\pm$ 36	1,1
RKL280		$P_{htrA}$	190 $\pm$ 43	1,1
RKL281		$P_{spr0931}$	183 $\pm$ 56	1
RKL299	<i>spr0931::aad9</i>	$P_{vegM}$	1031 $\pm$ 19	1,1
RKL300		$P_{htrA}$	199 $\pm$ 21	1,2
RKL301		$P_{spr0931}$	218 $\pm$ 11	1,2
RKL302	<i>parB::cat</i>	$P_{vegM}$	1238 $\pm$ 94	1,3
RKL303		$P_{htrA}$	202 $\pm$ 2	1,2
RKL304		$P_{spr0931}$	224 $\pm$ 2	1,3
RKL363	$\Delta$ ccnCDEAB	$P_{vegM}$	1189 $\pm$ 137	1,3
RKL364		$P_{htrA}$	353 $\pm$ 10	2,1
RKL365		$P_{spr0931}$	407 $\pm$ 57	2,3
RKL323	<i>manLMN::ermAM</i>	$P_{vegM}$	1371 $\pm$ 84	1,5
RKL324		$P_{htrA}$	452 $\pm$ 22	2,7
RKL325		$P_{spr0931}$	483 $\pm$ 40	2,7

<sup>a</sup> Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ .

<sup>b</sup> Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Bei den angegebenen Units (U) handelt es sich um die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Aktivitäten.

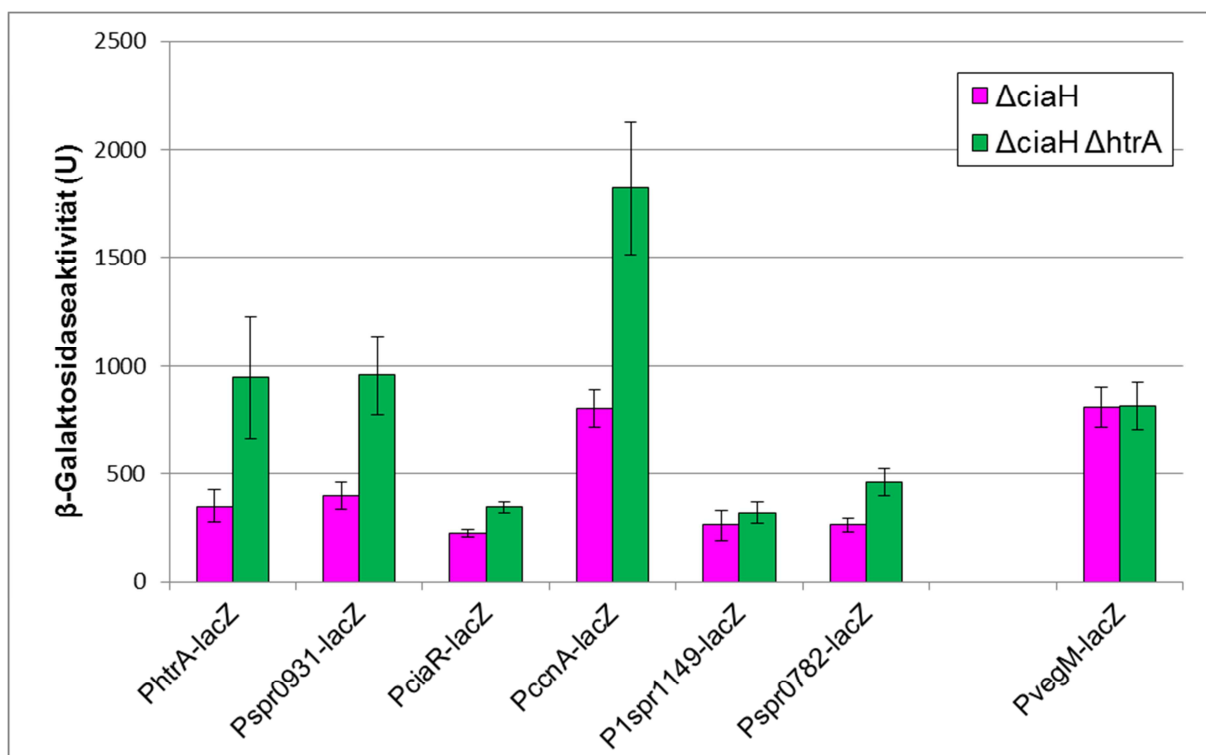
Wie Abb. 4.14 und Tab. 4.6 zeigen, führt ein Fehlen der meisten Gene des CiaR-Regulons nicht zu einer Änderung der CiaR-vermittelten Promotoraktivität. Lediglich die Abwesenheit aller Cia-regulierten kleinen RNAs, die Deletion von *manLMN* und die Deletion von *ppmA* führen zu einer veränderten Genexpression. Das Fehlen der csRNAs und ManLMN bewirkt

eine gesteigerte Aktivität des *spr0931*- und des *htrA*-Promotors um das 2- bis 3-fache, die damit also unter der 4- bis 6-fachen Aktivierung durch das Fehlen von HtrA liegt. Die Deletion von *ppmA* dagegen führt zu einer leichten Abnahme der CiaR-abhängigen Promotoraktivitäten. Das Fehlen von Axe/Spr1538a, Spr0782, Spr1787, Spr0931 und ParB führt zu keiner nennenswerten Reaktion des CiaRH-Regulons. Somit scheint klar, dass der Effekt von HtrA auf die Aktivität des CiaRH-Systems ein relativ spezifischer Regulationsmechanismus ist. Auch das Fehlen der *csRNAs* und des Phosphotransferasesystems (PTS) ManLMN zeigt einen aktivierenden Einfluss auf die CiaR-abhängige Genregulation, jedoch bleibt die Stärke dieser Effekte deutlich hinter der Aktivierung beim Fehlen von HtrA zurück. Weitere Versuche dieser Arbeit konzentrieren sich daher auf die Klärung der Rolle von HtrA.

### 4.3.3 Die Bedeutung von CiaH für die Inhibierung des CiaRH-Systems durch HtrA

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei HtrA um eine Serinprotease, die in der Zellhülle von *S. pneumoniae* lokalisiert ist (Sebert *et al.*, 2005). Bei Untersuchungen fand man HtrA vorwiegend in der Membranfraktion, aber auch in der Zellwandfraktion und im konzentrierten Überstand. Im Cytoplasma konnte kein HtrA nachgewiesen werden. Bei der weiteren Untersuchung des regulatorischen Effekts von HtrA auf die CiaR-vermittelte Genexpression lag daher der Schluss nahe, dass HtrA aufgrund seiner extracytoplasmatischen Lokalisation möglicherweise mit der Histidinkinase CiaH wechselwirkt und dadurch den Phosphorylierungsstatus von CiaR beeinflusst. Sollte dies der Fall sein, so müsste in Abwesenheit von CiaH der Effekt von HtrA nicht mehr zu beobachten sein. Wie Abb. 4.15 und Tab. 4.7 jedoch zeigen, sieht man auch beim Fehlen von CiaH eine Aktivierung der untersuchten Promotoren im *htrA*-Deletionsstamm. Die relative Aktivierung der Promotoren variiert dabei ähnlich wie bei den vorangegangenen Versuchen.  $P_{htrA}$ ,  $P_{spr0931}$  und  $P_{ccnA}$  werden stärker aktiviert. Hier steigt die Promotoraktivität um das 2- bis 3-fache.  $P_{spr0782}$  und  $P_{ciaR}$  werden mit 1,5- bis 1,8-fach etwas weniger stark aktiviert. Der Promotor  $P_{I_{spr1149}}$  zeigt wie bei den Versuchen zuvor die schwächste Aktivierung. Diese beträgt hier nur etwa das 1,2-fache und ist nicht mehr signifikant (Zweiseitiger t-Test:  $p > 0,05$ ). Die Stärke der Aktivierung in Abwesenheit von CiaH liegt damit insgesamt geringfügig unter der Aktivierung, die zuvor in Anwesenheit von CiaH beobachtet wurde (Tab. 4.5). Dies steht

möglicherweise in Zusammenhang mit dem veränderten Aktivierungsniveau des CiaR-Regulons, das durch das Fehlen von CiaH hervorgerufen wird. Die absoluten Werte der Promotoraktivitäten liegen bekanntermaßen im *ciaH*-Deletionsstamm in C+Y-Medium etwas höher als im Wildtyp, was darauf hindeutet, dass CiaH unter diesen Bedingungen als moderate Phosphatase agiert (Halfmann *et al.*, 2011). Der, mit einer Ausnahme, nach wie vor jedoch deutliche Anstieg der Promotoraktivitäten im *ciaH*-Deletionsstamm bei fehlendem HtrA zeigt, dass der inhibitorische Effekt von HtrA auf das CiaR-Regulon nicht durch CiaH vermittelt wird. Das bedeutet, dass HtrA auf andere Weise auf CiaR wirken muss.



**Abb. 4.15:  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität vermittelt durch verschiedene CiaR-regulierte Promotoren in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* bei An- und Abwesenheit von HtrA.** Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ . Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die durch die Promotoren  $P_{htrA}$ ,  $P_{spr0931}$ ,  $P_{ciaR}$ ,  $P_{ccnA}$ ,  $P_{1spr1149}$ ,  $P_{spr0782}$  und  $P_{vegM}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des *S. pneumoniae*-Stammes R6 *ciaH::aad9* (magenta) im Vergleich zu R6 *ciaH::aad9 htrA::aphIII* (grün).

**Tab. 4.7: Durch verschiedene CiaR-regulierte Promotoren vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des *S. pneumoniae*-Derivats R6 *ciaH::aad9* bei An- und Abwesenheit von HtrA.**

Stamm <sup>a</sup>	Promotor -lacZ- Fusion	Genetik	$\beta$ -Galaktosidase- aktivität <sup>b</sup> (U) $\pm$ Standardabweichung	<i>ciaH::aad9</i> <i>htrA::aphIII</i> / <i>ciaH::aad9</i>
RKL86	P <sub>htrA</sub>	<i>ciaH::aad9</i>	349 $\pm$ 78	
RKL316		<i>ciaH::aad9 htrA::aphIII</i>	946 $\pm$ 282	2,7
RKL81	P <sub>spr0931</sub>	<i>ciaH::aad9</i>	400 $\pm$ 64	
RKL317		<i>ciaH::aad9 htrA::aphIII</i>	957 $\pm$ 180	2,4
RKL78	P <sub>ciaR</sub>	<i>ciaH::aad9</i>	224 $\pm$ 17	
RKL318		<i>ciaH::aad9 htrA::aphIII</i>	345 $\pm$ 28	1,5
RKL74	P <sub>ccnA</sub>	<i>ciaH::aad9</i>	805 $\pm$ 86	
RKL319		<i>ciaH::aad9 htrA::aphIII</i>	1820 $\pm$ 308	2,3
RKL82	P <sub>1spr1149</sub>	<i>ciaH::aad9</i>	259 $\pm$ 74	
RKL320		<i>ciaH::aad9 htrA::aphIII</i>	318 $\pm$ 50	1,2
RKL79	P <sub>spr0782</sub>	<i>ciaH::aad9</i>	260 $\pm$ 32	
RKL321		<i>ciaH::aad9 htrA::aphIII</i>	462 $\pm$ 64	1,8
RKL87	P <sub>vegM</sub>	<i>ciaH::aad9</i>	809 $\pm$ 93	
RKL315		<i>ciaH::aad9 htrA::aphIII</i>	818 $\pm$ 109	1

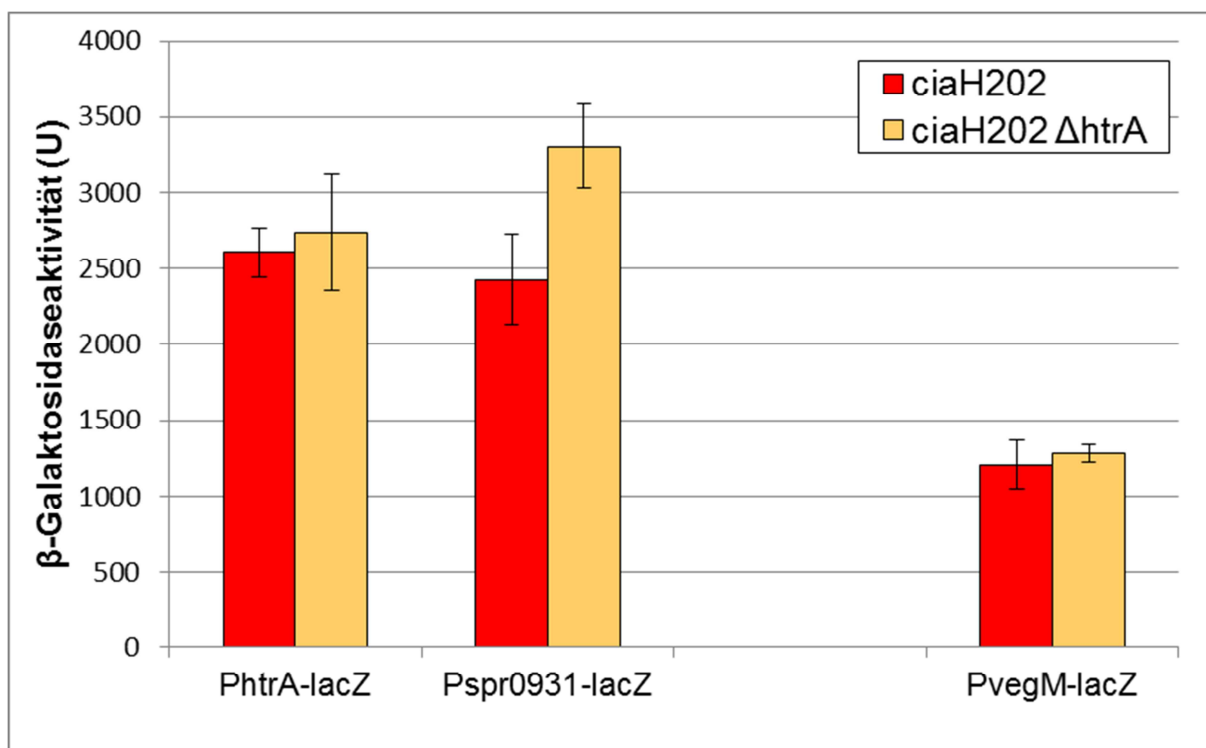
<sup>a</sup> Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8.

<sup>b</sup> Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Bei den angegebenen Units (U) handelt es sich um die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Aktivitäten.

#### 4.3.4 Der Einfluss von HtrA auf ein bereits aktiviertes CiaRH-System

Wie in Kapitel 4.1.2 gezeigt werden konnte, führen bestimmte Aminosäureaustausche in CiaH zu einer teilweise exorbitant hohen Aktivierung des CiaRH-Systems. Da der Mechanismus, über den HtrA das CiaRH-System beeinflusst, völlig unbekannt ist, stellte sich die Frage, wie sich ein Fehlen von HtrA auf ein bereits aktiviertes CiaRH-System auswirkt. Da die Inhibierung durch HtrA offensichtlich unabhängig von CiaH ist, ist es vorstellbar, dass sich die aktivierenden Effekte durch die veränderte Histidinkinase und die Abwesenheit von HtrA möglicherweise zu einer noch stärkeren Aktivierung ergänzen. Aus diesem Grund wurde die *htrA*-Insertionsdeletion *htrA::aphIII* in *S. pneumoniae* R6 mit *ciaH*-Allel *ciaH202* eingebracht, von dem in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass es die CiaR-abhängige Genregulation um etwa das 15-fache erhöht (Kap. 4.1.2). Wie Abb. 4.16 und

Tab. 4.8 zeigen, führt die Abwesenheit von HtrA jedoch nicht zu einem nennenswerten weiteren Anstieg der Aktivierung. In dem bereits aktivierten *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* ändert sich bei der Deletion von *htrA* die Promotoraktivität von  $P_{htrA}$  nahezu überhaupt nicht und die Aktivität von  $P_{spr0931}$  nur um das 1,5-fache, was deutlich unter der zuvor beobachteten Aktivierung des 2,4- bis 3,7-fachen für diesen Promotor in nicht aktivierten Stämmen liegt (Tab. 4.5 und Tab. 4.7). Somit scheint die Aktivierung durch eine veränderte Histidinkinase CiaH und durch die Abwesenheit von HtrA zwar auf unterschiedlichen Wegen zu erfolgen, sich aber nicht zwangsweise zu multiplizieren.



**Abb. 4.16:** Durch die Promotoren  $P_{vegM}$ ,  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* bei An- und Abwesenheit von HtrA. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ . Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die durch die Promotoren  $P_{htrA}$ ,  $P_{spr0931}$  und  $P_{vegM}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des *S. pneumoniae*-Stammes R6 *ciaH202* (rot) im Vergleich zu R6 *ciaH202* *htrA::aphIII* (orange).

**Tab. 4.8: Durch die Promotoren  $P_{vegM}$ ,  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* bei An- und Abwesenheit von HtrA.**

Stamm <sup>a</sup>	Promotor -lacZ- Fusion	Genetik	$\beta$ -Galaktosidase- aktivität <sup>b</sup> (U) $\pm$ Standardabweichung	<i>ciaH202</i> <i>htrA::aphIII</i> / <i>ciaH202</i>
RKL170	$P_{htrA}$	<i>ciaH202</i>	2607 $\pm$ 161	
RKL194		<i>ciaH202 htrA::aphIII</i>	2741 $\pm$ 386	1,1
RKL171	$P_{spr0931}$	<i>ciaH202</i>	2426 $\pm$ 297	
RKL195		<i>ciaH202 htrA::aphIII</i>	3307 $\pm$ 277	1,4
RKL169	$P_{vegM}$	<i>ciaH202</i>	1208 $\pm$ 163	
RKL193		<i>ciaH202 htrA::aphIII</i>	1281 $\pm$ 60	1,1

<sup>a</sup> Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ .

<sup>b</sup> Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Bei den angegebenen Units (U) handelt es sich um die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Aktivitäten.

#### 4.3.5 Die Bedeutung des Mediums

Der Aktivierungsstatus von CiaRH hängt in bedeutendem Maße vom Medium ab. So ist beispielsweise das Aktivierungsniveau des CiaR-Regulons in Medien wie THB oder BHI höher als im C+Y-Medium. Des Weiteren zeigen neuere Erkenntnisse, dass im C+Y-Medium die Phosphorylierung von CiaR auch in Abwesenheit von CiaH stattfindet, möglicherweise als Autophosphorylierung durch energiereiche Moleküle wie Acetylphosphat, die medienabhängig unterschiedlich zur Verfügung stehen (Wolfe, 2005; Halfmann *et al.*, 2011). Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob HtrA medienabhängig Einfluss auf die Aktivität von CiaRH nimmt, sollte der inhibitorische Effekt von HtrA auch in THB untersucht werden. Erste Untersuchungsergebnisse sind in

Tab. 4.9 zusammengefasst, Abb. 4.17 zeigt die Promotoraktivität von  $P_{htrA}$  in den untersuchten Stämmen. Wie die  $\beta$ -Galaktosidaseassays zeigen, kommt es auch in THB zu einer Aktivierung des CiaRH-Systems beim Fehlen von HtrA. Man erkennt zudem deutlich die Abhängigkeit der CiaR-Aktivität von der Histidinkinase CiaH in diesem Medium. In Abwesenheit von CiaH kommt es daher zu einem starken Rückgang der CiaR-abhängigen Promotoraktivitäten. Die Promotoren  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  zeigen jedoch bei An- und Abwesenheit von CiaH gleichermaßen eine HtrA-abhängige Aktivierung. Die Promotoraktivität von  $P_{spr0931}$  steigt bei Abwesenheit von HtrA um das 4- bis 5-fache an, bei dem Promotor  $P_{htrA}$  kommt es sogar zu einem 5- bis 6-fachen Anstieg. Diese Ergebnisse bestätigen, gemeinsam mit den Experimenten aus Kap. 4.3.3, die Unabhängigkeit der HtrA-

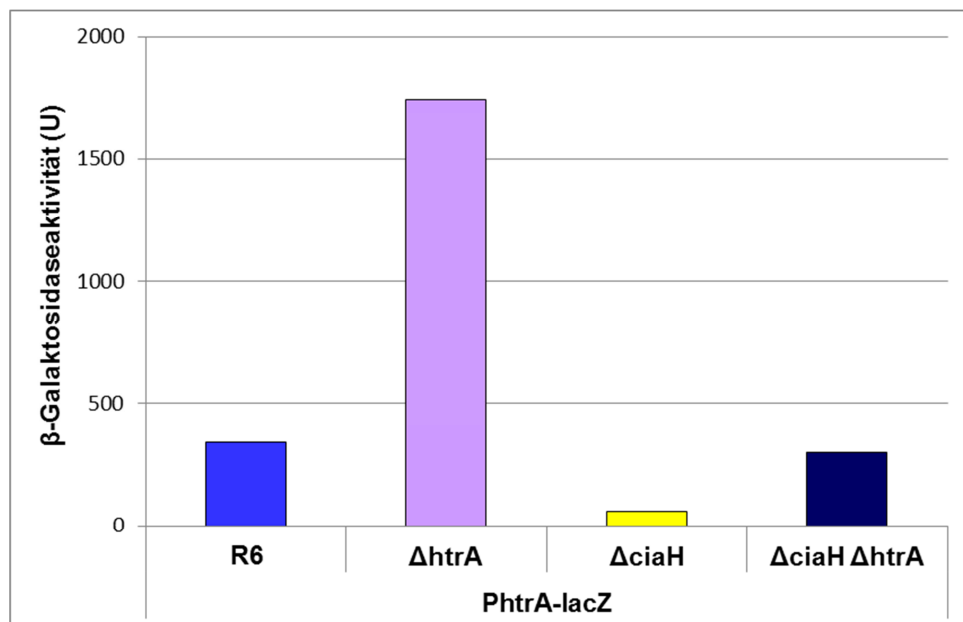
Inhibierung von der Histidinkinase CiaH. Ebenso zeigen sie, dass der Effekt von HtrA zumindest unter den untersuchten Bedingungen nicht medienabhängig ist.

**Tab. 4.9:** Durch die Promotoren  $P_{vegM}$ ,  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 und verschiedenen Derivaten in THB.

Stamm <sup>a</sup>	Genetik	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	$\beta$ -Galaktosidaseaktivität <sup>b</sup> (U)	<i>htrA::aphIII/htrA</i> <sup>+</sup>
RKL45	R6-wt	$P_{vegM}$	746	
RKL43		$P_{htrA}$	338	
RKL30		$P_{spr0931}$	410	
RKL196	<i>htrA::aphIII</i>	$P_{vegM}$	872	1,2
RKL197		$P_{htrA}$	1743	5,2
RKL198		$P_{spr0931}$	1696	4,1
RKL87	<i>ciaH::aad9</i>	$P_{vegM}$	717	
RKL86		$P_{htrA}$	56	
RKL81		$P_{spr0931}$	70	
RKL315	<i>ciaH::aad9 htrA::aphIII</i>	$P_{vegM}$	747	1
RKL316		$P_{htrA}$	300	5,4
RKL317		$P_{spr0931}$	350	5

<sup>a</sup> Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in THB bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ .

<sup>b</sup> Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. wt = Wildtyp



**Abb. 4.17:** Durch den Promotor  $P_{htrA}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 und verschiedenen Derivaten in THB. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in THB bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ . Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Dargestellt ist die durch  $P_{htrA}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Wildtyps R6 (RKL43) und der Stämme RKL 197 ( $\Delta htrA$ ), RKL86 ( $\Delta ciaH$ ) und RKL 316 ( $\Delta ciaH \Delta htrA$ ).



### 4.3.6 Die Bedeutung der Kompetenz

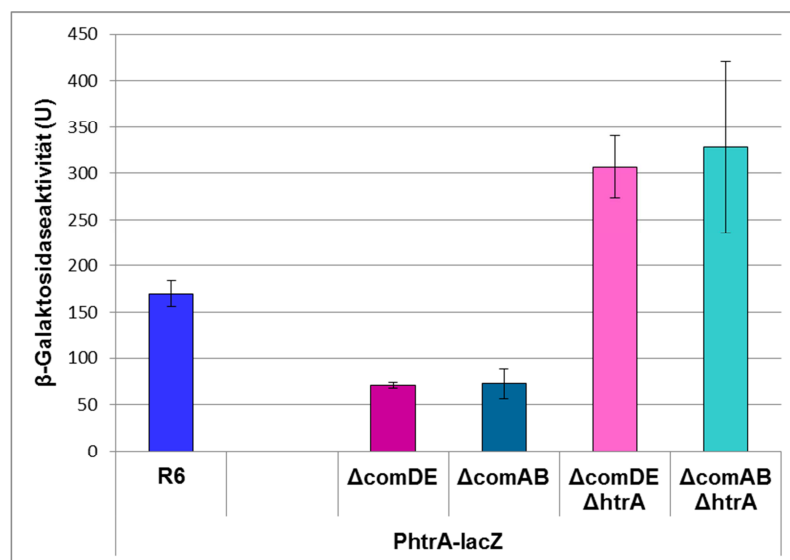
Wie in Tab. 4.6 zu sehen ist, scheinen neben HtrA noch weitere Genprodukte des CiaR-Regulons einen Einfluss auf den Aktivierungsstatus des CiaRH-Systems zu haben. Bei der Deletion von *manLMN* und von *ccnA-E* zeigte sich ebenfalls eine, wenn auch etwas geringere, Aktivierung der CiaR-abhängigen Genregulation. Wie vorhergehende Experimente gezeigt haben, sind die Cia-regulierten kleinen RNAs wie HtrA an der negativen Regulation der Kompetenz beteiligt (Kap. 4.2.1). Aufgrund dessen erscheint es möglich, dass der inhibitorische Effekt von HtrA und *csRNA1-5* auf das Kompetenzsystem von *S. pneumoniae* seinerseits die beobachtete Inhibierung des CiaRH-Systems bewirken könnte. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden im *htrA*-Deletionsstamm mit *htrA*-Minigen die für die natürliche Kompetenzinduktion essentiellen Gene *comAB* und *comDE* ausgeschaltet. *ComAB* codiert für einen ABC-Transporter, der das Vorläuferprotein des Kompetenzpheromons CSP exportiert und prozessiert (Håvarstein *et al.*, 1995; Hui *et al.*, 1995). *ComDE* sind die Gene des Zweikomponentensystems ComDE, das auf eine bestimmte Schwellenkonzentration von CSP reagiert und die Induktion der Kompetenz einleitet (Håvarstein *et al.*, 1996; Pestova *et al.*, 1996). Die Deletion dieser Gene führt dazu, dass das Kompetenzsystem von *S. pneumoniae* nicht mehr auf natürliche Weise induziert werden kann. Sollte der Effekt von HtrA auf das CiaRH-System tatsächlich indirekt über die Veränderung der Kompetenz vermittelt werden, so müsste bei generell blockierter Kompetenz dieser Effekt nicht mehr zu beobachten sein. Tab. 4.10 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase-assays. In Abb. 4.18 ist zur besseren Übersicht nur die Aktivität des *htrA*-Promotors in den untersuchten Stämmen dargestellt. Wie deutlich zu erkennen ist, kommt es auch in den Stämmen mit blockierter Kompetenz beim Fehlen von HtrA zu einer Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotoren. So erhöhen sich die CiaR-vermittelten Promotoraktivitäten von  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  im Stamm ohne ComDE um das 4- bis 5-fache wenn *htrA* deletiert wird. Auch in dem Stamm mit inaktiviertem ComAB führt das Fehlen von HtrA zu einer Aktivierung von  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  im selben Maß. Der Effekt von HtrA scheint also nicht über die Kompetenz vermittelt zu sein. Abgesehen davon wird jedoch auch deutlich, dass die Unterdrückung der Kompetenz an sich tatsächlich Auswirkungen auf das CiaRH-System hat. So ist die Promotoraktivität der CiaR-kontrollierten Promotoren  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  in den Stämmen R6 *comDE::aphIII* und R6 *comAB::aphIII* nur halb so hoch wie im Wildtyp mit noch induzierbarer Kompetenz. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die regulatorische Verknüpfung von CiaRH und dem Kompetenzsystem in *S. pneumoniae*.

**Tab. 4.10:** Durch die Promotoren  $P_{vegM}$ ,  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den *S. pneumoniae*-Derivaten R6  $comDE::aphIII$  und R6  $comAB::aphIII$  bei An- und Abwesenheit von HtrA.

Stamm <sup>a</sup>	Genetik	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	$\beta$ -Galaktosidaseaktivität <sup>b</sup> (U) $\pm$ Standardabweichung	$\Delta htrA/htrA^+$
RKL285	$comDE::aphIII$	$P_{vegM}$	807 $\pm$ 103	
RKL286		$P_{htrA}$	71 $\pm$ 3	
RKL287		$P_{spr0931}$	74 $\pm$ 13	
RKL289	$comDE::aphIII \Delta htrA$	$P_{vegM}$	952 $\pm$ 59	1,2
RKL290		$P_{htrA}$	307 $\pm$ 33	4,3
RKL291		$P_{spr0931}$	358 $\pm$ 28	4,8
RKL292	$comAB::aphIII$	$P_{vegM}$	1138 $\pm$ 423	
RKL293		$P_{htrA}$	73 $\pm$ 16	
RKL294		$P_{spr0931}$	75 $\pm$ 5	
RKL296	$comAB::aphIII \Delta htrA$	$P_{vegM}$	1034 $\pm$ 135	1,3
RKL297		$P_{htrA}$	328 $\pm$ 93	4,6
RKL298		$P_{spr0931}$	299 $\pm$ 10	4

<sup>a</sup> Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ .

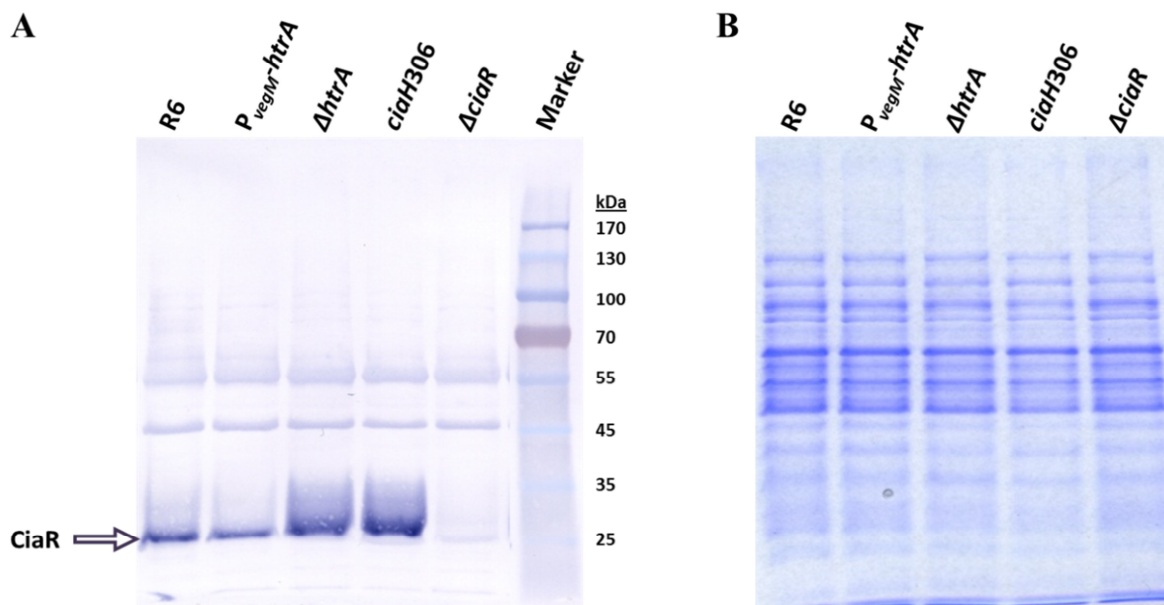
<sup>b</sup> Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Bei den angegebenen Units (U) handelt es sich um die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Aktivitäten



**Abb. 4.18:** Durch den Promotor  $P_{htrA}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den kompetenzdefizienten *S. pneumoniae*-Derivaten R6  $comDE::aphIII$  und R6  $comAB::aphIII$  bei An- und Abwesenheit von HtrA. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$ . Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die durch  $P_{htrA}$  vermittelte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Wildtyps R6 (RKL43) und der Stämme RKL 286 ( $\Delta comDE$ ), RKL293 ( $\Delta comAB$ ), RKL290 ( $\Delta comDE \Delta htrA$ ) und RKL 297 ( $\Delta comAB \Delta htrA$ ).

### 4.3.7 Der Einfluss von HtrA auf die Menge des Responseregulators CiaR

Die bisherigen Versuche konnten eindeutig zeigen, dass HtrA unter verschiedensten Bedingungen einen inhibitorischen Effekt auf das CiaRH-System hat. Da die Beteiligung von CiaH an diesem Regulationsmechanismus ausgeschlossen werden konnte, bleibt die Frage, wie HtrA die CiaR-abhängige Genregulation beeinflusst. Eine direkte Interaktion zwischen HtrA und CiaR kann aufgrund der räumlichen Trennung höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden. Auch bleibt bislang unklar, ob die durch HtrA veränderte Aktivierung des CiaR-Regulons auf eine Veränderung der Phosphorylierung oder Proteinmenge von CiaR zurückzuführen ist. Erste Untersuchungen mit Hilfe eines Western Blots zeigten im *htrA*-Deletionsstamm eine deutlich erhöhte CiaR-Menge im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.19). Durch die Autoregulation des *ciaRH*-Operons bleibt die Interpretation dieses Ergebnisses jedoch schwierig, da auch eine erhöhte Phosphorylierung von CiaR unweigerlich zu einer erhöhten CiaR-Menge führt, wie man an dem Stamm R6 *ciaH306* deutlich erkennt.



**Abb. 4.19: Western Blot Analyse zur Detektion von CiaR.** Die untersuchten *S. pneumoniae*-Stämme R6 (Wildtyp), R6  $P_{vegM}$ -*htrA*, R6 *htrA::aphIII* ( $\Delta$ *htrA*), RKL168 (*ciaH306*) und R6 *ciaR::aad9* ( $\Delta$ *ciaR*) wurden in C+Y-Medium bei 37°C bis zu  $OD_{600} = 0,8$  inkubiert und anschließend lysiert. Die eingesetzte Lysatmenge entsprach einem Kulturvolumen von 100  $\mu$ l. Die Auftrennung der Bakterienlysate erfolgte durch ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel. (A) Western Blot Analyse zum Vergleich der untersuchten Stämme bezüglich ihrer CiaR-Menge. Der primäre Antikörper (Anti-CiaR) wurde 1:5000 verdünnt, der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen) wurde in einer Verdünnung von 1:30 000 eingesetzt. CiaR von *S. pneumoniae* R6 hat ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Als Marker wurde der peqGoldIV-Marker verwendet. (B) Coomassie-Färbung des Gesamtproteins als Ladekontrolle.

## 5 Diskussion

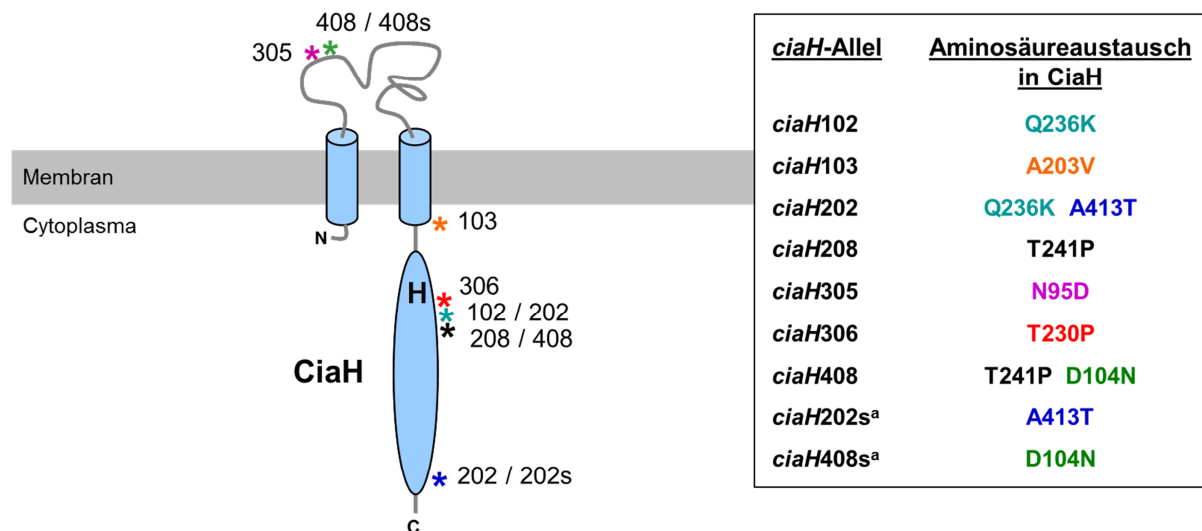
### 5.1 Der Einfluss bestimmter *ciaH*-Mutationen auf die Funktion von CiaH und den Phosphorylierungsstatus von CiaR

Bei Untersuchungen zur  $\beta$ -Lactamresistenz bei *S. pneumoniae* durch Selektion auf sukzessiv gesteigerten  $\beta$ -Lactamantibiotika-Konzentrationen traten in den verschiedenen Mutantenfamilien neben Mutationen in *pbp*-Genen auch Spontanmutationen im Histidinkinasegen *ciaH* auf (Zähler *et al.*, 2002). Bei dem bereits recht gut charakterisierten Allel *ciaH306* aus der C006-Mutantenfamilie wurde ein stark aktivierender Effekt auf die CiaR-abhängige Genregulation festgestellt (Mascher *et al.*, 2003; Halfmann *et al.*, 2007b). Die anderen variablen *ciaH*-Allele der Spontanmutanten wurden nun in dieser Arbeit ebenfalls dahingehend untersucht. Von den bereits beschriebenen *ciaH*-Allelen (Zähler *et al.*, 2002) wurden, mit zwei Ausnahmen, alle Allele bei der Untersuchung miteinbezogen. Zusätzlich wurden noch die nichtveröffentlichten *ciaH*-Allele *ciaH208* und *ciaH408* aus den Labormutanten P208 und P408 (Laible und Hakenbeck, 1987) untersucht. Die bei Zähler *et al.* beschriebenen *ciaH*-Allele der Mutanten C401 und C104 wurden nicht weiter charakterisiert. Das Allel von C401 besitzt eine Mutation, die zum Translationsabbruch nach Trp9 führt, womit eine sichere Inaktivierung von CiaH einhergeht. Die Mutante C104 besitzt das selbe *ciaH*-Allel wie C103 und musste daher nicht zusätzlich untersucht werden.

Jedes der untersuchten *ciaH*-Allele führt zu einer deutlichen Aktivierung des CiaRH-Systems, die bei einigen Allelen (*ciaH102*, *ciaH103* und *ciaH202*) sogar über die Aktivierung des bereits bekannten Allels *ciaH306* hinausgeht. Die schwächste Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotoren  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  in C+Y-Medium wurde durch das Allel *ciaH305* vermittelt und war etwa 4-fach im Vergleich zum Wildtyp. Für das Allel *ciaH102* wurde sogar eine 26-fache Erhöhung der Promotoraktivitäten beobachtet (Tab. 4.2). Da die Phosphorylierung des Response Regulators CiaR essentiell für seine biologische Funktion als Transkriptionsregulator ist (Halfmann *et al.*, 2011), kann davon ausgegangen werden, dass die durch die verschiedenen Allele vermittelten Veränderungen in CiaH eine deutlich erhöhte Menge an phosphoryliertem CiaR bewirken. Viele Histidinkinasen sind bifunktional, das heißt, sie besitzen sowohl eine Kinase-, als auch eine Phosphatasefunktion (Alves und Savageau, 2003). Auf diese Weise kann der Phosphorylierungsstatus eines Response

Regulators von der zugehörigen Histidinkinase also sowohl durch Phosphorylierung, als auch durch Dephosphorylierung reguliert werden. Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass CiaH ebenfalls bifunktional sein könnte (Halfmann *et al.*, 2011). Während CiaH in den Medien THB und BHI notwendig für die Aufrechterhaltung der hohen Basalaktivität von CiaR ist, führt die Abwesenheit von CiaH in C+Y-Medium zu einer 2-fachen Erhöhung der CiaR-Aktivität (vgl. auch Tab. 4.4 und 4.6). Dies spricht dafür, dass in C+Y-Medium CiaR auf einem CiaH-unabhängigen Wege phosphoryliert wird und CiaH als moderate Phosphatase den Phosphorylierungsstatus von CiaR herunterreguliert. Alle untersuchten *ciaH*-Allele führen in C+Y-Medium zu einer viel stärkeren Aktivierung von CiaR als bei Abwesenheit von CiaH beobachtet wird. Dieser Umstand zeigt deutlich, dass im Falle der *ciaH*-Allele eine defekte Phosphataseaktivität der veränderten CiaH-Histidinkinasen als alleinige Ursache für die Erhöhung der Phospho-CiaR-Menge ausgeschlossen werden kann. Vielmehr müssen die verschiedenen Aminosäureaustausche bewirken, dass CiaH auch in C+Y-Medium CiaR aktiv phosphoryliert und damit als Kinase fungiert.

Bei CiaH handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine klassische membranständige Histidinkinase. Das Programm TMpred (Hofmann und Stoffel, 1993) gibt für CiaH zwei Transmembranhelices mit dazwischenliegender extracytoplasmatischer Domäne, sowie einen langen cytoplasmatischen C-Terminus an. Die verschiedenen Mutationen der *ciaH*-Allele und die daraus resultierenden Aminosäureaustausche lassen sich anhand ihrer Position in verschiedene Gruppen unterteilen. Zwei der Aminosäureaustausche liegen in der putativen extracytoplasmatischen Sensordomäne (*ciaH305*, *ciaH408* / *ciaH408s*), ein Austausch liegt am Ende der Transmembrandomäne (*ciaH103*), drei der Austausche befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft des konservierten Histidinrests (Histidin226), der bei der Signaltransduktion als Phosphodonor für CiaR fungiert (*ciaH306*, *ciaH102*, *ciaH208*) und ein Aminosäureaustausch ist am C-terminalen Ende von CiaH lokalisiert (*ciaH202* / *ciaH202s*) (Abb. 5.1, Abb. 5.2). Da es noch keine strukturellen Untersuchungen von CiaH gibt, kann man über die dreidimensionale Lage der betroffenen Aminosäuren und die daraus resultierenden Auswirkungen der Austausche auf Struktur und Funktion von CiaH nur im Vergleich mit besser untersuchten Histidinkinasen diskutieren.



**Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Histidinkinase CiaH mit der Lokalisation der durch die *ciaH*-Allele der Spontanmutanten vermittelten Aminosäureaustausche.** Die Sterne markieren die ungefähre Position der Aminosäureaustausche in CiaH. Die danebenstehenden Nummern entsprechen den Nummern der Allele, die zu dem jeweiligen Austausch führen. Die Position des katalytischen Histidins ist mit einem H gekennzeichnet.  
<sup>a</sup> Diese Allele wurden durch gerichtete Mutagenese hergestellt.

Die Aminosäureaustausche in der putativen Sensordomäne von CiaH zeigen von allen untersuchten Veränderungen die geringsten Auswirkungen auf CiaR. Der Asparagin-zu-Aspartat-Austausch (N95D) des *ciaH*-Allels *ciaH305* führt zu einem 4-fachen Anstieg der CiaR-abhängigen Promotoraktivität. Auch in der Histidinkinase CpxA von *E. coli* führten Veränderungen in der Sensordomäne zu einer Aktivierung des zugehörigen Response Regulators CpxR (Raivio und Silhavy, 1997). Im Falle von CpxA wird wahrscheinlich durch die Veränderungen in der Sensordomäne die Bindung eines Inhibitors verhindert, was entsprechend zu einem positiven Effekt auf CpxR führt. Bei CiaRH scheinen zwar bestimmte Bedingungen, wie die Steigerung der Acetatmenge im Medium, durchaus einen CiaH-vermittelten inhibitorischen Effekt auf CiaR zu haben (Günzler, 2010), einen direkten Hinweis auf die Bindung eines Inhibitors gibt es jedoch nicht. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die CiaR-vermittelte Genregulation zu Beginn der Stationärphase eine Aktivierung erfährt, die von CiaH abhängt (Halfmann *et al.*, 2011). Diese Aktivierung ist auch in R6 *ciaH305* noch zu beobachten (eigene Daten, unveröffentlicht). Sollten die Aktivitätsunterschiede von CiaH zu CiaH-N95D tatsächlich durch die Dissoziation eines Inhibitors von der putativen Sensordomäne verursacht werden, so müsste CiaH in der Lage sein, auch bei gebundenem Inhibitor, die Anwesenheit eines Signals detektieren zu können. Eine weitere mögliche Erklärung für die Aktivierung von CiaR durch eine Veränderung in der putativen Sensordomäne wären Konformationsänderungen, die die enzymatische Aktivität der

intrazellulären katalytisch aktiven Domäne beeinflusst, ähnlich wie es bei der Detektion eines Stimulus‘ passiert.

Der durch eine Punktmutation des Allels *ciaH408* hervorgerufene Austausch von Aspartat zu Asparagin (D104N) in der extracytoplasmatischen Domäne führte in Kombination mit dem anderen *ciaH408*-vermittelten Austausch T241P zu keiner weiteren Aktivierung von CiaR im Vergleich zu T241P alleine (*ciaH208*). Auch die isolierte Untersuchung von D104N in einem ansonsten unveränderten CiaH (*ciaH408s*) zeigte die gleiche Aktivität des CiaRH-Systems wie der Wildtyp. Offensichtlich führt dieser Aminosäureaustausch zu keiner funktionellen Veränderung von CiaH.

Eine der stärksten gemessenen Aktivierungen des CiaRH-Systems wird durch den Aminosäureaustausch A203V des Allels *ciaH103* verursacht. Laut der Berechnung des Programms Tmpred umfasst die zweite Transmembranhelix von CiaH die Aminosäuren 183-202. Damit liegt der Austausch A203V direkt am Ende der Helix im Cytoplasma. Auch in *E. coli* sind CpxA-Mutanten beschrieben, bei denen Aminosäureaustausche am Ende der Transmembranhelix zu einer Aktivierung von CpxR führen (Raivio und Silhavy, 1997). Trotz allem ist es erstaunlich, dass der Austausch von Alanin zu Valin, also von zwei Aminosäuren mit unpolarem Rest, einen doch recht drastischen Effekt auf die Funktion von CiaH hat. Offensichtlich ist der Übergang von der Transmembrandomäne zur cytoplasmatischen Phosphotransfer- und katalytischen Domäne ein sensibler Bereich. Da in einigen bekannten Fällen die Transmembranhelix die Vermittlung eines Stimulus von der extrazellulären Sensordomäne zur cytoplasmatischen Transmitterdomäne vermittelt (Gao und Stock, 2009), ist eine bestimmte Konformation am Übergang von Transmembran- zu katalytischer Domäne möglicherweise von entscheidender Bedeutung für die Kontrolle der physiologischen Funktionalität von CiaH.

Der cytoplasmatische Bereich von CiaH weist die Merkmale einer Histidinkinase der Klasse I auf, mit der DHP- und CA-Domäne, und beinhaltet die konservierten Boxen H, N, G1, F und G2 (Abb. 5.2; Stock *et al.*, 1989; Parkinson und Kofoid, 1992; Bilwes *et al.*, 1999). Strukturaufklärungen des partiellen oder vollständigen C-terminalen Bereichs bei anderen Histidinkinasen dieser Klasse zeigten eine deutliche strukturelle Ähnlichkeit (Tanaka *et al.*, 1998; Bilwes *et al.*, 1999; Tomomori *et al.*, 1999; Marina *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2004; Marina *et al.*, 2005; Albanesi *et al.*, 2009; Bick *et al.*, 2009), was in einem gewissen Rahmen auch Rückschlüsse auf die Struktur von CiaH ermöglicht.

CiaH_S.pneumoniae	-----MFSKLLKKTWYADDFSYFIRNFGVFTLIFSTMTLLIILQVMHSSLYTS
EnvZ_E.coli	-----MRRLRFSRSPSSFARTLLLIVTLLFASLVTTYLVVLFNFAILPSLQQFNKVLAYE
CpxA_E.coli	MIGSLTARIFAFI FWLTLALVLMVLMPLKLSRQMTTELLDSEQRQGLMTEQHVEAELAND
HK853_T.maritima	---MEEIKEQNRLFLLLSIMIMEFSNAKTESDILQGLLNLVRKVVDIKEVVLVNDENKRK
CiaH_S.pneumoniae	VDDKLHGLSENPQAVIQLAINRATEEIKDLENARADASKVEIKPNVSSTEVILFDKFT
EnvZ_E.coli	VRMLMTDKLQLEDGTLVVPFAFRREIYRELGISLYSNEAAEEAGLRWAQHYEFLSHQMA
CpxA_E.coli	PPNDLMWRRRLFRAIDKWAPPQORLLLVTTTEGRVIGAERSEMQIIRNFIGQADNADHPQK
HK853_T.maritima	IWGRDIDIKRFEFIDWSIRQSNPVFVEDELGYVGVVQDRMFGSLIVLLNHQPSME
CiaH_S.pneumoniae	QLLSGNRFLGLDKIKLEKELG-----HIYQIQVFNSYQEEIYRVILMETNISS
EnvZ_E.coli	QQGGPTEVRVEVNKSSPVWLKTLWLSFNIWVRVPLTEIHQGDSPFLFRYTLAIMLLAIG
CpxA_E.coli	KKYGRVELVGPFSVRDGEDNYQLYLIRP---ASSQSDFINLLFDRPLLLLIVTMLVSTP
HK853_T.maritima	ETEIFKVL SFLSAVVLENIKLYRELEETYNVNVILNGLPEGIFVYSNGEIKFQNEKFFE
CiaH_S.pneumoniae	VSTNIKYAAVLINTSQLEQASQKHEQLIVVVMASFWILSLLASLYL
EnvZ_E.coli	GAWLFIRIQNRPLVDLEHAALQVGKG-IIPPPLREYGASEVRSVTRAFNHMAAGVKQLAD
CpxA_E.coli	LLLWLAWSLAKPARKLKNADEVAQGNLRQHPELEAGPQEFLAAGASFNQMVTALEMMT
HK853_T.maritima	ENFPDEVLRKAISLSEEAISLRTQVRGEVISGEEFFSITSIPLILGSEVQALTIVENVTE
CiaH_S.pneumoniae	QQ-----SFVENA
EnvZ_E.coli	DR-----TLLMAGV
CpxA_E.coli	SQ-----QRLSDI
HK853_T.maritima	SKELERLKRIDRMKTEFIANI
	H-Box
CiaH_S.pneumoniae	SLEEVNRMRFLTTSLLNLARRDDGKPELAEVPTSFFNTTFTNYEMIASENNRVFRFEN-
EnvZ_E.coli	DIECNAIIEQFIDYLRGTQEMPMEADLNA-----VLGEVIAAESGYEREIETALY
CpxA_E.coli	EAQRLD SMINDLLVMSRNQQKNALVSETIKANQLWSE--VLDNAAFEAEQMGKSLTVNFP
HK853_T.maritima	QSNHLENLLNELDFSRLERKSLQINREKVDLCLVESAVNAIKEFASSHNVNVLFEENV
CiaH_S.pneumoniae	RIHRTIVTDQLLKQLMTILFDNAVKYTEE---DGEIDFLISATDRNLYLLVSDNGIGIS
EnvZ_E.coli	PGSIEVKMHPLSIKRAVANMVVNAARYG-----NGWIKVSSGTEPNRAWFQVEDDGPPIA
CpxA_E.coli	PGPWPLYGNPNALESALENIVRNALRYS-----HTKIEVGFVAVDKDGITITVDDDGPVVS
HK853_T.maritima	PCPVEAYIDPTRIRQVLLNLLNNGVKYSKKDAPDKYVKVILDEKDGGLV IIVEDNGIGIP
	N-Box <span style="float: right;">G1-Box</span>
CiaH_S.pneumoniae	TEDKKKI
EnvZ_E.coli	PEQRKHL
CpxA_E.coli	PEDREQI
HK853_T.maritima	DHAKDRI
	F-Box <span style="float: right;">G2-Box</span>
CiaH_S.pneumoniae	IQTPSKKKK----
EnvZ_E.coli	VPVTRAQGTTKEG
CpxA_E.coli	LYKRS-----
HK853_T.maritima	KDRAGEDNRQDN-

**Abb. 5.2: Sequenzalignment der Histidinkinasen CiaH, EnvZ, CpxA und HK853.** Das Alignment wurde mit Hilfe des Programms ClustalW 1.81 erstellt. Die Aminosäuresequenzen der Histidinkinasen stammen von den Stämmen *S. pneumoniae* R6, *E. coli* K-12 MG1655, und *T. maritima* MSB8. Das multiple Sequenzalignment umfasst CiaH und Histidinkinasen, auf die sich bei der Interpretation der CiaH-Aminosäureaustausche bezogen wurde. Das konservierte Histidin (His226) ist gelb hinterlegt, die durch das Programm TMPred für CiaH errechneten Transmembranbereiche grau. Die Aminosäuren die durch die verschiedenen untersuchten *ciaH*-Allele vermittelt werden, sind rot hinterlegt und durch die jeweilige Allelbezeichnung gekennzeichnet. Die Lage der hochkonservierten Aminosäuren und der Boxen H, N, G1, F und G2 ist angegeben (blau).



Die meisten Mutationen der *ciaH*-Allele führen auf Aminosäureebene zu Veränderungen in unmittelbarer Nähe des konservierten Histidin226 in der DHp-Domäne. Dieser Abschnitt, der auf das besagte Histidin folgt, ist bei den Histidinkinasen EnvZ aus *E. coli* und HK853 aus *Thermotoga maritima* für die spezifische Interaktion mit dem zugehörigen Responseregulator von entscheidender Bedeutung (Tomomori *et al.*, 1999; Skerker *et al.*, 2008; Casino *et al.*, 2009). Auch bei der Dimerisierung der Histidinkinasen spielt er eine Rolle, da in diesem Bereich intermolekulare Kontakte der beiden Monomere stattfinden, die an der Ausbildung des 4-Helix Bundle beteiligt sind (Marina *et al.*, 2005; Albanesi *et al.*, 2009). Des weiteren darf auch die Nähe zum katalytischen Histidin nicht außer Acht gelassen werden, dessen Positionierung bei der Autokinase- und Phosphotransferreaktion entscheidend ist (Marina *et al.*, 2005; Gao und Stock, 2009).

Der Aminosäureaustausch T230P, der durch das *ciaH*-Allel *ciaH306* vermittelt wird, betrifft einen in Histidinkinasen recht gut konservierten Rest. Ein Austausch der korrespondierenden Aminosäuren in den Histidinkinasen EnvZ und CpxA wurde als Phosphatasedefekt beschrieben (Forst und Roberts, 1994; Raivio und Silhavy, 1997). Aufgrund der bereits erwähnten Tatsache, dass die Deletion von *ciaH* in C+Y-Medium nur zu einem etwa 2-fachen Anstieg der CiaR-vermittelten Promotoraktivität führt, während in R6 *ciaH306* eine 10- bis 13-fache Steigerung zu sehen ist (Tab. 4.2), ist davon auszugehen, dass CiaH-T230P Kinaseaktivität besitzen muss. Möglicherweise wird durch die Veränderung in CiaH das Verhältnis von Kinase- zu Phosphataseaktivität zugunsten der Kinasefunktion verschoben.

In R6 *ciaH208* führt der Austausch von Threonin241 zu Prolin zu einem 5- bis 6-fachen Anstieg der CiaR-vermittelten Promotoraktivität (Tab. 4.2). In EnvZ von *E. coli* und HK853 von *T. maritima* wurde die zu Threonin241 von CiaH korrespondierenden Aminosäuren Methionin258 (EnvZ) und Threonin275 (HK853) (Abb. 5.2) mit der selektiven Interaktion der Histidinkinasen mit dem zugehörigen Response Regulator in Verbindung gebracht (Skerker *et al.*, 2008; Casino *et al.*, 2009). Ob die Ursache für die veränderte Aktivität von CiaH-T241P an einer veränderten HK-RR-Interaktion liegt, lässt sich nach momentanem Wissensstand aber nur schwer beurteilen.

Der stärkste aktivierende Effekt in dieser Untersuchung wurde durch das Allel *ciaH102* verursacht. In *ciaH102* wird die polare ungeladene Aminosäure Glutamin236 gegen die basische, also potentiell geladene Aminosäure Lysin ausgetauscht. Geladene Reste können durch elektrostatische Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren die Konformation eines Proteins beeinflussen. Je nachdem welche Aminosäurereste in CiaH von R6 *ciaH102* in direktem Kontakt zu Lysin236 liegen, könnte es zu einer strukturellen Umorientierung

kommen, die die deutlich veränderte katalytische Aktivität von CiaH erklären könnte. Die zu CiaH-Glutamin236 korrespondierende Aminosäure Lysin270 in HK853 von *T. maritima* stabilisiert durch eine Salzbrücke mit einem Glutamat das 4-Helix-Bundle der Dimerinteraktion (Marina *et al.*, 2005). Die Veränderungen in CiaH-Q236K könnten also im Falle einer Dimerisierung möglicherweise die intermolekulare Orientierung der Monomere zueinander beeinflussen.

Es fällt auf, dass zwei der drei durch die *ciaH*-Allele betroffenen Aminosäuren, die in der DHp-Domäne liegen, durch Prolin ausgetauscht werden. Prolin kann aufgrund seiner besonderen Geometrie nicht wie andere Aminosäuren Wasserstoffbrücken ausbilden, die eine  $\alpha$ -Helix stabilisieren. Dies führt für gewöhnlich zu einem Knick der Helix an dieser Stelle (Barlow und Thornton, 1988). Da die DHp-Domäne in der Regel aus  $\alpha$ -helicalen Bereichen besteht (Gao und Stock, 2009), ist es gut vorstellbar, dass die Aminosäureaustausche zu Prolin in CiaH einen deutlichen Effekt auf die Struktur haben. Tatsächlich weist die DHp-Domäne der Histidinkinasen KinB von *Bacillus subtilis* und HK853 bereits natürlicherweise an einem konservierten Prolinrest einen Knick auf (Marina *et al.*, 2005; Bick *et al.*, 2009). Das korrespondierende Prolin bei CiaH (Pro231) folgt unmittelbar auf das Threonin230, das bei R6 *ciaH*306 ebenfalls gegen Prolin ausgetauscht wird. Bei CiaH-T230P liegen also in der DHp-Domäne zwei Proline benachbart, was strukturell sicherlich nicht ohne Folgen bleibt.

Es ist erwähnenswert, dass der besagte konservierte Prolinrest bei der Histidinkinase KinA (Pro410) von *B. subtilis* die Bindung des Inhibitors KipI vermittelt (Jacques *et al.*, 2008). KipI zeigt Ähnlichkeit zu Peptidyl-Prolylisomerasen, weshalb Jacques *et al.* die Idee diskutieren, wonach es durch *cis-trans* Isomerisierung des konservierten Prolins zu Konformationsänderungen der DHp-Domäne kommen könnte, die die Aktivität von KinA beeinflussen. Dies wäre ein möglicher neuer Regulationsmechanismus von Histidinkinasen. Auch im Regulon von CiaR gibt es ein Gen, *ppmA*, dessen Genprodukt Homologie zu Peptidyl-Prolylisomerasen aufweist (Overweg *et al.*, 2000; Hermans *et al.*, 2006). Allerdings ist PpmA in *S. pneumoniae* an der Zelloberfläche lokalisiert, während die DHp-Domäne von CiaH im Cytoplasma liegt. Dennoch kann bei CiaH eine vergleichbare Regulation wie bei KinB nicht ausgeschlossen werden, was die durch die Mutationen in *ciaH* verursachten Veränderungen der DHp-Domäne rund um den konservierten Prolinrest in ein neues Licht rückt.

Wie bereits erwähnt, führt die Mutation des *ciaH*-Allels *ciaH102* zu einer sehr starken Erhöhung der CiaR-Aktivität (um das 24- bis 26-fache; Tab. 4.2). Das Allel *ciaH202* besitzt nun neben der Mutation von *ciaH102* noch eine zusätzliche Mutation (G1247A), die den Aminosäureaustausch A413T am Ende der CA-Domäne bewirkt. Überraschenderweise zeigten die Untersuchungen, dass das Allel *ciaH202* eine weitaus geringere Aktivierung des CiaRH-Systems bewirkt (14- bis 15-fach; Tab. 4.2), als sein „Vorgänger“ *ciaH102*. Um dem Ursprung dieses Aktivitätsabfalls auf den Grund zu gehen, wurde die Zusatzmutation von *ciaH202* isoliert untersucht. Das *ciaH*-Allel, das nur den Nucleotidaustausch G1237A von *ciaH202* trägt, wurde als *ciaH202s* bezeichnet. Die Untersuchungen zeigten, dass dieses Allel zu einer Reduktion der CiaR-Aktivität auf die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp führt (Tab. 4.2). Gemeinsam mit der stark aktivierenden Mutation von *ciaH102* führt also die inhibierende Mutation von *ciaH202s* zu dem mittelstarken Aktivierungsniveau von *ciaH202*. Auf welche Art und Weise der Aminosäureaustausch A413T in CiaH die Reduktion der CiaR-Aktivität bewirkt, ob über eine Steigerung der Phosphatase- oder eine Inhibierung der Kinaseaktivität, ist unklar.

Erstaunlich ist, dass *ciaH202* nach der Selektion des Stamms R6 C102 (mit dem *ciaH*-Allel *ciaH102*) auf erhöhte  $\beta$ -Lactam-Konzentrationen isoliert wurde. Das heißt, dass trotz Selektionsdruck eine Zusatzmutation entstand, die offensichtlich wieder zu einer Reduktion der CiaR-Aktivität führte. Die Erklärung hierfür liegt höchstwahrscheinlich in der Instabilität von stark aktivierenden *ciaH*-Allelen begründet (vgl. Kap. 4.1.1). Offensichtlich haben Bakterien mit einem zu stark aktivierten CiaRH-System immense Nachteile gegenüber Spontanmutanten, die die Aktivität des Systems wieder reduzieren (Pseudorevertanten). Ebenso zeigt *S. pneumoniae* bei inaktiviertem CiaRH-System eine besondere Empfindlichkeit gegenüber nicht-optimalen Wachstumsbedingungen (Sebert *et al.*, 2002; Tsui *et al.*, 2010). Wie es scheint ist die Aufrechterhaltung eines bestimmten Aktivitätslevels des CiaRH-Systems für die Zelle von großer Bedeutung und jedes zu starke Über- und Unterschreiten hat schwere physiologische Folgen, wie man beispielsweise an dem beeinträchtigten Wachstum erkennen kann (Kap. 4.1.4). Da *ciaH202* das CiaRH-System nach wie vor aktiviert, dies jedoch in einem moderateren Maß als *ciaH102*, zeigen Mutanten mit diesem Allel eine erhöhte  $\beta$ -Lactamresistenz im Vergleich zum Wildtyp bei gleichzeitig besserer Fitness als ein Stamm mit dem Allel *ciaH102*.

In dieser Arbeit wurden nur *ciaH*-Mutationen aus Stämmen untersucht, die durch künstliche Antibiotika-Selektion im Labor entstanden sind. Jedoch zeigen neuere Untersuchungen, dass

auch in natürlicher Umgebung aktivierende Mutationen in *ciaH* vorkommen. So wurde kürzlich in einem klinischen *S. pneumoniae*-Isolat eine Punktmutation in *ciaH* entdeckt, die ihrem Träger einen selektiven Vorteil bei der Toleranz gegen das Antibiotikum Vancomycin verschafft (Moscoso *et al.*, 2010). Weiterführende Untersuchungen dieses *ciaH*-Allels haben gezeigt, dass die Punktmutation die Aktivität von CiaRH um ca. das 2-fache erhöht (Marx P., persönliche Mitteilung). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die Aktivierung von CiaRH nicht nur unter Laborbedingungen, sondern auch im klinischen Bereich eine Rolle bei der Resistenz bzw. Toleranz von *S. pneumoniae* gegen bestimmte Antibiotika spielen könnte.

---

## 5.2 Der inhibierende Effekt von HtrA auf die Aktivität des TCS CiaRH

In *S. pneumoniae* steht die Expression des Gens *htrA*, welches für ein Protein der HtrA-Serinprotease-Familie codiert, unter der Kontrolle von CiaRH und zählt zu den am stärksten CiaR-abhängigen Genen des Regulons (Halfmann *et al.*, 2007b). Proteine der HtrA-Familie sind weit verbreitet und kommen in Gram-positiven und -negativen Bakterien ebenso vor, wie in Eukaryonten (Kim und Kim, 2005). HtrA-Homologe besitzen eine ATP-unabhängige Proteaseaktivität, fungieren aber auch als Chaperon (Spiess *et al.*, 1999). In vielen Fällen übernehmen HtrA-Proteine die Aufgabe der Proteinqualitätskontrolle und sind daher unter Stressbedingungen, welche die Bildung von falsch oder unvollständig gefalteten Proteinen fördern, bedeutsam. Neben ihrer Rolle bei der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase gibt es in einigen Bakterien Hinweise auf eine Beteiligung von HtrA an der Proteinprozessierung (Cavard *et al.*, 1989; Poquet *et al.*, 2000), der Virulenz (Jones *et al.*, 2001; Ibrahim *et al.*, 2004a) und der Kompetenz (Ibrahim *et al.*, 2004b; Sebert *et al.*, 2005). Eine interessante physiologische Funktion von HtrA ist die Beteiligung an zellulären Regulationsmechanismen. So spielt in *E. coli* das HtrA-Homolog DegP eine Rolle bei der Regulation bzw. der Kontrolle der Aktivität des TCS CpxAR (Isaac *et al.*, 2005). DegP ist selbst Teil des CpxR-Regulons und vermittelt gemeinsam mit dem Adaptorprotein CpxP, das ebenfalls unter der Kontrolle des RR CpxR steht, die Aktivierung von CpxAR in Anwesenheit aggregierter Proteine. CpxP bindet normalerweise als Inhibitor an die Histidinkinase CpxA. Erhöht sich aufgrund von Stressbedingungen die Konzentration an aggregierten Proteinen im Periplasma, so löst sich CpxP von CpxA und bindet stattdessen an die Proteinaggregate. Der CpxP-Aggregat-Komplex wird daraufhin durch DegP abgebaut. Dieser Regulationsmechanismus führt bei Abwesenheit des Stimulus wieder zu einer schnellen Abschaltung von CpxAR. DegP und CpxP sind Beispiele für Genprodukte eines Regulons, welche die Aktivität des eigenen Regulators beeinflussen.

Wie in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, gibt es offensichtlich auch bei CiaRH einen komplexen Regulationsmechanismus, an dem Genprodukte des eigenen Regulons, darunter HtrA, beteiligt sind. Bei der Untersuchung von Deletionen der Gene des CiaR-Regulons in *S. pneumoniae* zeigten drei Gene bzw. Gengruppen einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität CiaR-abhängiger Promotoren (Tab. 4.6). Die Deletionen der Gene von HtrA, sowie den 5 csRNAs und dem Phosphotransferasesystem (PTS) ManLMN führten

zu einem Anstieg der CiaR-vermittelten Genexpression. Dabei zeigt das Fehlen von HtrA den deutlichsten Effekt, eine etwa 4-fach erhöhte Aktivität von  $P_{HtrA}$  und  $P_{spr0931}$ . Nachfolgende Untersuchungen, die die erhöhte Expression weiterer CiaR-kontrollierter Promotoren in Abwesenheit von HtrA zeigten, bestätigten die Annahme, dass HtrA offensichtlich einen regulatorischen Effekt auf das gesamte CiaRH-System hat, ähnlich wie DegP auf CpxR. Einen entscheidenden Unterschied zwischen der Regulation von DegP/CpxAR und HtrA/CiaRH gibt es jedoch: Während DegP einen positiven Einfluss auf die Aktivität von CpxAR hat (Buelow und Raivio, 2005), scheint HtrA CiaRH zu inhibieren. Dies wurde auch durch die Beobachtung bestätigt, dass in einem Stamm mit überexprimiertem HtrA die Menge an Cia-regulierten csRNAs im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert war. Das CiaRH-System ist somit nicht nur in Abwesenheit von HtrA stärker aktiviert, eine erhöhte Menge an HtrA führt offenbar auch zu einer Repression des CiaR-Regulons. Ein ähnlicher Regulationsmechanismus wie bei CpxAR scheint daher bei CiaRH eher unwahrscheinlich, zumal weder ein CpxP-Homolog im CiaR-Regulon zu finden ist, noch die Bindung eines Inhibitors an CiaH bekannt ist. HtrA beeinflusst daher die Aktivität von CiaRH offenbar auf andere Weise. Im Folgenden werden anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche und der aktuellen Kenntnisse über die Regulation von Zweikomponentensystemen mögliche Regulationswege diskutiert.

### 5.2.1 Die Rolle der Histidinkinase CiaH

HtrA in *S. pneumoniae* ist, wie sein Homolog DegP in *E. coli* auch, an der Zelloberfläche lokalisiert (Sebert *et al.*, 2005). Bei DegP von *E. coli* wird der Export durch die Membran vermutlich durch ein N-terminales Signalpeptid initiiert, das anschließend abgespalten wird (Lipinska *et al.*, 1990; Jomaa *et al.*, 2009). Dagegen wird für HtrA in Gram-positiven Bakterien ein N-terminaler Membrananker postuliert (Jones *et al.*, 2001; Kim und Kim, 2005), wobei es auch bioinformatische Hinweise gibt, die bei HtrA von *S. pneumoniae* ebenfalls auf ein Signalpeptid hindeuten (Sebert *et al.*, 2005). Aufgrund seiner externen Lokalisation lag die Vermutung nahe, dass HtrA direkt mit der membranständigen Histidinkinase CiaH in Wechselwirkung treten könnte und dadurch einen inhibitorischen Einfluss auf die Phosphorylierung von CiaR ausübt. Dies ließ sich jedoch nicht bestätigen. So zeigte sich auch in Abwesenheit von CiaH ein HtrA-abhängiger Effekt auf die Aktivität der CiaR-regulierten Promotoren (Tab. 4.7). Der Einfluss von HtrA auf den Responseregulator

CiaR wird also ohne die Beteiligung der Histidinkinase CiaH vermittelt. Auch wenn die Regulation der CiaR-Aktivität durch CiaH auf der einen Seite und HtrA auf der anderen unabhängig voneinander geschieht, scheinen sie sich trotzdem gegenseitig zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass es in einem CiaRH-System, welches durch ein verändertes CiaH bereits aktiviert vorliegt, zu keiner zusätzlichen Aktivierung beim Fehlen von HtrA kommt. Möglicherweise kann der aktivierende Effekt bei Abwesenheit von HtrA nicht über einen bestimmten Aktivierungsstatus von CiaR hinausgehen.

Da der Einfluss von HtrA auf die Aktivität von CiaR nicht über CiaH vermittelt wird und CiaR im Cytoplasma lokalisiert und somit räumlich von HtrA getrennt ist, kann eine direkte Interaktion von HtrA mit CiaRH nahezu ausgeschlossen werden.

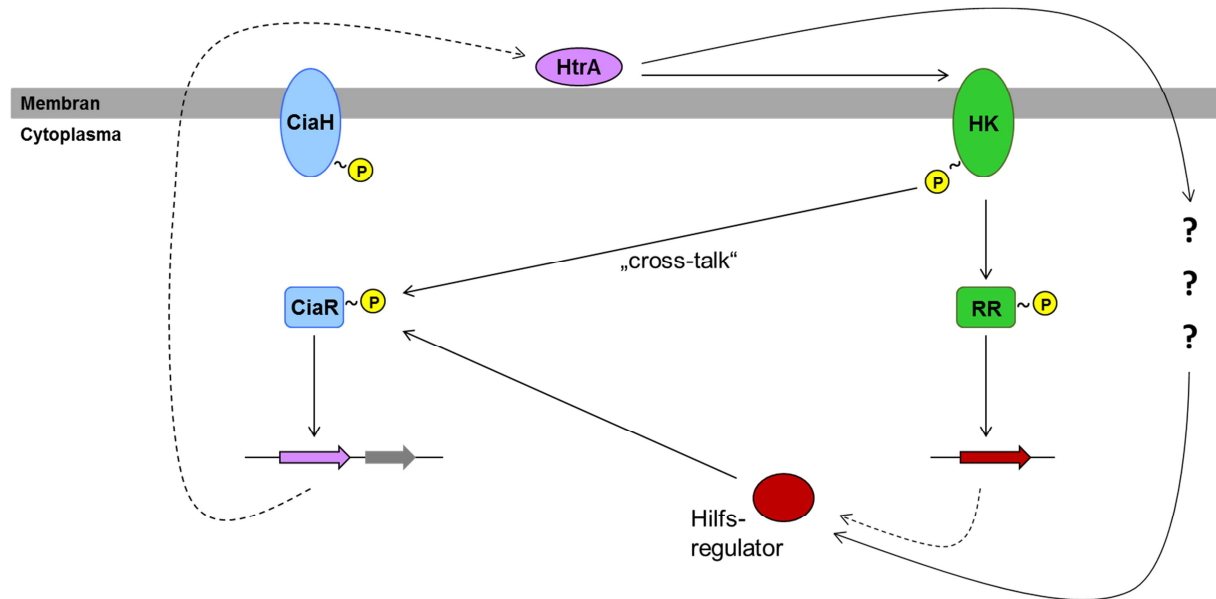
### 5.2.2 Wie kann HtrA auf CiaR wirken?

Wie bereits diskutiert wurde, ist eine direkte Interaktion zwischen HtrA und dem CiaRH-System recht unwahrscheinlich. Auf irgendeine Art und Weise muss jedoch die Abwesenheit von HtrA außerhalb der Zelle an das intrazellulär lokalisierte CiaR vermittelt werden. Für eine indirekte Art der Regulation von CiaR durch HtrA gibt es verschiedene Möglichkeiten (Abb. 5.3).

Im einfachsten Fall könnte HtrA die Aktivität eines anderen Zweikomponentensystems von *S. pneumoniae* beeinflussen, welches dann mit CiaR wechselwirkt. Dies kann beispielsweise über sogenannten „cross-talk“ stattfinden, also durch die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von CiaR durch eine fremde Histidinkinase (Ninfa *et al.*, 1988; Alves und Savageau, 2003). „Cross-talk“ von CiaRH mit anderen Zweikomponentensystemen konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Allerdings gibt es Hinweise auf eine mögliche regulatorische Verknüpfung von TCS03, TCS12 und TCS13 mit CiaRH (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Heintz, 2006; Dawid *et al.*, 2009). TCS03 zeigt Homologie zu dem TCS LiaRS aus *Bacillus subtilis* und ist bei der Detektion und dem Schutz vor Zellwandstress von Bedeutung (Eldholm *et al.*, 2010). TCS12 (ComDE) ist die zentrale Komponente im autokatalytischen Loop der Kompetenzinduktion (Claverys und Håvarstein, 2002). TCS13 ist funktionell ähnlich zu TCS12 und induziert bei Anwesenheit seines Peptidstimulus die Expression eines Bacteriocinclusters (Lux *et al.*, 2007). Eine direkte Interaktion zwischen CiaRH und den TCS03, -12 und -13 wurde bislang jedoch nicht nachgewiesen. Da bei „cross-

talk“ ein nicht-korrespondierendes Histidinkinase-Responseregulatorpaar miteinander interagieren muss, ist es wahrscheinlich, dass dieser Vorgang eher zwischen einander ähnlichen Zweikomponentensystemen stattfindet. Von den 13 Zweikomponentensystemen in *S. pneumoniae* (Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000) weisen TCS02 und TCS04 bei Sequenzvergleich die höchste Ähnlichkeit zu CiaRH auf. TCS02 (WalRK, YycFG) spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Mureinbiosynthese-, Zellteilungs- und Oberflächenproteinen und sein Responseregulator WalR ist der einzige essentielle RR von *S. pneumoniae* (Ng *et al.*, 2005). TCS04 (PnpRS) hat einen Einfluss auf die Virulenz und Stressresistenz von *S. pneumoniae* (McCluskey *et al.*, 2004). Alle hier genannten Zweikomponentensysteme sind wie CiaRH an Phänotypen beteiligt, die die Integrität der Zellhülle betreffen, was eine Verknüpfung der Regulationspfade zwar nicht zwangsweise wahrscheinlich macht, aber für die Zelle zumindest physiologisch sinnvoll sein könnte. Ob Phosphotransferereignisse von fremden Histidinkinasen auf CiaR theoretisch möglich sind, könnte man beispielsweise *in vitro* in sogenannten „Phosphotransfer Profiling“ überprüfen (Laub *et al.*, 2007). In der Regel ist die Interaktion der Histidinkinase mit ihrem Partner-Responseregulator äußerst spezifisch und „cross-talk“ mit fremden Responseregulatoren daher sehr selten (Laub und Goulian, 2007). *In vitro*-Untersuchungen der TCS von *E. coli* haben bei 692 möglichen HK-RR-Paaren nur bei 3 % „cross-talk“ festgestellt, was in Anbetracht der hohen Ähnlichkeit der TCS untereinander erstaunlich wenig ist (Yamamoto *et al.*, 2005). Bislang wurde „cross-talk“ *in vivo* nur in Abwesenheit der Partner-HK und -RR festgestellt. Es wird diskutiert, ob „cross-talk“-Phosphorylierungsereignisse *in vivo* nicht so langsam von statten gehen, dass das Phosphat direkt wieder durch die bifunktionale Partner-Histidinkinase entfernt wird (Groban *et al.*, 2009). Daher ist es sogar unklar, ob „cross-talk“ tatsächlich eine physiologische Funktion hat. Im Falle der CiaR-Regulation durch HtrA ist die Veränderung der CiaR-Aktivität auch in Anwesenheit der Partner-Histidinkinase CiaH sehr deutlich erkennbar. In Anbetracht der Tatsache, dass CiaH offenbar sowohl Phosphatase-, als auch Kinaseaktivität besitzt (Halfmann *et al.*, 2011), erscheint es eher unwahrscheinlich, dass der Phosphorylierungsstatus von CiaR effektiv durch eine fremde Histidinkinase beeinflusst wird.





**Abb. 5.3: Schematisches Modell für die mögliche regulatorische Verbindung zwischen HtrA und CiaRH.** Die extrazelluläre, membranassoziierte Serinprotease HtrA (lila) interagiert über ein anderes Zweikomponentensystem (grün) oder über einen unbekanntem Regulationsweg mit dem Response Regulator CiaR. Unterbrochene Pfeile symbolisieren die Genexpression, durchgehende Pfeile stellen die Interaktionen dar. Da HtrA einen reduzierenden Effekt auf die CiaR-Aktivität ausübt, jedoch unklar ist, in welchem Interaktionsschritt eine negative Regulation stattfindet, stehen die Pfeile sowohl für eine mögliche positive, als auch negative Wirkung. HK = Histidinkinase; RR = Responseregulator; P = Phosphat

Außer durch „cross-talk“ können Zweikomponentensysteme auch auf einem anderen Weg regulatorisch verknüpft werden, durch sogenannte TCS-„connectors“ oder Hilfsregulatoren („auxiliary regulators“). Hilfsregulatoren sind Proteine, die die Aktivität von Sensorkinasen oder Responseregulatoren posttranskriptionell verändern und deren Expression selbst unter der Kontrolle eines anderen Regulationssystems, z. B. eines anderen Zwei-Komponentensystems, steht (Mitrophanov und Groisman, 2008). Ein Beispiel für einen Hilfsregulator, der zwei TCS regulatorisch verknüpft, ist PmrD von *Salmonella enterica*. Die Expression von PmrD steht unter der Kontrolle des TCS PhoPQ, welches niedrige  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen detektiert. PmrD aktiviert das TCS PmrAB, indem es die Dephosphorylierung des RR PmrA verhindert (Kato und Groisman, 2004). Bei der Aktivierung von PhoPQ durch einen Stimulus (wenig  $Mg^{2+}$ ) wird also durch die Vermittlung von PmrD auch das TCS PmrAB aktiviert.

Für die indirekte Beeinflussung von CiaRH durch HtrA über ein fremdes TCS wäre es also denkbar, dass HtrA die Aktivität der fremden Histidinkinase beeinflusst, z.B. indem es durch seine proteolytische Aktivität einen für die Aktivierung wichtigen Faktor abbaut. So käme es in Abwesenheit von HtrA zu einer Aktivierung der Histidinkinase, was sich dann in der Expression eines Hilfsregulators, der die Aktivität von CiaR moduliert, äußern könnte. Ob

tatsächlich ein anderes Zweikomponentensystem in *S. pneumoniae* die Stimulation von CiaR in Abwesenheit von HtrA vermittelt, könnte *in vivo* durch Untersuchung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität bei kombinierter Deletion von *htrA* und dem jeweiligen Histidinkinasegen festgestellt werden.

Die Inhibierung von CiaR durch HtrA muss jedoch nicht zwangsweise von einem anderen Zweikomponentensystem vermittelt werden. TCS-„connectors“ oder Hilfsregulatoren verbinden nicht nur zwei TCS, sondern können auch der Kontrolle anderer Regulationswege unterliegen. Es gibt viele verschiedene Beispiele von Hilfsregulatoren welche die Aktivität eines Zweikomponentensystems in Abhängigkeit von Nährstoffbedingungen, Wachstumsphasen, Stresssituationen etc. modulieren (Mitrophanov und Groisman, 2008; Buelow und Raivio, 2010). Die Möglichkeiten, wie HtrA indirekt Einfluss auf die Aktivität von CiaR nehmen könnte, sind also entsprechend vielfältig.

### 5.2.3 Wie wird die Aktivität von CiaR verändert?

Während durch „cross-talk“ speziell der Phosphorylierungsstatus des Responseregulators beeinflusst wird, ist die Art und Weise der Regulation eines TCS durch Hilfsregulatoren sehr variabel. So kann die Regulation sowohl die Aktivität der Histidinkinase, als auch die des Responseregulators direkt beeinflussen. Hilfsregulatoren können beispielsweise den RR dephosphorylieren (Perego und Brannigan, 2001), vor Dephosphorylierung schützen (Kato und Groisman, 2004) oder dessen Bindung an die DNA verhindern (Core und Perego, 2003). Es gibt sogar Hilfsregulatoren, die die Interaktion zwischen Responseregulator und RNA-Polymerase inhibieren und so die Transkriptionsinitiation unterbinden (Nakano *et al.*, 2003; Ansaldi *et al.*, 2004).

Bei CiaRH deutet alles darauf hin, dass die Regulation durch HtrA nicht die Histidinkinase CiaH betrifft, sondern nur auf den Responseregulator CiaR wirkt. Ob diese Regulation der CiaR-Aktivität durch eine Veränderung im Phosphorylierungsstatus, in der Transkriptionsinitiation oder schlicht in der Menge von CiaR-Molekülen hervorgerufen wird, ist bislang ungeklärt. Es gibt Hinweise, dass eine Steigerung der CiaR-Menge bei gleichbleibender CiaH-Menge zu einer Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotorregulation führen kann (Schultchen-Kamb S., persönliche Mitteilung). Western Immunoblots mit CiaR-Antikörpern in dieser Arbeit haben zudem gezeigt, dass im Stamm ohne HtrA die CiaR-

Menge im Vergleich zum Wildtyp sehr stark erhöht ist, während sie im Stamm mit überexprimiertem HtrA reduziert zu sein scheint (Abb. 4.19). Auch wenn diese Beobachtung im ersten Moment darauf hindeutet, dass HtrA tatsächlich die Menge an CiaR-Molekülen beeinflusst, so darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei CiaRH um ein autoregulierte System handelt. Dadurch, dass das *ciaRH*-Operon selbst Teil des CiaR-Regulons ist, führt jegliche Aktivierung von CiaR unweigerlich zu einer erhöhten Expression und damit vermutlich auch zu einer erhöhten Molekülmenge von CiaR und CiaH. Bestätigt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass auch im Stamm mit aktiviertem CiaH (R6 *ciaH306*) die CiaR-Menge im Vergleich zum Wildtyp sehr stark erhöht ist. Die Herstellung eines *S. pneumoniae*-Stammes, bei dem die Autoregulation von *ciaRH* unterbunden ist, könnte hier Klarheit schaffen.  $P_{ciaR}$  wird zwar durch CiaR reguliert, weist aber auch in Abwesenheit von CiaR eine hohe Basalaktivität auf (Halfmann *et al.*, 2007b). Es könnte daher durch Mutagenese der CiaR-Bindestelle vor *ciaRH* eventuell möglich sein, die Autoregulation zu unterbinden und gleichzeitig die Basalexpression von *ciaRH* aufrechtzuerhalten. Eine Untersuchung der CiaR-Menge in Abhängigkeit von HtrA in diesem Stamm, könnte die Frage klären, ob der HtrA-Effekt auf eine Degradierung von CiaR zurückgeht oder nicht.

Beim Betrachten der CiaR-Menge im Stamm ohne HtrA fällt zudem auf, dass sie nicht sonderlich gut mit den beobachteten Aktivierungen der Promotoraktivitäten korreliert. So führt das Fehlen von HtrA nur zu einer etwa 2-fach erhöhten Aktivität des Promotors  $P_{ciaR}$ , während die Menge an CiaR selbst deutlich stärker erhöht zu sein scheint. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in R6 *htrA::aphIII* die CiaR-Konzentration in der Zelle zwar recht hoch, CiaR aber gleichzeitig nicht sonderlich aktiv ist. Gegen diese These spricht allerdings die in dem Stamm ebenfalls sehr hohe Konzentration an csRNAs, deren Expression von CiaR abhängt. Die csRNA-Menge in R6 *htrA::aphIII* übertrifft sogar die des Stamms R6 *ciaH306*, in dem die CiaR-abhängigen Promotoren eigentlich noch viel stärker aktiviert sind. Insgesamt sind diese Ergebnisse schwer zu interpretieren und bedürfen weiterer Untersuchungen. So könnte eine Verdünnungsreihe bei dem Western und Northern Blot dabei helfen die genauen Mengenverhältnisse von CiaR und den csRNAs in den verschiedenen Stämmen besser wiederzugeben und somit möglicherweise doch mit den Promotoraktivitäten in Einklang zu bringen.

### 5.2.4 Protease- oder Chaperonaktivität?

In einigen Bakterien konnte gezeigt werden, dass es sich bei HtrA um ein bifunktionales Enzym handelt, das sowohl Protease-, als auch Chaperonfunktion besitzt (Spiess *et al.*, 1999; Bæk *et al.*, 2011). Diese Arbeit liefert nun erste Hinweise darauf, welche Rolle Protease- und Chaperonaktivität von HtrA in *S. pneumoniae* für die regulatorische Funktion auf CiaRH spielen. In HtrA-Homologen anderer Bakterien wurde gezeigt, dass der Austausch des für die Proteaseaktivität essentiellen katalytischen Serins gegen Alanin den Verlust der Protease-, bei Aufrechterhaltung der Chaperonaktivität zur Folge hat. In HtrA von *S. pneumoniae* führt diese Substitution (S234A) zu einer Aktivierung des CiaRH-Systems, die allerdings geringer ausgeprägt ist als beim kompletten Fehlen von HtrA (Tab. 4.4). Es scheint also, als ob proteolytisch inaktives HtrA nicht mehr die gleiche inhibierende Wirkung auf CiaRH hat, wie Wildtyp-HtrA. Zu einer kompletten Aufhebung der Inhibition, wie beim Fehlen von HtrA, kommt es jedoch nicht. Möglicherweise kann die Chaperonaktivität von HtrA die Rolle der Proteaseaktivität teilweise übernehmen und somit zur Inhibition von CiaR beitragen. Es kann natürlich auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Chaperonaktivität von HtrA die entscheidende Funktion für die Inhibition von CiaR darstellt und die erhöhte CiaR-Aktivität auf eine Destabilisierung von HtrA durch den Aminosäureaustausch zurückzuführen ist.

In *S. pyogenes* ist HtrA direkt oder indirekt an der Prozessierung der Virulenzfaktoren SpeB und SLS beteiligt (Cole *et al.*, 2007), in *Lactococcus lactis* führt es zur Prozessierung bzw. Reifung der Nuclease NucA und des Autolysins AcmA (Poquet *et al.*, 2000) und in *E. coli* wurde das Colicin A Lyseprotein (Cal) und die  $\alpha$ -Amylase MalS als natürliche Substrate von DegP identifiziert (Cavard *et al.*, 1989; Spiess *et al.*, 1999). Natürliche Substrate von HtrA in *S. pneumoniae* sind bislang unbekannt. Möglicherweise besitzt HtrA hier, wie in anderen Bakterien auch, keine enge Substratspezifität und degradiert oder repariert teilweise entfaltete Proteine (Kolmar *et al.*, 1996). Von dieser Seite aus gibt es daher bislang keinen Hinweis auf einen Regulationsweg, in dem HtrA einen wichtigen Platz einnimmt und über den die Veränderung der CiaRH-Aktivität vermittelt werden könnte.

### 5.2.5 Gibt es einen Zusammenhang mit anderen regulatorischen Einflüssen?

Von den in dieser Arbeit untersuchten Gendeletionen des CiaR-Regulons führte neben  $\Delta htrA$  auch  $\Delta ccnA-E$  und  $\Delta manLMN$  zu einer Aktivierung des CiaRH-Systems. Auch wenn diese Aktivierungsstärken geringer ausfielen als bei  $\Delta htrA$ , lagen sie dennoch in der selben Größenordnung. Bislang ist unklar, ob alle drei Gene bzw. Genklassen das CiaRH-System über den gleichen Regulationsweg beeinflussen. Bekannt ist, dass *htrA* und *ccnA-E* nachweislich an der Regulation der Kompetenz in *S. pneumoniae* beteiligt sind (diese Arbeit; Sebert *et al.*, 2005; Tsui *et al.*, 2010), und auch für das Mannose-PTS gibt es in anderen Streptokokken Hinweise darauf, dass eine mögliche Verbindung zur Kompetenz besteht (Abranches *et al.*, 2006). Aufgrund dieses möglichen Zusammenhangs wurde vermutet, dass der regulatorische Einfluss der verschiedenen Deletionen auf CiaRH möglicherweise indirekt über eine Veränderung des Kompetenzstatus in den Deletionsstämmen vermittelt wird. Gestützt wurde diese Vermutung durch Ergebnisse aus früheren Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass die Kompetenz seinerseits den Aktivierungsstatus von CiaRH beeinflussen kann. So gehört CiaRH zu den sogenannten „delayed CSP-induced genes“ (Peterson *et al.*, 2004), einer Gruppe von Genen, deren Expression nach Induktion der Kompetenz durch CSP kontinuierlich und moderat ansteigt. Im Falle des HtrA-Effekts sind Veränderungen der Kompetenz aber offenbar nicht der Auslöser für Veränderungen der CiaRH-Aktivität. Wie die Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt haben, kommt es auch bei Stämmen, deren Kompetenz durch genetische Veränderungen komplett blockiert ist, in Abwesenheit von HtrA zu einer Induktion der CiaR-Aktivität (Tab. 4.10). Dies bedeutet, dass der Effekt von HtrA auf CiaRH offenbar kompetenzunabhängig ist. In den Untersuchungen hat sich jedoch auch bestätigt, dass die Kompetenz *per se* tatsächlich einen Einfluss auf den Aktivierungsstatus von CiaRH hat. In den Stämmen, in denen die Kompetenzinduktion durch Deletion des Zwei-Komponentensystems ComDE oder des ABC-Transporters ComAB unterbunden wird, ist die Promotoraktivität der CiaR-abhängigen Promotoren  $P_{htrA}$  und  $P_{spr0931}$  im Vergleich zum Wildtyp auf weniger als die Hälfte reduziert. Demnach wirkt sich die Unterdrückung der Kompetenz negativ auf CiaRH-Aktivität aus. Diese Beobachtung ist insofern interessant, als dass es bei Stämmen mit stark aktiviertem CiaRH-System, wie beispielsweise bei den in dieser Arbeit beschriebenen *ciaH*-Allelen, ebenfalls zu einem Kompetenzblock kommt. Ob die dort gemessene Aktivität des CiaRH-Systems bereits durch das Feedback der Kompetenz herunterreguliert ist, oder ob die Regulation von CiaRH durch die Kompetenz unter diesen

Bedingungen nicht zum Tragen kommt, müssten weiterführende Untersuchungen klären. So könnte beispielsweise die Aktivität des CiaRH-Systems im Stamm R6 *ciaH202 ΔccnCDEAB* untersucht werden, einem Stamm, der ein aktivierendes *ciaH*-Allel besitzt, aber gleichzeitig durch die Deletion der fünf csRNA-Gene eine vergleichbare Kompetenz wie der Wildtyp entwickelt (Abb. 4.4).

Es ist bekannt, dass das Wachstumsmedium in dem *S. pneumoniae* kultiviert wird, einen Einfluss auf die Funktionalität des CiaRH-Systems hat. So zeigt sich in Medien wie THB oder BHI eine erhöhte Aktivierung der CiaR-abhängigen Promotoren im Vergleich zu C+Y-Medium (Halfmann *et al.*, 2011). Und auch die enzymatische Funktion der Histidinkinase CiaH scheint sich zu unterscheiden und je nach Medium mal als Phosphatase (C+Y-Medium), mal als Kinase (THB; BHI) von Bedeutung zu sein. Ebenso wurde für CiaR die CiaH-unabhängige Phosphorylierung durch energiereiche kleine metabolische Zwischenprodukte wie Acetyl-Phosphat diskutiert, welche eine regulatorische Verbindung zwischen Zweikomponentensystemen und dem Stoffwechsel bzw. den Nährstoffbedingungen darstellen (Wolfe, 2005; Wolfe, 2010). Da die Wachstumsbedingungen für die Regulation von CiaRH offenbar von großer Bedeutung sind, wurde im Zuge dieser Arbeit untersucht, ob der negative Effekt von HtrA ebenfalls medienabhängig ist und damit einen Hinweis auf seine Funktionsweise liefert. Das Fehlen von HtrA führte jedoch in THB zu einer ebenso deutlichen Aktivierung des CiaRH-Systems wie in C+Y-Medium. Trotz der deutlichen Unterschiede des Kompetenzphänotyps oder in der Funktion der Histidinkinase CiaH in den beiden Medien, scheint also die CiaRH-Regulation durch HtrA von den Medien-Unterschieden nicht betroffen zu sein. Es lässt sich jedoch trotz allem nicht ganz ausschließen, dass HtrA über Veränderungen des Stoffwechsels die Aktivität von CiaRH beeinflusst, auch wenn diese ersten Versuche keine Hinweise darauf geliefert haben.

Vor kurzem wurde beobachtet, dass Acetat, ein Molekül, das im Phosphotransacetylase(Pta)-Acetatkinase(AckA)-Stoffwechselweg von *S. pneumoniae* entsteht, ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des CiaRH-Systems hat (Günzler, 2010). Gegen einen direkten Zusammenhang zwischen der Inhibition durch HtrA und durch Acetat spricht jedoch die starke CiaH-Abhängigkeit des Acetat-Effekts. In Abwesenheit von CiaH führt die Steigerung der Acetatkonzentration im Medium nicht mehr zu einer Repression, sondern sogar zu einem deutlichen Anstieg der CiaRH-Aktivität, während der HtrA-Effekt auch bei fehlender Histidinkinase als Inhibition bestehen bleibt.

---

Eine Veränderung der Kompetenz scheint nicht die Ursache für die Inhibition durch HtrA zu sein. Ebenso wenig lieferte die Untersuchung der *htrA*-Deletion in einem anderen Medium Hinweise auf einen gemeinsamen Regulationsweg. Es ist also nach wie vor unklar, wie genau die Abwesenheit von HtrA zu der Veränderung der CiaR-Aktivität führt.

### 5.2.6 Die physiologische Funktion

Bei der Regulation von CiaRH durch HtrA handelt es sich offenbar um eine Art negativer Feedback-loop. Dabei führt die Reduktion der HtrA-Menge zu einer Aktivierung des regulatorischen Systems, das die Expression von *htrA* selbst kontrolliert. Feedback-loops bei der Regulation von Zweikomponentensystemen durch Hilfsregulatoren kommen häufig vor und können einen Effekt auf die Geschwindigkeit und Stärke der Antwort haben (Mitrophanov und Groisman, 2008). Außerdem bietet ein komplexer Regulationsweg seinerseits viele Möglichkeiten für die Zelle, weitere Regulationsfaktoren und -wege zu integrieren.

HtrA ist in *S. pneumoniae*, wie auch in anderen Gram positiven Bakterien, wichtig für das Wachstum unter Stressbedingungen wie hohe Temperaturen, oxidativer Stress oder bei der Besiedlung eines Wirtsorganismus‘ (Jones *et al.*, 2001; Ibrahim *et al.*, 2004a). Daher wäre es durchaus möglich, dass die Regulation der CiaR-Aktivität durch HtrA dazu dient, eine bestimmte HtrA-Konzentration in der Zelle sicher zu stellen. Bedenkt man jedoch, dass es sich bei der hier beschriebenen Art der Regulation nicht um eine einfache, direkte Interaktion mit CiaRH handelt, sondern offenbar um einen komplexeren Regulationsweg, der eine unbekannte Anzahl von weiteren Komponenten einschließt, erscheint es eher weniger wahrscheinlich, dass es sich ausschließlich um ein Mittel zur Aufrechterhaltung der Homöostase eines einzigen Proteins handelt.

Eine weitere mögliche Bedeutung der Regulation ergibt sich aus phänotypischen Untersuchungen an Stämmen mit verändertem CiaRH-System. So kann beobachtet werden, dass sich sowohl die Inaktivierung des CiaRH-Systems durch Deletion von *ciaR*, als auch die starke Aktivierung durch verschiedene *ciaH*-Allele negativ auf das Wachstum unter bestimmten Bedingungen auswirkt. Für die Fitness der Zelle ist es offenbar von großer Bedeutung eine gewisse Homöostase in der Aktivität des CiaRH-Systems aufrecht zu erhalten. Es wäre möglich, dass diese physiologische Aufgabe durch die regulatorische Rückkopplung von HtrA übernommen wird. Zudem eröffnet der offensichtlich recht

komplexe Regulationsweg die Möglichkeit zur Integration weiterer regulatorischer Faktoren. Dass die CiaRH-Aktivität auf verschiedenste Veränderungen, wie die Anwesenheit von Zellwandantibiotika, die Medienzusammensetzung oder Stoffwechselprodukte wie Acetat reagiert, ist dokumentiert (Rogers *et al.*, 2007; Günzler, 2010; Halfmann *et al.*, 2011). Dabei ist es unwahrscheinlich, dass sämtliche Faktoren durch die Sensordomäne von CiaH detektiert werden. Eher scheint auch hier eine Regulation unter Beteiligung von Hilfsregulatoren, eventuell mit Integration in den HtrA-Regulationsweg, möglich zu sein.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, geht auch von der Kompetenz, genauer gesagt, der Blockade des autokatalytischen Kompetenzinduktionsmechanismus, ein regulatorischer Einfluss auf die Aktivität des CiaRH-Systems aus. Die genaue Art und Weise dieser Regulation ist zwar noch unklar, jedoch sind von den bekannten kompetenzinduzierten Genen nur ca. 20-25 % tatsächlich für die Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* essentiell (Peterson *et al.*, 2004). Die übrigen Gene könnten durchaus andere Funktionen in der Zelle übernehmen, wie etwa eine Verknüpfung der Kompetenz mit anderen regulatorischen Systemen, wie dem CiaRH-System. Die Entdeckung dieses Regulationswegs von Kompetenz- zu CiaRH-System zeigt, dass sich beide Systeme offenbar wechselseitig beeinflussen können und verdeutlicht die enge regulatorische Verbindung, die zwischen ihnen besteht.

Dass das Niveau der CiaRH-Aktivität von so vielen verschiedenen Faktoren und Bedingungen beeinflusst werden kann, deutet darauf hin, dass offenbar mehrere Regulationswege in dieses TCS münden. Es ist also durchaus möglich, dass die hier entdeckten Regulationen, die HtrA und die Kompetenz beinhalten, nur einen kleinen Teil eines sehr komplexen Regulationsnetzwerks von CiaRH darstellen.



### 5.3 Regulation von Kompetenz, Resistenz und Autolyse durch CiaRH – welche Rolle spielen die csRNAs und HtrA?

Wie bisher gezeigt werden konnte, kann die Aktivität von CiaR durch bestimmte Aminosäureaustausche in CiaH ebenso beeinflusst werden, wie durch die An- oder Abwesenheit von HtrA. Aktivitätsänderungen des CiaRH-Systems, wie sie in besonders starkem Maße durch die untersuchten CiaH-Allele verursacht werden, haben für *S. pneumoniae* einschneidende physiologische Konsequenzen, die unter anderem die Regulation der Kompetenz, die Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse, wie beispielsweise  $\beta$ -Lactamantibiotika und die Autolyse betreffen.

Wie genau das CiaRH-System Einfluss auf Kompetenz, Resistenz und Lyse nimmt ist noch weitestgehend unbekannt. Durch die Identifizierung des CiaR-Bindemotivs und anschließende bioinformatische und experimentelle Untersuchungen konnten 16 Promotoren identifiziert werden, die unter direkter Regulation von CiaR stehen (Halfmann *et al.*, 2007b). Diese Promotoren steuern die Expression von 30 Genen, darunter Gene deren Produkte mit Zellstress (*htrA*), Chromosomensegregation (*parB*), der Modifizierung der Teichonsäuren (*lic*, *dlt*) und dem Zucker-Stoffwechsel (*man*, *mal*) in Verbindung gebracht werden, sowie Gene von fünf kleinen nicht-codierenden RNAs (*ccnA-E*), den csRNAs. Gene, die man direkt mit den besagten Phänotypen in Verbindung bringen kann, wie beispielsweise bekannte Kompetenzgene, finden sich nicht unter den Genen des CiaR-Regulons. Demzufolge scheint CiaRH indirekt Einfluss auf Kompetenz, Resistenz und Lyse zu nehmen.

Es ist vorstellbar, dass bestimmte Genprodukte des CiaR-Regulons eine regulatorische Wirkung auf Gene bzw. Genprodukte, die direkt an der Ausbildung besagter Phänotypen beteiligt sind, ausüben und auf diese Weise die Verbindung zu CiaRH herstellen. *HtrA* zählt zu den stärker exprimierten Genen des CiaR-Regulons und ist, wie gezeigt wurde, offenbar Teil eines noch weitestgehend unbekanntem Regulationsmechanismus. Die am stärksten exprimierten Gene des Regulons sind die Gene der fünf csRNAs (Halfmann *et al.*, 2007b). Wie erst in den letzten Jahren erkannt wurde, haben kleine RNAs (small RNAs; sRNAs) eine wichtige physiologische Bedeutung für die Regulation vieler zellulärer Prozesse (Waters und Storz, 2009). Die Rolle beider Gene bzw. Gengruppen an den CiaRH-regulierten Phänotypen wurde in dieser Arbeit näher untersucht und soll nun im Folgenden diskutiert werden.

### 5.3.1 CiaRH und die Kompetenz

Die Kompetenz von *S. pneumoniae* wird schon lange und intensiv erforscht und ist daher in ihren Grundzügen gut untersucht, doch wirft die komplexe Art der Regulation und die Beeinflussbarkeit durch verschiedenste Faktoren noch immer viele Fragen auf (Claverys und Håvarstein, 2002). Eine mögliche regulatorische Verbindung zwischen dem Zweikomponentensystem CiaRH und der Kompetenz wurde schon bei der Entdeckung von CiaRH beobachtet: Die bei einer Selektion auf das  $\beta$ -Lactamantibiotikum Cefotaxim entstandene Punktmutation des *ciaH*-Allels *ciaH306*, welche eine starke Aktivierung des CiaR-Regulons zur Folge hat, führte zu einem transformationsdefizienten Phänotyp (Guenzi *et al.*, 1994). Ein weiterer Beweis für den regulatorischen Einfluss von CiaRH auf die Kompetenz war die Entdeckung von Insertionsmutanten in *ciaR* bei einem Screening auf sogenannte CUP-Mutanten (= competence up), also Mutanten, bei denen es zu einer Aktivierung der Kompetenz kommt (Martin *et al.*, 2000). Die *ciaR*-Deletionsmutanten zeigten eine Kompetenzentwicklung unter normalerweise kompetenzinhibierenden Bedingungen, wie saurem pH oder C-Maleat-Medium. Diese Daten zeigen, dass CiaRH offenbar unter Laborbedingungen regulatorisch aktiv ist und je nach Veränderung seines Aktivierungsstatus die Kompetenz blockieren oder eine bestehende Kompetenzinhibition aufzuheben vermag. Bei unabhängigen Transkriptomstudien wurde eine erhöhte Transkriptmenge verschiedener Kompetenzgene in Abwesenheit von CiaR festgestellt (Echenique *et al.*, 2000; Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003). Da, wie bereits erwähnt, bei keinem dieser Kompetenzgene ein CiaR-Bindemotiv identifiziert werden konnte (Halfmann *et al.*, 2007b), handelt es sich offenbar um eine indirekte, durch Genprodukte des CiaR-Regulons vermittelte Art der Regulation.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Rolle der CiaR-regulierten Gene *htrA* und *ccnA-E* bei der Regulation der Kompetenz durch CiaRH untersucht. Dazu wurden Deletionen von *htrA* oder *ccnA-E* in den *S. pneumoniae* R6 Wildtyp, sowie in Derivate mit aktiviertem CiaRH-System eingeführt und Kompetenzuntersuchungen in verschiedenen Medien durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass in dem kompetenz-zulassenden C+Y-Medium die, bei einer Aktivierung des CiaRH-Systems auftretende, Kompetenzinhibition hauptsächlich auf die durch *ccnA-E* kodierten csRNAs zurückgeht. Der durch die aktivierenden *ciaH*-Allele *ciaH202* und *ciaH306* vermittelte Kompetenzblock konnte durch Deletion der fünf csRNA-Gene vollständig aufgehoben werden und entsprach bezüglich der Kompetenzentwicklung dem

Stamm mit deletiertem *ciaR*. Die nach wie vor stark erhöhte Expression der anderen CiaR-regulierten Gene führte zu keinem sichtbaren negativen Effekt auf die Stärke und den zeitlichen Ablauf der Kompetenzentwicklung. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den csRNAs, zumindest unter diesen Bedingungen, um den Hauptvermittler der CiaR-abhängigen Kompetenzinhibition handelt. Dennoch scheint auch HtrA an der Inhibition der Kompetenz durch ein aktiviertes CiaRH-System beteiligt zu sein. Die Deletion von *htrA* bei ansonsten aktiviertem CiaR-Regulon führte zu einer wieder messbaren Kompetenzentwicklung in C+Y-Medium. Jedoch fiel das Niveau der Kompetenz deutlich geringer aus, als beim *ciaR*- oder *ccnCDEAB*-Deletionsstamm. In früheren Untersuchungen konnten Sebert *et al.* (2005) im Stamm mit aktivierendem *ciaH306*-Allel und proteasedefizientem HtrA (HtrA-S234A) ebenfalls eine Kompetenzentwicklung beobachten. Die dort beschriebene Kompetenzwiederherstellung auf Wildtypniveau ließ sich durch die Versuche der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigen. Das nach wie vor erniedrigte Kompetenzprofil bei Deletion von *htrA* zeigt, dass die erhöhte Genregulation der übrigen CiaR-abhängigen Gene, darunter *ccnA-E*, die Kompetenzentwicklung effektiv inhibiert. Eine vollständige Kompetenzunterdrückung wird jedoch nur durch den zusätzlichen Effekt von HtrA erreicht. Die Ergebnisse machen deutlich, dass sowohl die csRNAs, als auch HtrA einen inhibitorischen Einfluss auf die Kompetenz haben, wobei die csRNAs in C+Y-Medium offenbar die bedeutendere Rolle spielen. Der gelegentlich beobachtete Effekt, dass die Deletion von *htrA* im Wildtyp zu einer Reduktion der Kompetenz führt (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Ibrahim *et al.*, 2004b), was eigentlich auf eine kompetenzaktivierende Wirkung von HtrA hindeutet, ist möglicherweise auf eine erhöhte Expression der csRNAs zurückzuführen. Die bei Abwesenheit von HtrA erfolgende leichte Aktivierung des CiaRH-Systems (Kap. 4.3) und die dadurch erhöhte Menge an csRNAs (Abb. 4.12), die offensichtlich einen negativen Einfluss auf die Kompetenz hat, könnte diese Beobachtung erklären. Da die stark erhöhte Expression von *htrA* im Stamm mit aktiviertem CiaRH-System ohne csRNAs keinen sichtbaren negativen Effekt auf die Kompetenz hat, lässt sich spekulieren, ob die Wirkungsweise von HtrA möglicherweise von den csRNAs abhängen könnte. Hinweise auf eine derartige Interaktion gibt es bislang jedoch nicht. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die stark erhöhte Expression von *htrA* und vor allem von *ccnA-E* offenbar gemeinsam zu der bei einem aktivierten CiaRH-System beobachteten Kompetenzinhibition in C+Y-Medium führt.

Wie bereits erwähnt, führt ein Wegfall der CiaR-vermittelten Genregulation zu Kompetenzentwicklung unter Bedingungen, die eine Kompetenz normalerweise unterdrücken, wie niedrigem pH oder Maleat statt Phosphat als Pufferkomponente im Medium (Martin *et al.*, 2000). Auch bei kompetenzinhibierenden Komplexmedien wie BHI oder THB führt eine Deletion von *ciaR* zur Entwicklung von Kompetenz (Mascher *et al.*, 2003; Tsui *et al.*, 2010). Für eine Beteiligung der csRNAs an der CiaR-abhängigen Kompetenzinhibition in BHI gibt es bereits erste Hinweise. Tsui *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die ektopische Expression von *ccnA* (csRNA1) die Transformierbarkeit eines *S. pneumoniae* D39-Stammes mit deletiertem *ciaR* in BHI reduziert. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die csRNAs zwar am CiaRH-vermittelten Kompetenzphänotyp in BHI eine Rolle spielen, diese allerdings nicht so bedeutsam ist, wie in C+Y-Medium. Die Deletion der csRNA-Gene alleine führte nicht zu einer messbaren Kompetenzentwicklung, ebenso wenig wie die Deletion von *htrA*. Nur das kombinierte Ausschalten von *ccnA-E* und *htrA* gemeinsam brachte einen reproduzierbaren Kompetenzphänotyp in BHI hervor, der allerdings noch unter dem Kompetenzniveau des *ciaR*-Deletionsstammes lag. Das zeigt, dass, im Gegensatz zum C+Y-Medium, unter diesen Bedingungen die Ausschaltung der csRNAs nicht ausreicht, um *S. pneumoniae* transformierbar zu machen. Wie es scheint, spielt HtrA in BHI eine bedeutendere kompetenzinhibierende Rolle als in C+Y-Medium, wo es, sobald die csRNAs fehlen, selbst in überexprimierter Form keinen sichtbaren Effekt auf die Kompetenz bewirkt. In THB scheint die kompetenzinhibitorische Rolle von HtrA noch bedeutsamer zu sein. Hier reicht schon das Fehlen von HtrA aus, um in *S. pneumoniae* eine Kompetenzentwicklung zu ermöglichen. Durch eine ektopische *htrA*-Komplementation unter Kontrolle des nativen Promotors konnte der Phänotyp von *S. pneumoniae* R6 mit unterdrückter Kompetenz wiederhergestellt werden, was eine zusätzliche Verifizierung der Bedeutung von HtrA für die Kompetenz in THB darstellt. Bezüglich dieses Sachverhaltes gibt es allerdings auch abweichende Beobachtungen (Mascher *et al.*, 2003; Sebert *et al.*, 2005), die vermutlich auf Schwankungen in der Zusammensetzung des Fertigmediums THB zurückzuführen sind. THB hat sich schon in Vergangenheit als äußerst kritisch bezüglich der Reproduzierbarkeit der bei seiner Anwendung erhaltenen Daten erwiesen (Merai, 2003). Auch in der aktuellen Arbeit konnte nur ein Teil der *S. pneumoniae*-Stämme in THB untersucht werden, da aufgrund eines Chargenwechsels des THB-Pulvers gegen Ende der Laborzeit kein normales Wachstum der Kontrollstämme mehr erreicht werden konnte. Aufgrund dessen gibt es keine Daten zur Bedeutung der csRNAs in diesem Medium.

Dass der inhibitorische Einfluss von CiaRH an der Transformationsdefizienz von *S. pneumoniae* in BHI und THB beteiligt ist, steht außer Frage. Ob die Kompetenzunterdrückung in diesen Medien allerdings alleine von CiaRH abhängt ist unklar. Zwar ist die Aktivität des CiaRH-Systems in BHI und THB tatsächlich leicht erhöht (Halfmann *et al.*, 2011), jedoch ist es zweifelhaft, ob diese etwa 2-fache Erhöhung für einen vollständigen Kompetenzblock ausreichend sein dürfte. Bei dem *ciaH*-Allel des klinischen *S. pneumoniae*-Isolats „Tupelo“ kommt es zu einer ähnlich starken Aktivierung des CiaRH-Systems, wobei hier die Transformierbarkeit noch teilweise erhalten bleibt (Marx P., persönliche Mitteilung). Möglicherweise gibt es noch andere Regulationsmechanismen, welche gemeinsam mit CiaRH unter bestimmten Medienbedingungen eine Kompetenzentwicklung blockieren. Trotz allem reicht der Wegfall der CiaR-vermittelten Regulation aus, um *S. pneumoniae* auch unter diesen Bedingungen transformierbar zu machen, was die Bedeutung von CiaRH als wichtiger Kompetenzregulator unterstreicht.

Die physiologische Bedeutung von HtrA und csRNA1-5 für die Regulation der Kompetenz durch CiaRH konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Auf welche Weise diese beiden Genprodukte auf die Kompetenz wirken ist allerdings bislang unbekannt. Da weder HtrA noch den csRNAs eine direkte Rolle bei der Aufnahme und Rekombination der DNA zugewiesen werden kann, ist davon auszugehen, dass sie vermutlich eher eine regulatorische Funktion übernehmen. In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass Veränderungen in der Aktivität des CiaRH-Systems Auswirkungen auf die Expression der frühen Kompetenzgene haben (Echenique *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003). Es ist daher wahrscheinlich, dass HtrA und csRNA1-5 regulatorisch in den autokatalytischen Loop der Kompetenzinduktion eingreifen.

Die fünf csRNAs weisen eine hohe Homologie untereinander auf und besitzen eine komplementäre Shine-Dalgarno- und Start-Codon-Sequenz. Diese Sequenzbereiche geben einen Hinweis auf die mögliche Funktion der csRNAs, da *trans*-agierende regulatorische sRNAs häufig durch homologe Basenpaarung an die Translationsinitiationsregion (TIR) ihrer Ziel-mRNA binden, und dadurch die Translation oder mRNA-Stabilität beeinflussen (Geissmann *et al.*, 2006). Durch *in silico*-Suche mit verschiedenen bioinformatischen Programmen konnten für die csRNAs eine Reihe möglicher Zielgene identifiziert werden (Kovács, 2009), darunter auch *comC*. *ComC* kodiert für das Vorläuferpeptid des Kompetenzpheromons CSP, das als Quorum sensing-Signal bei dem autokatalytischen Loop der Kompetenzinduktion fungiert (Claverys und Håvarstein, 2002). Durch Bandshift-Assays

konnte *in vitro* die Bindung der csRNAs an die *comC*-mRNA nachgewiesen werden und auch *in vivo*-Versuche mit einer *lacZ*-Fusion an Promotor und TIR von *comC*, deuten auf eine posttranskriptionelle Regulation von *comC* durch die csRNAs hin (Kovács, 2009). In aktuellen Untersuchungen kam es durch Mutagenese der vermutlich an der Interaktion mit den csRNAs beteiligten Basen in der TIR von *comC* zu Kompetenzentwicklung in einem Stamm mit aktiviertem CiaRH-System (Schnorpfeil A., persönliche Mitteilung). Nach momentanem Wissenstand deutet alles darauf hin, dass die csRNAs durch die Hemmung der *comC*-Translation eine geringere CSP-Produktion bewirken und damit die Kompetenzinduktion negativ beeinflussen. Die endgültige Klärung dieses Sachverhalts ist Teil laufender Untersuchung. Unter den putativen Zielgenen der *in silico*-Suche fanden sich noch weitere Gene, die mit Kompetenz in Verbindung gebracht werden können, wie *comA*, *cibB* oder *blpY* (Peterson *et al.*, 2004; Guiral *et al.*, 2005). Allerdings konnten weiterführende Untersuchungen keinen Nachweis für eine tatsächliche Interaktion mit den csRNAs erbringen. Es ist natürlich auch nicht auszuschließen, dass bei der *in silico*-Suche, da es sich um eine rein theoretische Methode handelt, tatsächliche csRNA-Zielgene nicht erfasst wurden. Da für regulatorische sRNAs häufig mehrere Targets vorkommen, ist die Identifizierung weiterer csRNA-Zielgene Teil laufender Untersuchungen und hilft möglicherweise die regulatorische Bedeutung der csRNAs in *S. pneumoniae* zu erhellen.

*HtrA* wurde schon früh als CiaRH-reguliertes Gen entdeckt und aufgrund seiner Lage im Genom, es liegt benachbart zum *comCDE*-Operon, mit Kompetenz in Verbindung gebracht (Sebert *et al.*, 2002). Aufgrund seiner Lokalisation an der Zelloberfläche sind die Möglichkeiten für HtrA in die Kompetenz einzugreifen eingeschränkt. Enzyme der HtrA-Serinprotease-Familie sind bifunktional und besitzen Protease- und Chaperonaktivität. Ein proteolytischer Abbau der membranständigen Histidinkinase ComD, die als CSP-Rezeptor in der Kompetenzinduktion von *S. pneumoniae* fungiert, wurde postuliert, konnte aber durch Western Blot Analysen nicht bestätigt werden (Sebert *et al.*, 2005). Auch CSP, als weitere extrazelluläre Komponente des Kompetenzinduktionsmechanismus, kommt als regulatorisches Ziel von HtrA in Frage. Bei dem bereits strukturell gut untersuchten HtrA-Homolog DegP von *E. coli* wird bei der Oligomerisierung eine Art Höhle ausgebildet, deren Maße möglicherweise intakt gefalteten Proteinen aufgrund ihrer Größe den Zutritt zu den im Innern liegenden katalytischen Zentren verwehrt (Clausen *et al.*, 2002). Vorausgesetzt Struktur und Oligomerisierungszustand von HtrA in *S. pneumoniae* wären vergleichbar, wäre ein Größenausschluss von CSP nur schwer vorstellbar, da es sich bei seiner reifen Form um ein kleines Peptid von nur 17 Aminosäuren Länge handelt. Die geringe Größe könnte CSP

daher, ähnlich wie ungefaltete Proteine, zu einem möglichen HtrA-Substrat machen. Man sollte jedoch nicht außer Acht lassen, dass es deutliche Unterschiede im Domänenbau der HtrA-Homologe aus Gram negativen und Gram positiven Bakterien gibt. So besitzt DegP von *E. coli* am C-terminalen Ende zwei PDZ-Domänen, während HtrA von Gram positiven Bakterien, so auch von *S. pneumoniae*, nur eine PDZ-Domäne aufweist (Kim und Kim, 2005). Dies bleibt sicherlich nicht ohne Einfluss auf den strukturellen Aufbau der Oligomere. Untersuchungen, die die Frage, ob CSP ein HtrA-Substrat in *S. pneumoniae* ist, klären sollten, haben keine zufriedenstellenden Ergebnisse geliefert (Sebert *et al.*, 2005), so dass hier noch weiterer Klärungsbedarf besteht. In der Vergangenheit konnte auch gezeigt werden, dass die Oligopeptid-Permease AmiCDEF und ihre Oligopeptid-bindenden Lipoproteine an der Regulation der Kompetenzinduktion beteiligt sind (Alloing *et al.*, 1998). Da die Inaktivierung dieses Systems jedoch einen positiven Effekt auf die Kompetenzinduktion hat, ist es recht unwahrscheinlich, dass seine Komponenten als proteolytisches Target von HtrA dienen und dessen negativen Einfluss auf die Kompetenz vermitteln. Es wäre aber denkbar, dass HtrA das System aktiviert, etwa durch die vermehrte Entstehung von Oligopeptiden beim proteolytischen Proteinabbau durch HtrA. Neueste Studien postulieren, dass die Oligopeptidaufnahme über das Ami-Ali-System durch den Regulator CodY zur Unterdrückung der Kompetenz führen könnte (Caymaris *et al.*, 2010). Natürlich ist auch nicht auszuschließen, dass der Einfluss des CiaRH-Systems auf die frühen Kompetenzgene nur über die csRNAs vermittelt wird und HtrA auf Komponenten des Kompetenzsystems wirkt, die durch späte Kompetenzgene kodiert werden. Hier wären die membranständig lokalisierten Untereinheiten des DNA-Aufnahmeapparats mögliche Ziele (Berge *et al.*, 2002; Claverys *et al.*, 2009). Letztendlich ist es jedoch noch recht unklar, auf welchem Weg HtrA die Kompetenz beeinflusst.

Die Kompetenztests haben gezeigt, dass HtrA und csRNAs in den untersuchten Medien die Transformierbarkeit nicht immer gleich beeinflussen. Was diese unterschiedliche Gewichtung der beiden kompetenzinhibierenden Faktoren des CiaRH-Systems, in Abhängigkeit vom Medium verursacht, ist unbekannt. Es ist vorstellbar, dass sich, induziert durch die Umgebungsbedingungen, die Zelloberfläche in einer Weise ändert, die die Aktivität von HtrA beeinflusst oder zu einem Umschalten zwischen Chaperon- und Proteasefunktion führt. Für HtrA in *E. coli* beispielsweise ist bekannt, dass es in einem inaktiven Zustand vorliegt und erst durch Bindung seines Substrats eine allosterische Aktivierung erfährt (Meltzer *et al.*, 2008; Krojer *et al.*, 2010). Auch für andere HtrA-Homologe sind Regulationsmechanismen,

wie die Bindung eines autoproteolytischen Peptids an die PDZ-Domäne oder die Modulierung der Proteaseaktivität durch Phosphorylierung beschrieben (Plun-Favreau *et al.*, 2007; Mohamedmohaideen *et al.*, 2008). Möglicherweise wird auch in *S. pneumoniae* die Aktivität von HtrA durch bestimmte Faktoren stimuliert oder in ihrer Funktion verändert.

Man sollte zudem bedenken, dass in C+Y-Medium die Kompetenzuntersuchungen in Stämmen mit aktiviertem CiaRH-System durchgeführt wurden. Das bedeutet, dass in diesen Stämmen alle Gene des CiaR-Regulons stärker reguliert wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass sich Gene darunter befinden, die regulatorisch auf HtrA, die csRNAs oder die Kompetenz selbst wirken und damit zu den medienabhängigen Unterschieden beitragen könnten. Das in BHI nach wie vor reduzierte Kompetenzniveau im Stamm ohne csRNAs und HtrA im Vergleich zum *ciaR*-Deletionsstamm lässt zudem ebenfalls mutmaßen, dass es eventuell noch weitere CiaR-regulierte Faktoren gibt, die zur Kompetenzinhibierung beitragen. Mögliche Zusammenhänge mit dem Kompetenzphänotyp wurden bislang unter anderem für die Homologe der CiaR-regulierten Gene *parB* und *manLMN* in *Streptococcus mutans* beschrieben (Ahn *et al.*, 2005; Abranches *et al.*, 2006). Ob in *S. pneumoniae* die csRNAs und HtrA nicht nur die Haupt-, sondern tatsächlich auch die einzige Verbindung zwischen CiaRH und dem Kompetenzphänotyp darstellen, müssten weitere Versuche klären.

### 5.3.2 CiaRH und die Resistenz

Das TCS CiaRH wurde als erste nicht-PBP(penicillin binding protein)-Resistenzdeterminante in *S. pneumoniae* entdeckt. Bei aktiviertem CiaRH-System kommt es zu einer moderaten Erhöhung der Resistenz gegen verschiedene  $\beta$ -Lactamantibiotika, die gut mit der Aktivierungsstärke der CiaR-abhängigen Genexpression korreliert (Abb. 4.2). Dagegen führt die Deletion von *ciaR* nur zu einer leichten, nahezu nicht vom Wildtyp unterscheidbaren Resistenzreduktion (Abb. 4.7). Zur Untersuchung der Bedeutung der csRNAs, sowie HtrA für die CiaRH-vermittelte Resistenz wurden Deletionskonstrukte von *ccnA-E* bzw. *htrA* in den Wildtyp R6 oder in Stämme mit aktiviertem CiaRH-System eingebracht und resistenzphänotypisch untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch die Aktivierung des CiaRH-Systems vermittelte  $\beta$ -Lactamresistenz hauptsächlich von den csRNAs abhängt. Nach Deletion von *ccnA-E* führte die aktivierte Regulation der übrigen Gene des Regulons zu keiner Resistenz gegen das Antibiotikum Cefotaxim, welche wesentlich über das Niveau des



Wildtyps hinausging (Abb. 4.2). Auch bei Deletion von *ccnA-E* im Wildtyp zeigte sich ein Resistenzphänotyp, der eher dem des *ciaR*-Deletionsstammes entsprach. Allerdings ist die Interpretation dieser Beobachtung aufgrund der äußerst geringen Unterschiede zum Wildtyp recht schwierig.

Im Gegensatz zu den csRNAs zeigte sich bei der Deletion von *htrA* in ansonsten aktiviertem CiaRH-System ein kaum sichtbarer Effekt auf die Resistenz (Abb. 4.2). Lediglich eine sehr geringe Reduktion der Cefotaximresistenz in R6 *ciaH306* ist zu erkennen. Im ersten Moment überraschend ist die Beobachtung, dass die Deletion von *htrA* im Wildtyp nicht zu einer Reduktion oder einer gleichbleibenden Cefotaximresistenz, sondern zu einer leichten Erhöhung führt. Erklären lässt sich dieser Umstand vermutlich durch den regulatorischen Einfluss von HtrA auf die CiaR-Aktivität. Durch das Fehlen von HtrA kommt es zu einer erhöhten Aktivierung von CiaR, was eine veränderte Expression der Gene des CiaR-Regulons zur Folge hat (Abb. 4.12). Bei bereits aktiviertem CiaRH-System ist der regulatorische Effekt von HtrA nicht mehr zu beobachten (Tab. 4.8). Es ist also wahrscheinlich, dass die im Wildtyp erhöhte Resistenz bei Abwesenheit von HtrA auf andere CiaR-regulierte Gene zurückgeht, vermutlich auf *ccnA-E*.

Wie genau CiaRH die  $\beta$ -Lactamresistenz von *S. pneumoniae* beeinflusst, ist unbekannt. Es gibt neuere Untersuchungen, die auf einen möglichen Abbau von veränderten PBPs, der Targets der  $\beta$ -Lactamantibiotika, durch HtrA hindeuten (Peters, 2009). Dieser Sachverhalt steht jedoch offenbar nicht mit dem CiaRH-abhängigen Resistenzphänotyp in Zusammenhang, da HtrA, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, keinen bedeutenden Anteil an der CiaRH-vermittelten Cefotaximresistenz zu haben scheint. Im Gegensatz dazu ist offenbar die stärkere Expression von *ccnA-E* in Stämmen mit aktiviertem CiaRH für den beobachteten Resistenzanstieg von entscheidender Bedeutung. Bislang wurde allerdings noch kein csRNA-Zielgen identifiziert, das diesen Effekt erklären könnte. Möglicherweise bringt die aktuell laufende Zielgensuche putative Targets hervor, die eine Verbindung zwischen den csRNAs und der gesteigerten  $\beta$ -Lactamresistenz herstellen könnte. Denkbar wäre hierbei ein Effekt der csRNAs auf Genprodukte, die am Aufbau oder der Integrität der Zellwand beteiligt sind. Frühere Untersuchungen haben auch gezeigt, dass zwei Genloci des CiaR-Regulons, das *dlt*-Operon und das Gen *axe* eventuell ebenfalls an der CiaRH-vermittelten Cefotaximresistenz beteiligt sind (Mascher, 2001). Die erhöhte Expression dieser Gene im Stamm mit aktivierendem *ciaH*-Allel erklärt möglicherweise, warum die Deletion von *ccnA-E* und *htrA* die Resistenz nicht ganz auf das Niveau des *ciaR*-Deletionsstammes zu bringen scheint.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die csRNAs offenbar auch an diesem CiaRH-abhängigen Phänotyp einen großen Anteil haben. Jedoch müssten zukünftige Untersuchungen noch viele offene Fragen klären, insbesondere wodurch CiaRH *S. pneumoniae* eine größere Widerstandsfähigkeit gegen bestimmte Antibiotika verleiht und wie die csRNAs zur Erlangung dieses Zustands beitragen.

### 5.3.3 CiaRH und die Autolyse

Beim Wachstum von *S. pneumoniae* unter Laborbedingungen ist in der Stationärphase nach einiger Zeit eine einsetzende Autolyse zu beobachten. Diese Lyse ist ebenfalls ein Phänotyp der von CiaRH beeinflusst wird. So zeigen *ciaR*-Deletionsmutanten eine im Vergleich zum Wildtyp früher eintretende Autolyse, während ein aktiviertes CiaRH-System, beispielsweise vermittelt durch das *ciaH*-Allel *ciaH306*, zu einer verzögerten natürlichen Autolyse führt (Abb. 4.3).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CiaRH-abhängige Autolyse ebenfalls wie die anderen untersuchten Phänotypen verstärkt von den CiaR-regulierten csRNAs abhängt (Abb. 4.9). HtrA dagegen scheint keinen erkennbaren Einfluss auf die Autolyse zu haben. Dass die csRNAs regulatorisch mit dem Lysephänotyp von *S. pneumoniae* verbunden sind haben bereits Untersuchungen an *ccnD*- und *ccnE*-Deletionsstämmen gezeigt, die im Vergleich zum Wildtyp eine verfrühte Autolyse aufweisen (Halfmann *et al.*, 2007b). In dieser Arbeit konnte nun nachgewiesen werden, dass offenbar auch die Überexpression der csRNAs in Stämmen mit aktiviertem CiaRH-System zu der dort beobachteten, stark verzögerten Autolyse führt. Die Deletion von *ccnA-E* hatte den selben Effekt auf den Lysephänotyp von R6 *ciaH306* und R6 *ciaH202* wie die Deletion des Responseregulatorgens *ciaR*. Es scheint somit, als wären die csRNAs hauptverantwortlich für den CiaRH-vermittelten Einfluss auf die Autolyse.

Der Mechanismus, über den die csRNAs den Lysephänotyp von *S. pneumoniae* beeinflussen könnten, ist unbekannt. Untersuchungen, ob eine Homologie zu den mRNAs der Hauptautolysine LytA oder LytC besteht, die sie zu möglichen Zielen der csRNAs machen könnte, brachten keine positive Übereinstimmung (Halfmann *et al.*, 2007b). Allerdings gibt es Hinweise, dass eine Verbindung zwischen Autolyse und Kompetenz besteht (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Piñas *et al.*, 2008). So hängt die Freisetzung von DNA bei

der sogenannten Allolyse, der Lyse von nicht-kompetenten Zellen durch kompetente Zellen der selben Kultur, von LytA und LytC ab (Moscoso und Claverys, 2004). Zudem befinden sich Gene von Autolysinen und anderen lysierend wirkenden Stoffen, wie LytA, CbpD und die Bacteriocine CibA und CibB unter den späten Kompetenzgenen (Peterson *et al.*, 2004; Guiral *et al.*, 2005). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind die csRNAs offenbar die Haupteffektoren der CiaRH-abhängigen Kompetenzregulation, die vermutlich über die Hemmung der CSP-Produktion die Induktion der Kompetenz steuern. Daher ist es durchaus wahrscheinlich, dass die beobachtete csRNA-Abhängigkeit der Autolyse direkt mit der Funktion der csRNAs als Kompetenzeffektoren verbunden ist.

## 5.4 Die Regulation von CiaRH und seine Folgen – ein Überblick

Wie die vorangegangenen Kapitel, aber auch Untersuchungen in der Vergangenheit gezeigt haben, wird die Aktivität des CiaRH-Systems durch verschiedenste Faktoren beeinflusst und wirkt sich seinerseits auf verschiedene physiologische Zustände aus. Abb. 5.4 zeigt einen schematischen Überblick über einige Aspekte der vielfältigen CiaRH-Regulation, in den zudem die aktuellen Ergebnisse dieser Arbeit eingeordnet wurden. Die Aktivität des CiaRH-Systems, und damit der Phosphorylierungszustand von CiaR, hängt von sehr vielen Faktoren ab. Unter anderem wird er offenbar vom Energiestoffwechsel, der Wachstumsphase und verschiedenen Regulationswegen beeinflusst, die das Kompetenzsystem oder einige Genprodukte des CiaR-Regulons, darunter HtrA mit einbeziehen.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung des Energiestoffwechsels ergaben sich aus Untersuchungen zur Rolle von CiaH in verschiedenen Medien (Halfmann *et al.*, 2011). So konnte gezeigt werden, dass in C+Y-Medium CiaR anscheinend unabhängig von CiaH phosphoryliert wird und CiaH sogar eher als leichte Phosphatase agiert, während in den Medien THB und BHI die Phosphorylierung von CiaR größtenteils durch CiaH vermittelt wird. Diese Beobachtung zeigt, dass CiaH offenbar bifunktional ist und seine Funktion in den verschiedenen Medien variiert. Möglicherweise spielt CiaH sogar eine regulatorische Rolle bei der Homöostase der CiaR-Aktivität, indem es die Phosphorylierung von CiaR unter verschiedenen Umweltbedingungen relativ konstant hält. Darüber hinaus ergibt sich aus dieser Beobachtung, dass CiaR auf anderen Wegen als durch seine zugehörige Histidinkinase phosphoryliert werden kann. Eine Möglichkeit der CiaH-unabhängigen Phosphorylierung von CiaR wäre eine Autophosphorylierung durch energiereiche kleine Moleküle, die im Energiestoffwechsel gebildet werden, wie beispielsweise Acetyl-Phosphat (Wolfe, 2010). In der Tat konnte eine Phosphorylierung von CiaR durch Acetyl-Phosphat *in vitro* bereits nachgewiesen werden (Halfmann *et al.*, 2011).

Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass Acetat, ebenfalls ein Metabolit des Energiestoffwechsels, eine regulatorische Wirkung auf CiaRH hat. In Anwesenheit der Histidinkinase CiaH führt eine erhöhte Acetatmenge im Medium zu einer leichten Inhibition der CiaR-Aktivität, in Abwesenheit von CiaH kommt es dagegen zu einer starken Aktivierung, die über den Energiestoffwechsel vermittelt werden könnte (Günzler, 2010). Diese Ergebnisse bestärken die Annahme, dass der Stoffwechselstatus der Zelle einen deutlichen regulatorischen Einfluss auf CiaRH ausübt.

Neben dem Einfluss verschiedener Medien, gibt es auch einen wachstumsphasenabhängigen Effekt auf die CiaR-Aktivität. So kommt es zu einem Aktivierungsanstieg des CiaRH-Systems am Ende der exponentiellen Phase, der offenbar CiaH-abhängig ist (Mascher *et al.*, 2003; Halfmann *et al.*, 2011). Die Ursache für diese Aktivierung durch CiaH ist jedoch unklar. Möglicherweise tritt zu Beginn der Stationärphase bei der Umstellung des Stoffwechsels ein bestimmtes Signal für CiaH auf, das deren Kinaseaktivität stimuliert (Halfmann, 2008). In der Vergangenheit wurde diskutiert, ob CiaRH möglicherweise an der bislang ungeklärten Abschaltung der Kompetenz, die im gleichen Zeitraum wie der Aktivierungsanstieg von CiaRH zu beobachten ist, beteiligt sein könnte (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Aufgrund der Tatsache, dass es aber auch in *ciaR*-Deletionsstämmen zu einer ganz normalen Abschaltung der Kompetenz zu Beginn der Stationärphase kommt (Abb. 4.4), ist diese Annahme höchst unwahrscheinlich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CiaRH-Aktivität offenbar von weiteren Regulationsmechanismen beeinflusst wird. Dabei deuten die Untersuchungen darauf hin, dass es sich um mindestens zwei unabhängige Mechanismen handelt: Zum Einen gibt es offenbar eine Regulation, die von der Anwesenheit von HtrA abhängt, zum Anderen wirkt sich eine unterdrückte Kompetenzinduktion auf die CiaRH-Aktivität aus.

Die Abwesenheit von HtrA hat einen positiven Einfluss auf die CiaR-Aktivität und wird offenbar über einen CiaH-unabhängigen Weg vermittelt. Aufgrund der Lokalisation von HtrA an der Zelloberfläche müssen weitere Zellkomponenten, die eine Signaltransduktion durch die Membran ermöglichen, beteiligt sein (Abb. 5.3). Eine Möglichkeit wäre die Beteiligung eines fremden TCS, das die Expression eines Hilfsregulators steuert. Auch andere Genprodukte des CiaR-Regulons, *csRNA1-5* und *ManLMN*, haben offenbar einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität von CiaRH. Ob dieser über den selben Regulationsmechanismus vermittelt wird wie bei HtrA ist unbekannt und müsste durch weiterführende Untersuchungen überprüft werden.

Im Gegensatz zur Abwesenheit von HtrA hat die Abwesenheit des ABC-Transporters ComAB, sowie des TCS ComDE, die beide für die Kompetenzinduktion essentiell sind, einen negativen Effekt auf die CiaRH-Aktivität. Dabei ist unklar, ob sich die Abwesenheit der Komponenten *per se* auf CiaRH auswirkt, oder ob sich Gene von Regulatormolekülen unter der Kontrolle von ComE oder  $\sigma^x$  befinden. Für letzteres spricht die Tatsache, dass die meisten der späten Kompetenzgene offenbar nicht für die Transformierbarkeit von *S. pneumoniae*

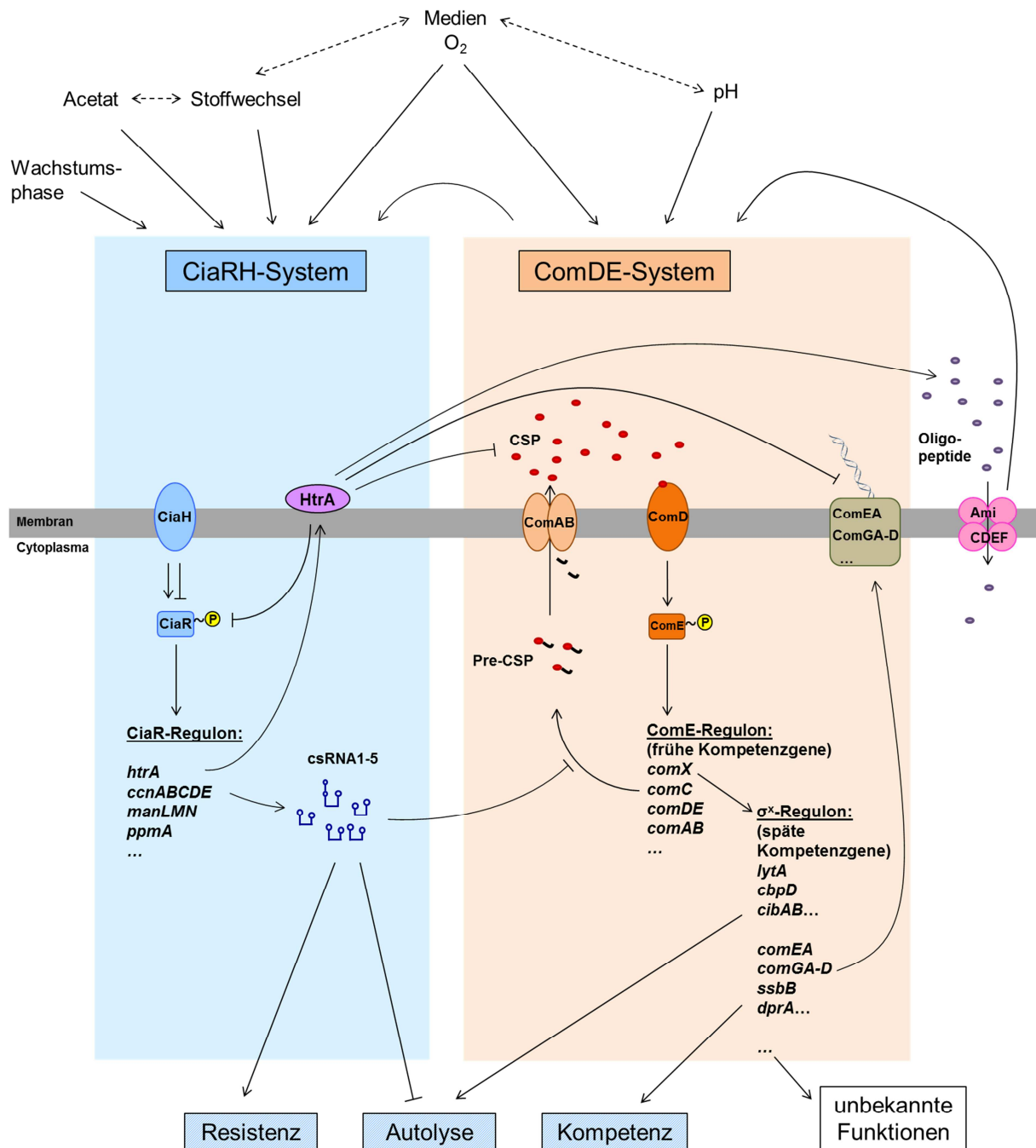
benötigt werden (Peterson *et al.*, 2004) und damit potentielle Kandidaten für andere physiologische Aufgaben sind.

Wie verschiedenste Untersuchungen gezeigt haben, wirkt sich die Aktivierung von CiaRH seinerseits auf die Kompetenz aus (Guenzi *et al.*, 1994), ebenso wie auf weitere Phänotypen (Giammarinaro *et al.*, 1999; Zähner *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2006a). Die Kompetenzregulation durch CiaRH scheint dabei primär über die kleinen regulatorischen csRNAs zu erfolgen (diese Arbeit). Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass es offenbar zu einer Interaktion der csRNAs mit der *comC*-mRNA kommt, die vermutlich die Translation von *comC* hemmt und damit die Kompetenzinduktion inhibiert (Kovács, 2009; Schnorpfeil A., persönliche Mitteilung). Auch die CiaRH-Abhängigkeit der Autolyse und der Resistenz gegen  $\beta$ -Lactamantibiotika werden größtenteils über die csRNAs vermittelt. Es wäre möglich, dass die Autolyse und eventuell auch der Resistenzphänotyp indirekt durch den Effekt der csRNAs auf die Kompetenz beeinflusst werden. Zumindest für die Autolyse ist ein möglicher Zusammenhang mit der Kompetenz beschrieben (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Moscoso und Claverys, 2004; Pinas *et al.*, 2008). Es ist jedoch auch möglich, dass diese Phänotypen über andere, bislang unbekannte Targets der csRNAs reguliert werden. Die Serinprotease HtrA ist ebenfalls ein Kompetenzeffektor, hat aber im Gegensatz zu den csRNAs keinen offensichtlichen Einfluss auf Autolyse und  $\beta$ -Lactamresistenz (diese Arbeit). Daher müssen gewisse Unterschiede in der Wirkungsweise zu den csRNAs bestehen. Eine Möglichkeit wäre, dass HtrA wie die csRNAs auch inhibitorisch auf die autokatalytische Kompetenzinduktion, z. B. durch Abbau von CSP oder unter Beteiligung der Oligopeptid-Permease AmiCDEF wirkt und die Regulation der Resistenz und Lyse durch die csRNAs über kompetenzunabhängige Wege erfolgt. Alternativ könnte HtrA aber auch eine nur spezifisch für die Kompetenz benötigte Komponente beeinflussen, beispielsweise indem es den in der Membran lokalisierten DNA-Aufnahmekomplex inhibiert, während die csRNAs durch ihren Einfluss auf sämtliche Kompetenzgene einen umfassenderen physiologischen Effekt auf Kompetenz, Resistenz und Lyse haben könnten. Die Identifikation des nach wie vor unbekanntes HtrA-Targets, über das die Serinprotease die Kompetenz beeinflusst, könnte in diesem Sachverhalt Klarheit schaffen.

Es gibt verschiedene Faktoren und Bedingungen, für die ein Effekt auf die Kompetenz beschrieben wurde und für die eine regulatorische Beteiligung von CiaRH vermutet wird. So erfolgt eine Kompetenzunterdrückung unter anderem bei niedrigem pH, Mikroaerobiosis und

in bestimmten Medien, wobei die Transformierbarkeit unter diesen Bedingungen durch Deletion von *ciaR* wiederhergestellt werden kann (Echenique *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003; Tsui *et al.*, 2010). Dies bedeutet jedoch nicht zwangsweise, dass in diesen Fällen die Inhibition auch durch CiaR vermittelt wird. So führt eine Veränderung des pH-Werts im Medium zu keiner sichtbaren Änderung der CiaR-Aktivität (eigene Daten, unveröffentlicht). Die Regulation der Kompetenz durch O<sub>2</sub> scheint durch die NADH-Oxidase vermittelt zu werden, die möglicherweise sowohl CiaRH, als auch direkt ComDE beeinflusst (Echenique und Trombe, 2001). Und auch bei den kompetenzinhibierenden Medien BHI und THB ist zwar eine gesteigerte CiaRH-Aktivität zu beobachten, diese ist jedoch zu gering, als dass sie alleine einen Kompetenzblock bewirken könnte, wie Untersuchungen an ähnlich stark aktivierenden *ciaH*-Allelen gezeigt haben (Marx P., persönliche Mitteilung). Somit ist es wahrscheinlicher, dass unter diesen Bedingungen eine Kombination aus direkter Kompetenzinhibition durch pH, O<sub>2</sub> und Medien auf der einen Seite und inhibitorischem Effekt von CiaRH (welcher durchaus ebenfalls durch besagte Bedingungen beeinflusst sein kann) auf der anderen zu einer vollständigen Kompetenzunterdrückung führen und dass bei Wegfall des CiaRH-Effekts die Inhibition durch die anderen Bedingungen nicht mehr zur vollständigen Blockierung der Kompetenz ausreicht.

Wie Abb. 5.4 verdeutlicht, handelt es sich bei CiaRH offenbar um ein hochreguliertes System, das nicht nur durch die Gene des eigenen Regulons Einfluss auf die Physiologie der Zelle nehmen kann, sondern zusätzlich durch die Verknüpfung mit anderen Regulationssystemen, wie etwa dem Kompetenzsystem mit seiner Vielzahl an regulierten Genen. Damit scheint es sich bei CiaRH um ein zentrales Regulationssystem von *S. pneumoniae* zu handeln, das auf verschiedenste Umweltbedingungen reagiert und die zelluläre Antwort steuert bzw. moduliert.



**Abb. 5.4: Schematisches Modell über die Regulation von CiaRH und die seinerseits durch die csRNAs und HtrA ausgeübten regulatorischen Effekte.** Die Abbildung zeigt die Beeinflussung von CiaRH durch verschiedenste zellinterne und externe Bedingungen, sowie die, durch die csRNAs und HtrA vermittelte, Regulation verschiedener Phänotypen (Resistenz, Autolyse, Kompetenz). Über einige der dargestellten Regulationen muss bislang noch spekuliert werden, wie beispielsweise die Frage nach dem HtrA-Target, oder ob der Einfluss der csRNAs auf die Autolyse über das Kompetenzsystem vermittelt wird oder davon unabhängig ist. Manche regulatorischen Bedingungen beeinflussen sich gegenseitig bzw. hängen voneinander ab und sind daher unter Umständen Teil des selben Regulationsweges. Diese möglichen Zusammenhänge sind durch unterbrochene Doppelpfeile gekennzeichnet. Weitere Erläuterungen: siehe Text.



## 5.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CiaRH-Aktivität bislang unbekanntem Regulationsmechanismen unterliegt, an denen Genprodukte des eigenen Regulons beteiligt sind, die aber auch von der Kompetenz ausgehen. Was das Verständnis dieser offenbar recht komplexen Regulationsmechanismen angeht, so steht die Forschung hier erst am Anfang. Weitere Analysen sind notwendig, um eine detailliertere Vorstellung der Regulationswege zu erhalten.

Für die von HtrA ausgehende Regulation konnte bisher gezeigt werden, dass sie unabhängig von CiaH, sowie dem Kompetenzsystem zu sein scheint. Aufgrund seiner externen, membranassoziierten Lokalisation wäre es vorstellbar, dass andere Zweikomponentensysteme von *S. pneumoniae* an der Informationsübertragung ins Cytoplasma beteiligt sind. Dies könnte durch Deletionsexperimente überprüft werden. Auch CiaR selbst wäre ein guter Ansatzpunkt für weitere Experimente. So ist noch nicht geklärt, welche Art der Veränderung an CiaR zu der erhöhten Genregulation in Abwesenheit von HtrA führt. Eine Unterbrechung der Autoregulation des *ciaR*-Promotors würde die künftige Analyse dieser Frage erleichtern, da dadurch eine erhöhte CiaR-Menge von einer stärkeren Phosphorylierung von CiaR zu unterscheiden wäre.

Bei dem Einfluss, den das Fehlen der Komponenten des Kompetenzsystems, ComAB und ComDE, auf die CiaR-Aktivität hat, wäre es interessant zu wissen, ob in diesem Fall die Histidinkinase CiaH regulatorisch beteiligt ist. Ebenso ist unklar, ob das Fehlen von ComAB und ComDE an sich zu der Reduktion der CiaR-Aktivität führt oder ob diese durch die Unterdrückung des X-state verursacht wird. Eine Deletion der beiden *comX*-Gene und die damit verhinderte Aktivierung der späten Kompetenzgene könnte dahingehend Klarheit schaffen. Ebenso könnten einzelne Deletionen ausgesuchter später Kompetenzgene die Beteiligung bestimmter Phänotypen, wie Kompetenz oder Lyse, deutlich machen.

Ebenfalls unklar ist bislang die Rolle der csRNAs und ManLMN an der Regulation von CiaRH. In dieser Arbeit wurde lediglich gezeigt, dass sie offenbar einen regulatorischen Einfluss haben. Weitere Untersuchungen könnten klären, ob sie möglicherweise Teil der HtrA-abhängigen oder der kompetenzabhängigen Regulationsmechanismen sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass die CiaRH-Abhängigkeit der Kompetenz, der Resistenz gegen  $\beta$ -Lactamantibiotika und des Lysephänotyps hauptsächlich durch die kleinen regulatorischen csRNAs und HtrA vermittelt wird. Die hier durchgeführten

Untersuchungen stellen einen ersten Schritt auf dem Weg zum Verständnis der Regulation der besagten Phänotypen durch CiaRH dar. Auch wenn mit *comC* ein csRNA-Target gefunden zu sein scheint, das die Kompetenzregulation erklären könnte, so ist die Frage nach der Lyse- und vor allen Dingen der Resistenzregulation noch offen. Daher ist eine Suche nach weiteren csRNA-Targets durchaus sinnvoll. Unterstützend zur bioinformatischen Zielsuche, könnten Proteom- und unter bestimmten Voraussetzungen auch Transkriptomstudien zur Identifikation von neuen csRNA-Targets beitragen. In Anbetracht der Tatsache, dass die csRNAs verschiedenste physiologische Zustände der Zelle beeinflussen, wird die Interpretation solcher Studien jedoch sicherlich eine gewisse Herausforderung darstellen, da die Identifikation von direkten Targets bei der Vielzahl von indirekt beeinflussten Genprodukten erschwert ist.

Auch die Verbindung von HtrA zu dem beeinflussten Kompetenzphänotyp ist bislang noch nicht geklärt. Aufgrund der bisherigen Kenntnisse über HtrA-Serinproteasen, ist es denkbar, dass der Effekt von HtrA von einem proteolytischen Abbau eines extrazellulären oder membranständigen Proteins ausgeht. Proteomuntersuchungen könnten daher auch für die HtrA-Targetsuche hilfreich sein und weiterführende Hinweise liefern. Ebenso wie für die csRNAs stellt jedoch auch für HtrA, aufgrund der Beeinflussung der Kompetenz und der dadurch veränderten Expression einer Vielzahl von Genen, die Interpretation einer solchen Studie vor gewisse Schwierigkeiten. Auch wenn die Identifikation direkter Targets dadurch erschwert wird, hat diese globale Methode jedoch auch ihre Vorteile. So bietet der Überblick über zelluläre Veränderungen auch die Chance bestimmte komplexe Regulationswege in ihrem ganzen Umfang zu erfassen.

Aus den Erkenntnissen dieser Arbeit ergeben sich also viele Ansätze, die Regulationswege mit und um CiaRH weiter zu entwirren. Vielleicht tragen sie dazu bei, den kompletten Umfang der Regulation und die Rolle dieses Zweikomponentensystems in der Zelle in Zukunft besser zu verstehen.

---

## 6 Literaturverzeichnis

- Abranches, J., Candella, M. M., Wen, Z. T., Baker, H. V. and Burne, R. A.** (2006). "Different Roles of EIIAB<sup>Man</sup> and EII<sup>Glc</sup> in Regulation of Energy Metabolism, Biofilm Development, and Competence in *Streptococcus mutans*." J. Bacteriol. 188: 3748-3756.
- Abranches, J., Chen, Y. Y. and Burne, R. A.** (2003). "Characterization of *Streptococcus mutans* strains deficient in EIIAB<sup>Man</sup> of the sugar phosphotransferase system." Appl. Environ. Microbiol. 69: 4760-4769.
- Ahn, S.-J., Lemos, J. A. C. and Burne, R. A.** (2005). "Role of HtrA in Growth and Competence of *Streptococcus mutans* UA159." 187: 3028-3038.
- Albanesi, D., Martin, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M. C., Haouz, A., Alzari, P. M., de Mendoza, D. and Buschiazzi, A.** (2009). "Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase." Proc Natl Acad Sci U S A 106(38): 16185-16190.
- Alloing, G., Martin, B., Granadel, C. and Claverys, J. P.** (1998). "Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease." Mol. Microbiol. 29: 75-83.
- Alves, R. and Savageau, M. A.** (2003). "Comparative analysis of prototype two-component systems with either bifunctional or monofunctional sensors: differences in molecular structure and physiological function." Mol Microbiol 48(1): 25-51.
- Ansaldi, M., Theraulaz, L. and Mejean, V.** (2004). "TorI, a response regulator inhibitor of phage origin in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A 101(25): 9423-9428.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M. and McCarty, M.** (1944). "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III." J. Exp. Med. 79: 137-158.
- Bæk, K. T., Vegge, C. S., Skórko-Glonek, J. and Brøndsted, L.** (2011). "Different contributions of HtrA protease and chaperone activities to *Campylobacter jejuni* stress tolerance and physiology." Appl Environ Microbiol 77(1): 57-66.
- Barlow, D. J. and Thornton, J. M.** (1988). "Helix geometry in proteins." J Mol Biol 201(3): 601-619.
- Bartilson, M., Marra, A., Christine, J., Asundi, J. S., Schneider, W. P. and Hromockyj, A. E.** (2001). "Differential fluorescence induction reveals *Streptococcus pneumoniae* loci regulated by competence stimulatory peptide." Mol. Microbiol. 39: 126-135.
- Baur, S., Marles-Wright, J., Buckenmaier, S., Lewis, R. J. and Vollmer, W.** (2009). "Synthesis of CDP-activated ribitol for teichoic acid precursors in *Streptococcus pneumoniae*." J Bacteriol 191(4): 1200-1210.

- Berge, M., Moscoso, M., Prudhomme, M., Martin, B. and Claverys, J. P.** (2002). "Uptake of transforming DNA in Gram-positive bacteria: a view from *Streptococcus pneumoniae*." Mol. Microbiol. 45: 411-421.
- Bick, M. J., Lamour, V., Rajashankar, K. R., Gordiyenko, Y., Robinson, C. V. and Darst, S. A.** (2009). "How to switch off a histidine kinase: crystal structure of *Geobacillus stearothermophilus* KinB with the inhibitor Sda." J Mol Biol 386(1): 163-177.
- Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R. and Simon, M. I.** (1999). "Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase." Cell 96(1): 131-141.
- Bohn, C., Rigoulay, C. and Bouloc, P.** (2007). "No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*." BMC Microbiol. 7: 10.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. 72: 246-254.
- Brückner, R., Zyprian, E. and Matzura, H.** (1984). "Expression of a chloramphenicol-resistance determinant carried on hybrid plasmids in gram-positive and gram-negative bacteria." Gene 32: 151-160.
- Buelow, D. R. and Raivio, T. L.** (2005). "Cpx signal transduction is influenced by a conserved N-terminal domain in the novel inhibitor CpxP and the periplasmic protease DegP." J Bacteriol 187(19): 6622-6630.
- Buelow, D. R. and Raivio, T. L.** (2010). "Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases." Mol Microbiol 75(3): 547-566.
- Casino, P., Rubio, V. and Marina, A.** (2009). "Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction." Cell 139(2): 325-336.
- Castelli, M. E., Garcia Vescovi, E. and Soncini, F. C.** (2000). "The phosphatase activity is the target for Mg<sup>2+</sup> regulation of the sensor protein PhoQ in *Salmonella*." J Biol Chem 275(30): 22948-22954.
- Cavard, D., Lazdunski, C. and Howard, S. P.** (1989). "The acylated precursor form of the colicin A lysis protein is a natural substrate of the DegP protease." J Bacteriol 171(11): 6316-6322.
- Caymaris, S., Bootsma, H. J., Martin, B., Hermans, P. W., Prudhomme, M. and Claverys, J. P.** (2010). "The global nutritional regulator CodY is an essential protein in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*." Mol Microbiol 78(2): 344-360.
- Chao, Y. and Vogel, J.** (2010). "The role of Hfq in bacterial pathogens." Curr. Opin. Microbiol. 13: 24-33.
- Chastanet, A., Prudhomme, M., Claverys, J. P. and Msadek, T.** (2001). "Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival." J. Bacteriol. 183: 7295-7307.

- Chen, J.-Y., Fung, C.-P., Chang, F.-Y., Huang, L.-Y., Chang, J.-C. and Siu, L. K.** (2004). "Mutations of the *rpoB* gene in rifampicin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan." J. Antimicrob. Chemother. 53: 375-378.
- Chen, J. D. and Morrison, D. A.** (1987). "Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*." J Gen Microbiol 133(7): 1959-1967.
- Clausen, T., Southan, C. and Ehrmann, M.** (2002). "The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate." Mol Cell 10(3): 443-455.
- Claverys, J. P. and Håvarstein, L. S.** (2002). "Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*." Front. Biosci. 7: d1798-1814.
- Claverys, J. P., Martin, B. and Polard, P.** (2009). "The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism." FEMS Microbiol Rev 33(3): 643-656.
- 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.
- Claverys, J. P., Prudhomme, M., Mortier-Barriere, I. and Martin, B.** (2000). "Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity?" Mol. Microbiol. 35: 251-259.
- Cole, J. N., Aquilina, J. A., Hains, P. G., Henningham, A., Sriprakash, K. S., Caparon, M. G., Nizet, V., Kotb, M., Cordwell, S. J., Djordjevic, S. P. and Walker, M. J.** (2007). "Role of group A *Streptococcus* HtrA in the maturation of SpeB protease." Proteomics 7(24): 4488-4498.
- Core, L. and Perego, M.** (2003). "TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol 49(6): 1509-1522.
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Henard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, 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: 1071-1086.
- 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): 7105-7111.
- Danese, P. N. and Silhavy, T. J.** (1998). "CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon." J Bacteriol 180(4): 831-839.
- Danese, P. N., Snyder, W. B., Cosma, C. L., Davis, L. J. and Silhavy, T. J.** (1995). "The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP." Genes Dev 9(4): 387-398.

- Dawid, S., Sebert, M. E. and Weiser, J. N.** (2009). "Bacteriocin activity of *Streptococcus pneumoniae* is controlled by the serine protease HtrA via posttranscriptional regulation." J Bacteriol 191(5): 1509-1518.
- Dowson, C. G., Hutchison, A., Brannigan, J. A., George, R. C., Hansman, D., Linares, J., Tomasz, A., Smith, J. M. and Spratt, B. G.** (1989). "Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*." Proc Natl Acad Sci U S A 86(22): 8842-8846.
- Echenique, J. R., Chapuy-Regaud, S. and Trombe, M. C.** (2000). "Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of *ciaRH* and *comCDE*." Mol. Microbiol. 36: 688-696.
- Echenique, J. R. and Trombe, M. C.** (2001). "Competence modulation by the NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae* involves signal transduction." J. Bacteriol. 183: 768-772.
- Eldholm, V., Gutt, B., Johnsborg, O., Bruckner, R., Maurer, P., Hakenbeck, R., Mascher, T. and Havarstein, L. S.** (2010). "The pneumococcal cell envelope stress-sensing system LiaFSR is activated by murein hydrolases and lipid II-interacting antibiotics." J Bacteriol 192(7): 1761-1773.
- Forst, S. A. and Roberts, D. L.** (1994). "Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria." Res Microbiol 145(5-6): 363-373.
- Gao, R. and Stock, A. M.** (2009). "Biological insights from structures of two-component proteins." Annu. Rev. Microbiol. 63: 133-154.
- Geissmann, T., Possedko, M., Huntzinger, E., Fechter, P., Ehresmann, C. and Romby, P.** (2006). "Regulatory RNAs as mediators of virulence gene expression in bacteria." Handb. Exp. Pharmacol.(173): 9-43.
- Giammarinaro, P., Sicard, M. and Gasc, A. M.** (1999). "Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal-transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae*." Microbiology 145: 1859-1869.
- Griffith, F.** (1928). "The Significance of Pneumococcal Types." J Hyg (Lond) 27(2): 113-159.
- Groban, E. S., Clarke, E. J., Salis, H. M., Miller, S. M. and Voigt, C. A.** (2009). "Kinetic buffering of cross talk between bacterial two-component sensors." J Mol Biol 390(3): 380-393.
- Guenzi, E., Gasc, A. M., Sicard, M. A. 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.
- 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: 8710-8715.

- Günzler, U.** (2010). "Die Genregulation durch den Regulator CiaR in Abwesenheit der Kinase CiaH in *Streptococcus pneumoniae*." Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Haas, W., Kaushal, D., Sublett, J., Obert, C. and Tuomanen, E. I.** (2005). "Vancomycin Stress Response in a Sensitive and a Tolerant Strain of *Streptococcus pneumoniae*." J. Bacteriol. 187: 8205-8210.
- Hakenbeck, R., Grebe, T., Zähler, D. and Stock, J. B.** (1999). "beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins." Mol. Microbiol. 33: 673-678.
- Halfmann, A.** (2008). "Identifizierung des Regulons des Zwei-Komponenten Systems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*." Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Halfmann, A., Hakenbeck, R. and Brückner, R.** (2007a). "A new integrative reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*." FEMS Microbiol. Lett. 268: 217-224.
- Halfmann, A., Kovacs, 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: 110-126.
- Halfmann, A., Schnorpfeil, A., Müller, M., Marx, P., Günzler, U., Hakenbeck, R. and Brückner, R.** (2011). "Activity of the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae* R6."
- Hanahan, D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J. Mol. Biol. 166(4): 557-580.
- Hardie, J. M. and Whiley, R. A.** (1995). "The genus *Streptococcus*. In: *The genera of lactic acid bacteria* (Hrsg. B. J. B. Wood und W. H. Holzapel)." Blackie Academic and Professional 2: 55-124.
- 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. U S A 92: 11140-11144.
- Håvarstein, L. S., Gaustad, P., Nes, I. F. and Morrison, D. A.** (1996). "Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor." Mol. Microbiol. 21: 863-869.
- 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: 1297-1037.
- He, X., Wu, C., Yarbrough, D., Sim, L., Niu, G., Merritt, J., Shi, W. and Qi, F.** (2008). "The *cia* operon of *Streptococcus mutans* encodes a unique component required for calcium-mediated autoregulation." Mol. Microbiol. 70: 112-126.
- Heintz, M.** (2006). "Das Zwei-Komponenten-System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Globale Transkriptionsanalysen und phänotypische Charakterisierungen." Dissertation, Universität Kaiserslautern.

- Hermans, P. W., Adrian, P. V., Albert, C., Estevao, S., Hoogenboezem, T., Luijendijk, I. H., Kamphausen, T. and Hammerschmidt, S.** (2006). "The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization." J. Biol. Chem. 281: 968-976.
- Hofmann, K. and Stoffel, W.** (1993). "TMbase - a database of membrane spanning protein segments." Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 166.
- 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., M, O. G., 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. and Glass, J. I.** (2001). "Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6." J. Bacteriol. 183: 5709-5717.
- Hui, F. M., Zhou, L. and Morrison, D. A.** (1995). "Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcal A secretion genes." Gene 153(1): 25-31.
- Ibrahim, Y. M., Kerr, A. R., McCluskey, J. and Mitchell, T. J.** (2004a). "Control of virulence by the two-component system CiaR/H is mediated via HtrA, a major virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*." J. Bacteriol. 186: 5258-5266.
- Ibrahim, Y. M., Kerr, A. R., McCluskey, J. and Mitchell, T. J.** (2004b). "Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*." Infect. Immun. 72: 3584-3591.
- Isaac, D. D., Pinkner, J. S., Hultgren, S. J. and Silhavy, T. J.** (2005). "The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP." Proc Natl Acad Sci U S A 102(49): 17775-17779.
- Jacques, D. A., Langley, D. B., Jeffries, C. M., Cunningham, K. A., Burkholder, W. F., Guss, J. M. and Trehwella, J.** (2008). "Histidine kinase regulation by a cyclophilin-like inhibitor." J Mol Biol 384(2): 422-435.
- Jiang, J., Zhang, X., Chen, Y., Wu, Y., Zhou, Z. H., Chang, Z. and Sui, S. F.** (2008). "Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins." Proc Natl Acad Sci U S A 105(33): 11939-11944.
- Jomaa, A., Iwanczyk, J., Tran, J. and Ortega, J.** (2009). "Characterization of the autocleavage process of the *Escherichia coli* HtrA protein: implications for its physiological role." J Bacteriol 191(6): 1924-1932.
- Jones, C. H., Bolken, T. C., Jones, K. F., Zeller, G. O. and Hruby, D. E.** (2001). "Conserved DegP protease in gram-positive bacteria is essential for thermal and oxidative tolerance and full virulence in *Streptococcus pyogenes*." Infect Immun 69(9): 5538-5545.



- Jones, C. H., Danese, P. N., Pinkner, J. S., Silhavy, T. J. and Hultgren, S. J.** (1997). "The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems." EMBO J 16(21): 6394-6406.
- Jordan, S., Hutchings, M. I. and Mascher, T.** (2008). "Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria." FEMS Microbiol. Rev. 32: 107-146.
- Kato, A. and Groisman, E. A.** (2004). "Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor." Genes Dev 18(18): 2302-2313.
- Kausmally, L., Johnsberg, 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: 4338-4345.
- Kim, D. Y. and Kim, K. K.** (2005). "Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control." J Biochem Mol Biol 38(3): 266-274.
- Kolmar, H., Waller, P. R. and Sauer, R. T.** (1996). "The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation." J Bacteriol 178(20): 5925-5929.
- Kortmann, J., Szodrok, S., Rinnenthal, J., Schwalbe, H. and Narberhaus, F.** (2011). "Translation on demand by a simple RNA-based thermosensor." Nucleic Acids Res 39(7): 2855-2868.
- Kovács, M.** (2009). "Die kleinen nichtkodierenden RNAs im Regulon des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*." Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- 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: 5797-5805.
- Kowalko, J. E. and Sebert, M. E.** (2008). "The *Streptococcus pneumoniae* competence regulatory system influences respiratory tract colonization." Infect. Immun. 76(7): 3131-3140.
- Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jimenez, H., Guazzaroni, M. E. and Ramos, J. L.** (2010). "Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals." Annu. Rev. Microbiol. 64: 539-559.
- Krojer, T., Sawa, J., Huber, R. and Clausen, T.** (2010). "HtrA proteases have a conserved activation mechanism that can be triggered by distinct molecular cues." Nat Struct Mol Biol 17(7): 844-852.
- Lacks, S. and Hotchkiss, R. D.** (1960). "A study of the genetic material determining an enzyme in Pneumococcus." Biochim. Biophys. Acta. 39: 508-518.

- Laible, G. and Hakenbeck, R.** (1987). "Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*." Mol. Microbiol. 1: 355-363.
- 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: 223-234.
- Lau, G. W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S. E., Marra, A., Bryant, A. P., McDevitt, D., Morrison, D. A. and Holden, D. W.** (2001). "A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence." Mol Microbiol 40(3): 555-571.
- Laub, M. T., Biondi, E. G. and Skerker, J. M.** (2007). "Phosphotransfer profiling: systematic mapping of two-component signal transduction pathways and phosphorelays." Methods Enzymol 423: 531-548.
- Laub, M. T. and Goulian, M.** (2007). "Specificity in two-component signal transduction pathways." Annu. Rev. Genet. 41: 121-145.
- Lee, M. S. and Morrison, D. A.** (1999). "Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation." J Bacteriol 181(16): 5004-5016.
- Leonard, T. A., Moller-Jensen, J. and Lowe, J.** (2005). "Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 360(1455): 523-535.
- Lipinska, B., Zylicz, M. and Georgopoulos, C.** (1990). "The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase." J Bacteriol 172(4): 1791-1797.
- Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J. F., 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D. P. and Romeo, T.** (1997). "The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*." J Biol Chem 272(28): 17502-17510.
- Luo, P., Li, H. and Morrison, D. A.** (2003). "ComX is a unique link between multiple quorum sensing outputs and competence in *Streptococcus pneumoniae*." Mol Microbiol 50(2): 623-633.
- Luo, P., Li, H. and Morrison, D. A.** (2004). "Identification of ComW as a new component in the regulation of genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*." Mol. Microbiol. 54: 172-183.
- Luo, P. and Morrison, D. A.** (2003). "Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*." J Bacteriol 185(1): 349-358.
- Lux, T., Nuhn, M., Hakenbeck, R. and Reichmann, P.** (2007). "Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*." J Bacteriol 189(21): 7741-7751.

- Lyon, W. R. and Caparon, M. G.** (2004). "Role for serine protease HtrA (DegP) of *Streptococcus pyogenes* in the biogenesis of virulence factors SpeB and the hemolysin streptolysin S." Infect Immun 72(3): 1618-1625.
- Maes, M. and Messens, E.** (1992). "Phenol as grinding material in RNA preparations." Nucleic Acids Res 20(16): 4374.
- Marina, A., Mott, C., Auyzenberg, A., Hendrickson, W. A. and Waldburger, C. D.** (2001). "Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism." J Biol Chem 276(44): 41182-41190.
- Marina, A., Waldburger, C. D. and Hendrickson, W. A.** (2005). "Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein." EMBO J 24(24): 4247-4259.
- Marmur, J.** (1961). "A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms." J. Mol. Biol. 3: 202-218.
- Martin, B., Prudhomme, M., Alloing, G., Granadel, C. and Claverys, J. P.** (2000). "Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*." Mol. Microbiol. 38: 867-878.
- Marx, P., Nuhn, M., Kovacs, M., Hakenbeck, R. and Brückner, R.** (2010). "Identification of genes for small non-coding RNAs that belong to the regulon of the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus*." BMC Genomics 11: 661.
- Mascher, T.** (2001). "Das *cia*-Regulon von *Streptococcus pneumoniae*." Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- 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 mutations in *pbp2x* involved in beta-lactam resistance." J. Bacteriol. 188: 1959-1978.
- Mascher, T., Helmann, J. D. and Uden, G.** (2006b). "Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases." Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70: 910-938.
- 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: 60-70.
- McCluskey, J., Hinds, J., Husain, S., Witney, A. and Mitchell, T. J.** (2004). "A two-component system that controls the expression of pneumococcal surface antigen A (PsaA) and regulates virulence and resistance to oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*." Mol. Microbiol. 51: 1661-1675.
- Meltzer, M., Hasenbein, S., Hauske, P., Kucz, N., Merdanovic, M., Grau, S., Beil, A., Jones, D., Krojer, T., Clausen, T., Ehrmann, M. and Kaiser, M.** (2008). "Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control." Angew Chem Int Ed Engl 47(7): 1332-1334.

- Merai, M.** (2003). "Analyse von Zielgenen des Zwei Komponenten Systems CiaRH aus *Streptococcus pneumoniae*." Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Miller, J. H.** (1972). "Experiments in molecular genetics." New York, Cold Spring Harbor Press.
- Mitrophanov, A. Y. and Groisman, E. A.** (2008). "Signal integration in bacterial two-component regulatory systems." Genes Dev 22(19): 2601-2611.
- Mohamedmohaideen, N. N., Palaninathan, S. K., Morin, P. M., Williams, B. J., Braunstein, M., Tichy, S. E., Locker, J., Russell, D. H., Jacobs, W. R., Jr. and Sacchettini, J. C.** (2008). "Structure and function of the virulence-associated high-temperature requirement A of *Mycobacterium tuberculosis*." Biochemistry 47(23): 6092-6102.
- Moscoso, M. and Claverys, J. P.** (2004). "Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA." Mol. Microbiol. 54: 783-794.
- Moscoso, M., Domenech, M. and Garcia, E.** (2010). "Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide." Mol. Microbiol. 77: 1052-1064.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.** (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1: 263-273.
- Nakano, S., Nakano, M. M., Zhang, Y., Leelakriangsak, M. and Zuber, P.** (2003). "A regulatory protein that interferes with activator-stimulated transcription in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A 100(7): 4233-4238.
- Ng, W. L., Tsui, H. C. and Winkler, M. E.** (2005). "Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*." J. Bacteriol. 187: 7444-7459.
- Nieto, C., Puyet, A. and Espinosa, M.** (2001). "MalR-mediated regulation of the *Streptococcus pneumoniae* malMP operon at promoter PM. Influence of a proximal divergent promoter region and competition between MalR and RNA polymerase proteins." J. Biol. Chem. 276(18): 14946-14954.
- Ninfa, A. J., Ninfa, E. G., Lupas, A. N., Stock, A., Magasanik, B. and Stock, J.** (1988). "Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon: evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A 85(15): 5492-5496.
- Ottolenghi, E. and Hotchkiss, R. D.** (1962). "Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration." J. Exp. Med. 116: 491-519.

- Overweg, K., Kerr, A., Sluijter, M., Jackson, M. H., Mitchell, T. J., de Jong, A. P., de Groot, R. and Hermans, P. W.** (2000). "The putative proteinase maturation protein A of *Streptococcus pneumoniae* is a conserved surface protein with potential to elicit protective immune responses." Infect. Immun. 68: 4180-4188.
- Parkinson, J. S. and Kofoid, E. C.** (1992). "Communication modules in bacterial signaling proteins." Annu Rev Genet 26: 71-112.
- Perego, M. and Brannigan, J. A.** (2001). "Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases." Peptides 22(10): 1541-1547.
- Pestova, E. V., Håvarstein, L. S. and Morrison, D. A.** (1996). "Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system." Mol. Microbiol. 21: 853-862.
- Peters, K.** (2009). "Promotoridentifikation und Expressionsanalyse von Genen der Penicillinbindenden Proteine in *S. pneumoniae* R6." Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- 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: 1051-1070.
- Piñas, G. E., Cortes, P. R., Orio, A. G. and Echenique, J.** (2008). "Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*." Microbiology 154: 1300-1308.
- Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R. J., McDonald, N., Wood, N. W., Martins, L. M. and Downward, J.** (2007). "The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1." Nat Cell Biol 9(11): 1243-1252.
- Poquet, I., Saint, V., Seznec, E., Simoes, N., Bolotin, A. and Gruss, A.** (2000). "HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing." Mol Microbiol 35(5): 1042-1051.
- Price, N. L. and Raivio, T. L.** (2009). "Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100." J Bacteriol 191(6): 1798-1815.
- Raivio, T. L. and Silhavy, T. J.** (1997). "Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system." J Bacteriol 179(24): 7724-7733.
- Raivio, T. L. and Silhavy, T. J.** (2001). "Periplasmic stress and ECF sigma factors." Annu Rev Microbiol 55: 591-624.
- Ramirez-Peña, E., Treviño, J., Liu, Z., Perez, N. and Sumby, P.** (2010). "The group A *Streptococcus* small regulatory RNA FasX enhances streptokinase activity by increasing the stability of the *ska* mRNA transcript." Mol Microbiol 78(6): 1332-1347.

- Renart, J., Reiser, J. and Stark, G. R.** (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." Proc Natl Acad Sci U S A 76(7): 3116-3120.
- Repoila, F. and Darfeuille, F.** (2009). "Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects." Biol Cell 101(2): 117-131.
- Rogers, P. D., Liu, T. T., Barker, K. S., Hilliard, G. M., English, B. K., Thornton, J., Swiatlo, E. and McDaniel, L. S.** (2007). "Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin." J. Antimicrob. Chemother. 59: 616-626.
- Romby, P. and Charpentier, E.** (2010). "An overview of RNAs with regulatory functions in gram-positive bacteria." Cell Mol Life Sci 67(2): 217-237.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). "Molecular Cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schäfer, F.** (2007). "Das Zwei-Komponenten System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Der Einfluss der CiaRH regulierten Gene auf die genetische Kompetenz." Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Sebert, M. E., Palmer, L. M., Rosenberg, M. 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: 4059-4067.
- Sebert, M. E., Patel, K. P., Plotnick, M. and Weiser, J. N.** (2005). "Pneumococcal HtrA protease mediates inhibition of competence by the CiaRH two-component signaling system." J. Bacteriol. 187: 3969-3979.
- Silvaggi, J. M., Perkins, J. B. and Losick, R.** (2005). "Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*." J. Bacteriol. 187(19): 6641-6650.
- Skerker, J. M., Perchuk, B. S., Siryaporn, A., Lubin, E. A., Ashenberg, O., Goulian, M. and Laub, M. T.** (2008). "Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems." Cell 133(6): 1043-1054.
- Skorko-Glonek, J., Wawrzynow, A., Krzewski, K., Kurpierz, K. and Lipinska, B.** (1995). "Site-directed mutagenesis of the HtrA (DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures." Gene 163(1): 47-52.
- Song, Y., Peisach, D., Pioszak, A. A., Xu, Z. and Ninfa, A. J.** (2004). "Crystal structure of the C-terminal domain of the two-component system transmitter protein nitrogen regulator II (NRII; NtrB), regulator of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*." Biochemistry 43(21): 6670-6678.

- Spiess, C., Beil, A. and Ehrmann, M.** (1999). "A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein." Cell 97(3): 339-347.
- 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.
- Stock, A. M., Robinson, V. L. and Goudreau, P. N.** (2000). "Two-component signal transduction." Annu. Rev. Biochem. 69: 183-215.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J. and Stock, A. M.** (1989). "Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria." Microbiol Rev 53(4): 450-490.
- 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: 5190-5196.
- Sung, C. K. and Morrison, D. A.** (2005). "Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*." J Bacteriol 187(9): 3052-3061.
- Tanaka, T., Saha, S. K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M. B., Yamazaki, T., Ono, A. M., Kainosho, M., Inouye, M. and Ikura, M.** (1998). "NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ." Nature 396(6706): 88-92.
- 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. and Burnham, M. K.** (2000). "A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*." Mol. Microbiol. 35: 566-576.
- Tipper, D. J. and Strominger, J. L.** (1965). "Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine." Proc Natl Acad Sci U S A 54(4): 1133-1141.
- Tomasz, A. and Mosser, J. L.** (1966). "On the nature of the pneumococcal activator substance." Proc Natl Acad Sci U S A 55: 58-66.
- Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S. K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Kurokawa, H., Qian, H., Inouye, M. and Ikura, M.** (1999). "Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ." Nat Struct Biol 6(8): 729-734.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A 76(9): 4350-4354.
- Tsui, H. C., Mukherjee, D., Ray, V. A., Sham, L. T., Feig, A. L. and Winkler, M. E.** (2010). "Identification and characterization of noncoding small RNAs in *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 strain D39." J. Bacteriol. 192: 264-279.

- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M. and Udesen, C.** (2004). "The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions." Mol. Microbiol. 51: 1525-1533.
- Waters, L. S. and Storz, G.** (2009). "Regulatory RNAs in bacteria." Cell 136: 615-628.
- Ween, O., Gaustad, P. and Håvarstein, L. S.** (1999). "Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*." Mol. Microbiol. 33: 817-827.
- Weng, L., Biswas, I. and Morrison, D. A.** (2009). "A self-deleting Cre-loxP-ermAM cassette, cheshire, for marker-less gene deletion in *Streptococcus pneumoniae*." Appl. Environm. Microbiol.: in press.
- West, A. H. and Stock, A. M.** (2001). "Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems." Trends Biochem. Sci. 26: 369-376.
- Wolfe, A. J.** (2005). "The acetate switch." Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69: 12-50.
- Wolfe, A. J.** (2010). "Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction." Curr. Opin. Microbiol. 13: 204-209.
- Yamaichi, Y. and Niki, H.** (2000). "Active segregation by the *Bacillus subtilis* partitioning system in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A 97(26): 14656-14661.
- Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R. and Ishihama, A.** (2005). "Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*." J Biol Chem 280(2): 1448-1456.
- Yang, Y. and Inouye, M.** (1991). "Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A 88(24): 11057-11061.
- Yanisch-Perron, P., Vieira, J. and Messing, J.** (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene 33: 103-119.
- Zähler, D.** (1999). "Identifizierung von Zielgenen des signaltransduzierenden Zwei-Komponenten-Systems *cia* von *Streptococcus pneumoniae*." Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Zähler, D., Kaminski, K., van der Linden, M., Mascher, T., Meral, M. and Hakenbeck, R.** (2002). "The *ciaR/ciaH* regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*." J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4: 211-216.
- Zerfass, I.** (2009). "PBP2x-Mutationen in *Streptococcus pneumoniae*: Auswirkungen auf  $\beta$ -Laktam-Resistenz und Zellphysiologie." Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Zhang, J. R., Idanpaan-Heikkila, I., Fischer, W. and Tuomanen, E. I.** (1999). "Pneumococcal *licD2* gene is involved in phosphorylcholine metabolism." Mol. Microbiol. 31: 1477-1488.



## 7 Anhang

Hier sind die Sequenzen der in Kapitel 3.2.17 und 3.2.18 beschriebenen Deletionskonstrukte spr0931::*aad9* und *parB*::*cat* dargestellt.

```

                                931up_for >
                                GCTGGCTATA AAGCTTACCG CGTTCATC
cttccttttt gctggctata aagcttaccg cgttcatcaa gatgtcaaac aagtcacgac
gaaggaaaaa cgaccgatat ttcgaatggc gcaagtagtt ctacagtttg ttcagtactg
>.....spr0930.....>
v f l f a g y k a y r v h q d v k q v m

ctatcaaccc atggtgcgag aaatggtgag tgaaaaagac accccagcaa acgaagagct
gatagttggg taccacgctc tttacaactc actttttctg tggggtcggt tgcttctcga
>.....spr0930.....>
t y q p m v r e m l s e k d t p a n e e

tgtgcttgct atgatttata ctgaaacaaa aggaaaagaa ggcgatgta tgcagtctag
acacgaacga tactaaatat gactttgttt tccttttctt ccgctacaat acgtcagatc
>.....spr0930.....>
l v l a m i y t e t k g k e g d v m q s

tgagtctgca agtggttcca ccaacaccat caatgataat gcctctagca ttcggcaagg
actcagacgt tcaccaaggt ggttgtggta gttactatta cggagatcgt aagccgttcc
>.....spr0930.....>
s e s a s g s t n t i n d n a s s i r q

cattcaaact ctgacaggca atctctatct ggcgcagaag aaggggtgag atatctggac
gtaagtttga gactgtccgt tagagataga ccgctcttc ttcccacatc tatagacctg
>.....spr0930.....>
g i q t l t g n l y l a q k k g v d i w

agctgttcaa gcctataatt ttggacctgc ctatatcgat tttatcgccc aaaatggcaa
tcgacaagtt cggatattaa aacctggacg gatatagcta aaatagcggg ttttaccgtt
>.....spr0930.....>
t a v q a y n f g p a y i d f i a q n g

ggaaaatacc ttggctctag ccaaacagta ctctcgtgag actggtgccc ccttgcttgg
ccttttatgg aaccgagatc ggtttgtcat gagagcactc tgacaacggg ggaacgaacc
>.....spr0930.....>
k e n t l a l a k q y s r e t v a p l l

taataggact ggaaagactt atagttatat tcacccatt tccatttttc acggtgctga
attatcctga cctttctgaa tatcaatata agtggggtaa aggtaaaaag tgccacgact
>.....spr0930.....>
g n r t g k t y s y i h p i s i f h g a

actctatgta aatggaggaa actattatta ttctagacag gtacgactta acctttacat
tgagatacat ttacctcctt tgataataat aagatctgtc catgctgaat tggaatgta
>.....spr0930.....>
e l y v n g g n y y y s r q v r l n l y

catcaaagt ttcactctct tttcaacatc tggctagacc aggtgttttt gttataagtt
gtagtttaca aagtgagaga aaagttgtag accgatctgg tccacaaaaa caatattcaa
>.....spr0930.....>
i i k c f t l f s t s g -

```

```

< 931up_rev
CT TCATTTCTCTC CTTTAAGGGA TACTTATGTA
spec-for
ATGAATACAT
ttctttaaga tagatatatt actctaaaga agtaaaggag gaaattccct atgaatacat
aagaaattct atctatataa tgagatttct tcatttctct ctttaagga tacttatgta

```

```

>>.aad9..>
m n t

```

```

931up_rev
TGCTTGTTTA ATTATTTTAC
spec-for >
ACGAACAAAT TAATAAAGTG
acgaacaaat taataaagtg aaaaaaatac ttcggaaaca tttaaaaaat aaccttattg
tgcttgttta attatttcac ttttttatg aagccttctg aaatttttta ttggaataac
>.....aad9.....>
y e q i n k v k k i l r k h l k n n l i

```

```

gtacttacat gtttgatca ggagttgaga gtggactaaa accaaatagt gatcttgact
catgaatgta caaacctagt cctcaactct cacctgattt tggtttatca ctagaactga
>.....aad9.....>
g t y m f g s g v e s g l k p n s d l d

```

```

ttttagtcgt cgtatctgaa ccattgacag atcaaagtaa agaaatactt atacaaaaaa
aaaatcagca gcatagactt ggtaactgct tagtttcatt tctttatgaa tatgtttttt
>.....aad9.....>
f l v v v s e p l t d q s k e i l i q k

```

```

ttagacctat ttcaaaaaaa ataggagata aaagcaactt acgatatatt gaattaacaa
aatctggata aagttttttt tatctcttat tttcgttgaa tgctatataa cttaattggt
>.....aad9.....>
i r p i s k k i g d k s n l r y i e l t

```

```

ttattattca gcaagaaatg gtaccgtgga atcatcctcc caaacaagaa tttatttatg
aataataagt cgttctttac catggcacct tagtaggagg gtttgttctt aaataaatac
>.....aad9.....>
i i i q q e m v p w n h p p k q e f i y

```

```

gagaatgggtt acaagagctt tatgaacaag gatacattcc tcagaaggaa ttaaattcag
ctcttaccaa tgttctcgaa atacttgctc ctatgtaagg agtcttcctt aatttaagtc
>.....aad9.....>
g e w l q e l y e q g y i p q k e l n s

```

```

atthaacat aatgctttac caagcaaac gaaaaataa aagaatatac ggaaattatg
taaattggta ttacgaaatg gttcgttttg cttttttatt ttcttatatg ctttaatac
>.....aad9.....>
d l t i m l y q a k r k n k r i y g n y

```

```

acttagagga attactacct gatattccat tttctgatgt gagaagagcc attatggatt
tgaatctctt taatgatgga ctataaggta aaagactaca ctcttctcgg taatacctaa
>.....aad9.....>
d l e e l l p d i p f s d v r r a i m d

```

```

cgtcagagga attaatagat aattatcagg atgatgaaac caactctata ttaactttat
gcagtctcct taattatcta ttaatagtcc tactactttg gttgagatat aattgaaata
>.....aad9.....>
s s e e l i d n y q d d e t n s i l t l

```

```

gccgtatgat ttttaactatg gacacgggta aatcatacc aaaagatatt gcgggaaatg
cggcatacta aaattgatac ctgtgcccac tttagtatgg ttttctataa cgccctttac
>.....aad9.....>
c r m i l t m d t g k i i p k d i a g n

```

```

cagtggctga atcttctcca ttagaacata gggagagaat tttgtagca gttcgtagtt
gtcaccgact tagaagaggt aatcttgtat ccctctctta aaacaatcgt caagcatcaa
>.....aad9.....>
a v a e s s p l e h r e r i l l a v r s

```

< spec-rev

GATAT TTGATAAATT

931down\_for

CTATA AACTATTTAA

```

atcttggaga gaatattgaa tggactaatg aaaatgtaaa ttttaactata aactatttaa
tagaacctct cttataactt acctgattac ttttacattt aaattgatat ttgataaatt
>.....aad9.....>
y l g e n i e w t n e n v n l t i n y l

```

spec-rev

TATTGTCTAA TTTTTTTAAT ATT

931down\_for >

ATAACAGATT AAAAAAATTA TAAGGGAAAT CTGACAGAAG AAGATATCC

```

ataacagatt aaaaaaatta taagggaaat ctgacagaag aagatatccg caagattggt
tattgtctaa tttttttaat attcccttta gactgtcttc ttctataggc gttcctaaca
>.....aad9.....>>
n n r l k k l -

```

>>.....'spr0931.....>

g k s d r r r y p q d c

```

gaagatacct taaaaaatta caaacttgat caggtcataa caggaaacca gatcaatatc
cttctatgga attttttaat gtttgaacta gtccagtatt gtcctttggt ctagttatag
>.....'spr0931.....>
- r y l k k l q t - s g h n r k p d q y

```

```

atcatcaatt ttgccttgaa tctctcaaag agtgatatcc tcagcaatgc agatttctact
tagtagttaa aacggaactt agagagtttc tcaactatagg agtcggttacg tctaaagtga
>.....'spr0931.....>
h h q f c l e s l k e - y p q q c r f h

```

```

aaaaccttaa atgaccttaa acaaagcadc gtatcacaag ctggcgacag ttttaaaaat
ttttggaatt tactggaatt tgtttogtag catagtgttc gaccgctgtc aaaattttta
>.....'spr0931.....>
- n l k - p - t k h r i t s w r q f - k

```

```

atcaacctta actttgattc ggataaggcg ctagaggacg gtggtaactt cttaagctcc
tagttggaat tgaaactaag cctattccgc gatctcctgc caccattgaa gaattcgagg
>.....'spr0931.....>
y q p - l - f g - g a r g r w - l l k l

```

```

ctctggcaag cccttgtcaa cttcttcaag agttttggtt cttagaat ttcattggtat
gagaccgttc ggaacagtt gaagaagttc tcaaaaccaa gaattcttta aagtaccata
>.....'spr0931.....>>
p l a s p c q l l q e f w f l

```

```
aatggatggt aaccgtaacg ttgccgtcct ttttgcggc caatagaaag agaaaagaat
ttacctacca ttggcattgc aacggcagaa aaaacagccg gttatctttc tcttttctta
spr0932 >>
```

```
gttaaagaaa aatgatattg tagaagttga aattgttgat ttgacccatg aaggggcagg
caatttcttt ttactataac atcttcaact ttaacaacta aactgggtac ttccccgtcc
>.....spr0932'.....>
m l k k n d i v e v e i v d l t h e g a
```

```
agttgccaaag gtagatggtt tggctttttt tgtagagaat gctttaccga gtgaaaaaat
tcaacggttc catctaccaa accagaaaaa acatctctta cgaaatggct cactttttta
>.....spr0932'.....>
g v a k v d g l v f f v e n a l p s e k
```

```
tctcatgcgt gtcctcaagg tcaataaaaa gattggcttt ggaaaagttg aaaaatacct
agagtacgca caggagttcc agttatcttt ctaaccgaaa ccttttcaac tttttatgga
>.....spr0932'.....>
i l m r v l k v n k k i g f g k v e k y
```

< 931down\_rev

GCG

```
tgtccagtca ccacaccgta atcaagatct agatttggtt tacctgcgtt caggaatcgc
acaggtcagt ggtgtggcat tagttctaga tctaaaccga atggacgcaa gtccttagcg
>.....spr0932'.....>
l v q s p h r n q d l d l a y l r s g i
```

931down\_rev

CCTAAATCCT GTGGAAAGAA TAGGTCTTGT CG

```
ggatttagga cacctttctt atccagaaca gctcaagttt aaaaccaagc aagtcaagga
cctaaatcct gtggaaagaa taggtcttgt cgagttcaaa ttttggttcg ttcagttcct
>.....spr0932'.....>
a d l g h l s y p e q l k f k t k q v k
```

**Abb. A1: Sequenz des Deletionskonstrukts spr0931::aad9 mit der umgebenden Genregion.** Die Sequenz und Annotation der Resistenzkassette *aad9* ist rot hervorgehoben. Die zur Konstruktion verwendeten Primer (blau) sind an den entsprechenden Hybridisierungsbereichen angegeben und ihre Sequenzen sind gelb hinterlegt.

```

parBup_for >
GAGA AACTGCTATT GCCATCGGTA GCC
ctgtaggaga aactgctatt gccatcggta gcccggttagg ttctgaatat gcaaatactg
gacatcctct ttgacgataa cggtagccat cgggcaatcc aagacttata cgtttatgac
>.....'htrA.....>
t v g e t a i a i g s p l g s e y a n t

tcaactcaagg tategtatcc agtctcaata gaaatgtatc cttaaaatcg gaagatggac
agtgagttcc atagcatagc tcagagttat ctttacaatag gaatttttagc cttctacctg
>.....'htrA.....>
v t q g i v s s l n r n v s l k s e d g

aagctatttc tacaaaagcc atccaaactg atactgctat taaccaggt aactctggcg
ttcgataaag atgttttcgg taggtttgac tatgacgata attgggtcca ttgagaccgc
>.....'htrA.....>
q a i s t k a i q t d t a i n p g n s g

gccactgat caatattcaa gggcaggta tcggaattac ctcaagtaaa attgctacaa
cgggtgacta gttataagtt cccgtccaat agccttaatg gagttcattt taacgatgtt
>.....'htrA.....>
g p l i n i q g q v i g i t s s k i a t

atggaggaac atctgtagaa ggtcttggtt tcgcaattcc tgcaaatgat gctatcaata
tacctccttg tagacatctt ccagaaccaa agcggttaagg acgtttacta cgatagttat
>.....'htrA.....>
n g g t s v e g l g f a i p a n d a i n

ttattgaaca gttagaaaaa aacggaaaag tgacgcgtcc agctttggga atccagatgg
aataacttgt caatcttttt ttgccttttc actgcgcagg tcgaaaccct taggtctacc
>.....'htrA.....>
i i e q l e k n g k v t r p a l g i q m

ttaatttata taatgtgagt acaagcgaca tcagaagact caatattcca agtaatgta
aattaaatag attacactca tgttcgctgt agtcttctga gttataaggt tcattacaat
>.....'htrA.....>
v n l s n v s t s d i r r l n i p s n v

catctgggtg aattgttcgt tcggtacaaa gtaatatgcc tgccaatggt caccttgaaa
gtagaccaca ttaacaagca agccatgttt cattatacgg acggttacca gtggaacttt
>.....'htrA.....>
t s g v i v r s v q s n m p a n g h l e

aatagatgt aattacaaaa gtatagaca aagagattgc ttcatcaaca gacttacaaa
ttatgctaca ttaatgtttt catctactgt ttctctaacg aagtagttgt ctgaatgttt
>.....'htrA.....>
k y d v i t k v d d k e i a s s t d l q

gtgctcttta caaccattct atcggagaca ccattaagat aacctactat cgtaacggga
cagagaaaat gttggaaga tagcctctgt ggtaattcta ttggatgata gcattgccct
>.....'htrA.....>
s a l y n h s i g d t i k i t y y r n g

aagaagaac tacctctatc aaacttaaca agagttcagg tgatttagaa tottaattga
ttcttctttg atggagatag tttgaattgt tctcaagtcc actaaatctt agaattaact
>.....'htrA.....>>
k e e t t s i k l n k s s g d l e s -

```

```

                                < parBup_rev
                                CTC TTTTCTACAC AATCACATCC TCCTTAAATA
                                cat-for
                                AGG AGGAATTTAT
catctatgta aagaaagctt tacataagag aaaagatgtg ttagtgtag aggaatttat
gtagatacat ttctttcgaa atgtattctc ttttctacac aatcacatcc tccttaaata

                                parBup_rev
                                TATACTGAAA ATTATAATAG
cat-for >
                                ATATGAC
                                atatgacttt taatattatc aaattagaaa attgggatag aaaagaatat tttgaacact
                                tatactgaaa attataatag tttaatcttt taaccctatc ttttcttata aaacttgtga
                                >>.....cat.....>
                                m t f n i i k l e n w d r k e y f e h

                                attttaacca gcaaactacg tatagcatta ctaaagaaat tgatattact ttgtttaaag
                                taaaattggt cgtttgatgc atactgtaat gatttcttta actataatga aacaaatttc
                                >.....cat.....>
                                y f n q q t t y s i t k e i d i t l f k

                                atatgataaa aaagaaagga tatgaaattt atccttcttt gatttatgca attatggaag
                                tatactatct tttctttcct atactttaaa taggaagaaa ctaaatacgt taataccttc
                                >.....cat.....>
                                d m i k k k g y e i y p s l i y a i m e

                                ttgtaaataa aaataaagtg tttagaacag gaattaatag tgagaataaa ttaggctatt
                                aacatttatt tttatctcac aaatcttgtc cttaattatc actcttattt aatccgataa
                                >.....cat.....>
                                v v n k n k v f r t g i n s e n k l g y

                                gggataagtt aaatcctttg tatacagttt ttaataagca aactgaaaaa tttactaaca
                                ccctattcaa tttaggaaac atatgtcaaa aattattcgt ttgacttttt aatgattgt
                                >.....cat.....>
                                w d k l n p l y t v f n k q t e k f t n

                                tttggactga atctgataac aacttcactt ctttttataa taattataaa aatgacttgt
                                aaacctgact tagactattg ttgaagtga gaaaaatatt attaataatt ttactgaaca
                                insertion
                                >.....cat.....>
                                i w t e s d n n f t s f y n n y k n d l

                                ttgaatataa agataaagaa gaaatgtttc ctaaaaaacc gatacctgaa aacaccatac
                                aacttatatt tctatctctt ctttacaag gattttttgg ctatggactt ttgtggtatg
                                >.....cat.....>
                                f e y k d k e e m f p k k p i p e n t i

                                cgatttcaat gattccttgg attgatttta gttcatttaa tttaaacatt ggtaacaata
                                gctaaagtta ctaaggaacc taactaaaat caagtaaatt aaatttgtaa ccattgttat
                                >.....cat.....>
                                p i s m i p w i d f s s f n l n i g n n

```

```
gcagcttttt attgcctatt attacgatag gtaaatttta tagtgagaat aataaaattt
cgctgaaaaa taacggataa taatgctatc catttaaaat atcactctta ttattttaaa
>.....cat.....>
s s f l l p i i t i g k f y s e n n k i
```

```
atataccagt tgccttacag cttcatcatg ctgtatgtga tggttacat gcttcattat
tatatggtca acggaatgtc gaagtagtac gacatacact accaatggta cgaagtaata
>.....cat.....>
y i p v a l q l h h a v c d g y h a s l
```

```

                < parB-Bam_rev
CTA TATTAATTAT TCCATCTACT AACCTAAATC CCTAGGAGAA
```

```
                < cat-rev
```

```
                CCATCTACT AACCTAAATC
```

```
                parB-Bam_for
```

```
                TTGGATTTAG GGATCCTCTT
```

```
ttataaatga atttcaagat ataattaata aggtagatga ttggatttag ggatcctctt
aatatttact taaagttcta tattaattat tccatctact aacctaaatc cctaggagaa
>.....cat.....>>
f i n e f q d i i n k v d d w i -
```

```
parB-Bam_rev
```

```
AATAAA
```

```
parB-Bam_for >
```

```
TTATTTTTTT ATCTCACAAG GTTATCC
```

```
ttatTTTTTT atctcacaag gttatccact atgtTTTTcg ataaaaagct taataaatca
aataaaaaaa tagagtgttc caataggtga tacaaaaagc tattTTTTcga attatttagt
```

```
ataatttctt cttttatccc caacctgtgg ataaagtttg gtaacattgt ggattatttt
tattaaagaa gaaaataggg gttggacacc tatttcaaac cattgtaaca cctaataaaaa
```

```
tcacagcttg tggaaaattc ttgctatcta tggtaaata tctctagtat taaactttta
agtgtcgaac accttttaag aacgatagat accattttat agagatcata atttgaaaat
```

```
aatagtaaag gaggagaaag gattgaaaga aaaacaattt tggaaatcgta tattagaatt
ttatcatttc ctcctctttc ctaactttct ttttggttaa accttagcat ataacttta
>>.....dnaA'.....>
l k e k q f w n r i l e
```

```
tgcacaagaa agactgactc gatccatgta tgatttctat gctattcaag ctgaacttat
acgtgttctt tctgactgag ctaggtacat actaaagata cgataagttc gacttgaata
>.....dnaA'.....>
f a q e r l t r s m y d f y a i q a e l
```

```
caaggtagag gaaaatggtg ccactatatt tctacctcgc tctgaaatgg aaatggtctg
gttccatctc cttttacaac ggtgatataa agatggagcg agactttacc tttaccagac
>.....dnaA'.....>
i k v e e n v a t i f l p r s e m e m v
```

```
ggaaaaacaa ctaaagata ttattgtagt agctggtttt gaaatttatg acgtgaaat
cctttttggt gattttctat aataacatca tcgacaaaaa cttaaatac tgcgacttta
>.....dnaA'.....>
w e k q l k d i i v v a g f e i y d a e
```

```
aactccccac tatattttca ccaaactca agatacgact agctcacaag ttgaagaagc
ttgaggggtg atataaaagt ggtttggagt tctatgctga tcgagtgttc aacttcttcg
>.....dnaA'.....>
i t p h y i f t k p q d t t s s q v e e
```

```

tacaaattta actctttatg actatagtcc aaagttagta tctattcctt attcagatac
atgtttaaat tgagaaatac tgatatcagg tttcaatcat agataaggaa taagtctatg
>.....dnaA'.....>
a t n l t l y d y s p k l v s i p y s d

gggattaata gaaaagtata cttttgataa ctttattcaa ggggatggaa atgtttgggc
ccctaatttt cttttcatat ggaaactatt gaaataagtt cccctacctt tacaaacccg
>.....dnaA'.....>
t g l k e k y t f d n f i q g d g n v w

tgtatcagcc gcttttagctg tctctgaaga tttggctctg acctataacc ctctttttat
acatagtcgg cgaaatcgac agagacttct aaaccgagac tggatattgg gagaaaaata
>.....dnaA'.....>
a v s a a l a v s e d l a l t y n p l f

< parBdown_rev
CCTCCT GGTCCGGAAC CATTCTGAGT G
ctatggagga ccaggccttg gtaagactca cttattaaac gctattggaa atgaaattct
gatacctcct ggtccggaac cattctgagt gaataatttg cgataacctt tactttaaga
>.....dnaA'.....>
i y g g p g l g k t h l l n a i g n e i

```

**Abb. A2: Sequenz des Deletionskonstrukts *parB::cat* mit der umgebenden Genregion.** Die Sequenz und Annotation der Resistenzkassette *cat* ist rot hervorgehoben. Die zur Konstruktion verwendeten Primer (blau) sind an den entsprechenden Hybridisierungsbereichen angegeben und ihre Sequenzen sind gelb hinterlegt.



## Danksagung

Im Laufe der vergangenen Jahre gab es Menschen, die mich fachlich und persönlich unterstützt haben und damit nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ihnen möchte ich hier danken.

Vielen Dank an Prof. Dr. Regine Hakenbeck für die Überlassung des Themas, die fachlichen Diskussionen und das Interesse an meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. John A. Cullum für die Übernahme der Zweitkorrektur, sowie an Prof. Dr. Matthias Hahn für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Reinhold Brückner für seine Unterstützung in allen praktischen und theoretischen Fragen und seine stete Bereitschaft zu endlosen Diskussionen über die „Irrungen und Wirrungen“ von CiaRH.

Danken möchte ich auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die zur angenehmen Arbeitsatmosphäre im Labor beigetragen haben.

Ein besonderer Dank geht dabei an Anke, Julia, Tina und Uli für die moralische Unterstützung an Tagen, an denen im Labor nichts klappen wollte und für den gemeinsamen Kampf gegen den inneren Schweinehund nach Feierabend.

Danke auch an Patrick, Anke, Katharina, Márta, Alexander und viele weitere Ehemalige sowie Praktikanten für die Bereitstellung von Konstrukten, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

Besonders danken möchte ich meiner und Andreas' Familie, für die Unterstützung und den Rückhalt, die einem auch an nicht so guten Tagen Kraft geben.

Andreas bin ich ausgesprochen dankbar für seine Unterstützung in den letzten Monaten, die sicherlich nicht die einfachsten waren und in denen er mir immer den Rücken freigehalten hat. Außerdem möchte ich ihm dafür danken, dass er immer für mich da war und ist, für unser schönes gemeinsames Leben und für unsere „Luftschlösser“ (mit Garten).

# Lebenslauf

## Persönliche Informationen

Name: Miriam Müller  
Anschrift: Hauptstraße 124  
66851 Queidersbach  
Geburtsdatum: 29.06.83  
Geburtsort: Landstuhl  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

## Schul- und Berufsausbildung

seit 01/2008 Technische Universität Kaiserslautern  
wissenschaftliche Mitarbeiterin zur Promotion in der Abteilung  
Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie

2002 – 2007 Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Studium der Biologie (Schwerpunkte: Mikrobiologie, Biophysik,  
Biochemie, Botanik)  
Abschluss: Diplom  
Thema der Diplomarbeit: „Funktionskomplementierung des  
Fumaratsensors DcuS von *Escherichia coli* durch Hybriddimere“

1993 – 2002 Sickingengymnasium Landstuhl  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1989 – 1993 Grundschule Queidersbach