

Die Steuerung der Aktivität des Response Regulators CiaR des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*

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

von

Dipl.-Biol. Patrick Marx

Datum der wissenschaftlichen Aussprache
15.02.2013

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

Kaiserslautern, 2013

D386

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

Kaiserslautern, Februar 2013

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
2.2 Zwei-Komponenten Systeme in Bakterien.....	6
2.3 Das Zwei-Komponenten System CiaRH.....	11
2.4 Die β -Lactamresistenz in <i>S. pneumoniae</i> und der Einfluss des CiaRH Systems.....	17
2.5 Crosstalk bei Zwei-Komponenten Systemen und die Rolle von Acetylphosphat.....	21
2.6 Der Stoffwechsel von <i>S. pneumoniae</i> : Pyruvatmetabolismus und die Synthese von Acetylphosphat.....	25
2.7 Zielsetzung dieser Arbeit	28
3 Material und Methoden	30
3.1 Bakterienstämme	30
3.2 Plasmide	33
3.3 Oligonukleotide	33
3.4 Nährmedien.....	35
3.4.1 C+Y-Medium	35
3.4.2 Modifizierte C+Y-Medien	36
3.4.3 D-Blutagar.....	37
3.4.4 BHI-Medium	38
3.4.5 LB-Medium und LB-Agar.....	38
3.5 Kultivierung und Konservierung von Bakterien.....	38
3.5.1 Bakterienwachstum.....	38
3.5.2 Stammkonservierung	39
3.5.3 Mikroskopie.....	40
3.6 Transformation von <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6.....	40
3.6.1 Herstellung kompetenter Zellen	40
3.6.2 Transformation von <i>S. pneumoniae</i>	40
3.6.3 Bestimmung der Transformationseffizienz	41
3.7 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	42
3.7.1 Herstellung kompetenter Zellen	42
3.7.2 Transformation.....	43
3.8 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	44
3.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
3.9 Bestimmung der β -Lactam Suszeptibilität von <i>S. pneumoniae</i>	46

3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
Überlappende PCR	49
3.11 Agarosegelelektrophorese	51
3.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	52
3.13 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	53
3.14 Sequenzierung von DNA.....	54
3.15 Analyse von Expressionssignalen in <i>S. pneumoniae</i>	55
3.15.1 Das Reporterplasmid pPP2 und seine Derivate.....	55
3.15.2 Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität.....	57
3.16 Bestimmung der Acetylphosphatkonzentration in <i>S. pneumoniae</i>	59
3.17 Proteinbestimmung nach Bradford.....	61
3.18 Darstellung von <i>S. pneumoniae</i> -Stämmen mit verändertem <i>ciaH</i> -Allel	62
3.19 Darstellung von <i>S. pneumoniae</i> -Stämmen mit Deletionen im Acetylphosphat-syntheseweg .	63
4. Ergebnisse.....	65
4.1 Die <i>ciaH</i> -Allele klinischer Isolate von <i>S. pneumoniae</i>	65
4.1.1 Identifizierung neuer <i>ciaH</i> -Allele in klinischen Pneumokokkenisolaten	66
4.1.2 Der Einfluss der klinischen <i>ciaH</i> -Allele auf die CiaR-abhängige Promotoraktivität.....	68
4.1.3 Der Einfluss der klinischen <i>ciaH</i> -Allele auf die Suszeptibilität gegen β -Lactamantibiotika..	71
4.1.4 Der Einfluss der klinischen <i>ciaH</i> -Allele auf die Entwicklung der Kompetenz	74
4.1.5 Der Einfluss der klinischen <i>ciaH</i> -Allele auf das Wachstum von <i>S. pneumoniae</i>	76
4.2 Die Aktivierung von CiaR	78
4.2.1 Die CiaR-Aktivität und die Rolle des Syntheseweges von Acetylphosphat	79
4.2.2 Der Einfluss des SpxB-Pta-AckA-Weges auf die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität	88
4.2.3 Die Rolle des SpxB-Pta-AckA-Weges in Abhängigkeit der Wachstumsphase	94
4.2.4 Die Rolle von Acetylphosphat.....	98
4.2.5 Versuche zur Doppeldeletion von <i>ciaH</i> und <i>ackA</i> in <i>S. pneumoniae</i> R6	104
4.2.6 Der Einfluss der C-Quelle auf die CiaR-Aktivität.....	108
4.2.7 Der Einfluss von Acetat auf die CiaR Aktivität	113
4.2.8 Der Einfluss des Wachstumsmediums.....	121
4.3 Acetat und die durch klinische <i>ciaH</i> -Allele vermittelte CiaR-Aktivität	125
5. Diskussion.....	130
5.1 Acetylphosphat, die alternative Phosphatquelle für CiaR.....	130
5.2 Synthetische Lethalität durch die Kombination von <i>ackA</i> - und <i>ciaH</i> -Deletion	134
5.3 Der Einfluss von Acetat.....	137
5.4 Die besondere Rolle der Acetatkinase	140
5.5 Die Korrelation der AcP-Menge mit der Aktivierung von CiaR.....	142

5.6 Die physiologische Bedeutung von Acetylphosphat auf das CiaRH-System	144
5.7 Die Regulation der CiaR-Aktivität - eine Bestandsaufnahme	148
5.8 Auswirkungen der <i>ciaH</i> -Mutationen klinischer Pneumokokken-Isolate.....	151
5.9 Ausblick.....	158
6. Literaturverzeichnis.....	160
7. Anhang.....	176
Publikationen.....	189
Vielen Dank!	190
Lebenslauf	191

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung	OD	Optische Dichte
AcP	Acetylphosphat	ONP	o-Nitrophenol
ADP	Adenindiphosphat	ONPG	o-Nitrophenol-β-D-Galaktopyranosid
A	Adenin	P	Phosphat / Prolin / Promotor
Ala	Alanin	p.a.	pro analysi
AS	Aminosäure	PBP	Penicillin-bindendes Protein
Asp	Aspartat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	pPP	Promotor Probe Plasmid
bp	Basenpaar	Q	Glutamin
BHI	Brain Heart Infusion	Rif	Rifampin
Blast	Basic Local Alignment Search Tool	RNA	Riobonukleinsäure
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)	RR	Response Regulator
Bzgl	bezüglich	RT	Raumtemperatur
°C	Grad Celsius	s	Sekunde
C	Cytosin / Kohlenstoff	S	Serin
CoA	Coenzym A	SK	Sensorkinase
CSP	Competence stimulating peptide	T	Threonin/Thymin
D	Aspartat	Tab	Tabelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TCS	Zweikomponentensystem
DNAse	Desoxyribonuklease	TE	Tris-EDTA
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	THB	Todd Hewitt Broth
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TM	Transmembrandomäne
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß	T _m	Schmelztemperatur der Nukleinsäuren
EtBr	Ethidiumbromid	TPP	Thiamindiphosphat
EtOH	Ethanol	Tris	Trihydroxymethylaminoethan
FAD	Flavinadenindinukleotid	U	β-Galaktosidase-Units
g	Gramm	UpM	Umdrehungen pro Minute
G	Guanin	UV	Ultraviolett
Glc	Glucose	V	Valin / Volt
Gal	Galactose	Vol	Volumen
Gln	Glutamin	wt	Wildtyp
Glu	Glutamat	Y	Yeast (Hefe) / Tyrosin
h	Stunde	z.b.	Zum Beispiel
H/His	Histidin		
I	Isoleucin		
K	Lysin		
kb	Kilobasenpaar		
l	Liter		
Lac	Lactose		
Mg	Magnesium		
mg	Milligram		
µg	Mikrogram		
MHK	Minimale Hemmkonzentration		
min	Minute		
ml	Milliliter		
N	Asparagin		
NaAc	Natriumacetat		
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid		
NCBI	National Center for Biotechnology Information		
nm	Nanometer		

1. Zusammenfassung

Das Zwei-Komponenten System CiaRH beeinflusst mit der β -Lactamresistenz, Kompetenz, Autolyse, Bakteriocinproduktion und Virulenz eine Vielzahl an Phänotypen in *Streptococcus pneumoniae* und ist daher von großer physiologischer Bedeutung. Es setzt sich aus der membrangebundenen Sensorkinase CiaH und dem cytoplasmatisch lokalisierten Response Regulator CiaR zusammen. Das CiaRH System ist unter sehr vielen Wachstumsbedingungen aktiv. CiaH ist allerdings für die Aktivierung von CiaR unter bestimmten Bedingungen verzichtbar. CiaR ist jedoch in seiner phosphorylierten Form aktiv, was die Frage nach einer alternativen Phosphatquelle für CiaR aufwirft. Der sog. Crosstalk durch eine fremde Sensorkinase oder niedermolekulare Phosphodonoren wie Acetylphosphat stellen mögliche Wege zur alternativen Phosphorylierung von CiaR dar.

Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden Gene des Acetylphosphat-Stoffwechsels inaktiviert, was zu einer Änderung der Produktion von Acetylphosphat führen sollte. Anschließende Messungen der zellulären Acetylphosphatmenge und der CiaR-abhängigen Promotoraktivitäten in Abwesenheit der Sensorkinase CiaH zeigten klar, dass mit sinkendem Acetylphosphat auch die CiaR-vermittelte Genexpression reduziert wurde. Diese Korrelation legt den Schluss nahe, dass Acetylphosphat tatsächlich den wesentlichen alternativen Phosphodonor für CiaR darstellt. Allerdings wurden auch Hinweise für geringfügigen Crosstalk durch eine andere Sensorkinase erhalten. Im Zuge dieser Experimente ergab sich weiterhin, dass ein Enzym des Acetylphosphat-Stoffwechsels, die Acetatkinase, eine besondere Rolle bei der alternativen Phosphorylierung von CiaR spielt. Eine Reihe von Befunden legt den Schluss nahe, dass Acetatkinase und CiaR möglicherweise interagieren. Eine solche regulatorische Rolle der Acetatkinase ist bisher nicht beschrieben.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die CiaR-Aktivität durch die Bifunktionalität von CiaH auf nahezu konstantem Niveau gehalten wird. Dabei kann wahrscheinlich Acetat, ein exkretiertes Endprodukt des Acetylphosphat-Stoffwechsels, zur Stimulierung der Phosphataseaktivität von CiaH dienen. Dies könnte von physiologischer Bedeutung sein, um eine von Acetylphosphat ausgehende Phosphorylierung von CiaR durch Acetat im Medium durch Dephosphorylierung zu begrenzen. Somit könnten Acetylphosphat und Acetat Gegenspieler zur Regulation der CiaR-Aktivität darstellen.

Einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde auf die Auswirkungen von Mutationen in CiaH auf die CiaR-Aktivität eingegangen. Das CiaRH-System wurde als erste Nicht-PBP-Resistenzdeterminante in β -lactamresistenten Labormutanten von *S. pneumoniae* R6 entdeckt, wobei eine Mutation im Sensorkinasegen *ciaH* (*ciaH306*, T230P) eine Erhöhung der CiaR-abhängigen Genexpression vermittelte. Weitere *ciaH*-Mutationen wurden in anderen spontanresistenten Labormutanten

beschrieben. Die Laborallele vermitteln eine Steigerung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität zwischen vier- und 26-fach. Phänotypische Folgen sind die Verringerung der β -Lactamsuszeptibilität, der Verlust der Kompetenz und verändertes Wachstum von *S. pneumoniae* R6.

Im Zuge dieser Arbeit wurden zum ersten Mal veränderte *ciaH*-Allele in klinischen Pneumokokken-Isolaten identifiziert und charakterisiert. Es zeigte sich eine Verbreitung in Isolaten der Serotypen 6, 7, 9, 19 und 23. Im Gegensatz zu den Laborallelen vermitteln die klinischen Allele eine bis zu dreifache Erhöhung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität. Lediglich das Allel *ciaHTpVT* beeinflusst die Phänotypen β -Lactamresistenz und Kompetenz. Weiterhin erfolgte die Charakterisierung der Kinase- und Phosphataseaktivitäten der klinischen *ciaH*-Allele. Hierbei zeigten sich Abweichungen der Stärken beider Funktionen, wobei für *ciaH306* ein Phosphatasedefekt festgestellt wurde.

2. Einleitung

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

Bei *Streptococcus pneumoniae* handelt es sich um einen weltweit verbreiteten Krankheitserreger, der als Ursache für Krankheiten wie Lungen-, Mittelohr- und Hirnhautentzündung sowie Endokarditis gilt. Erstmals beschrieben wurde *S. pneumoniae* von Louis Pasteur und George Miller Sternberg, die diese auch als Pneumokokken bezeichnete Bakterienart 1881 unabhängig voneinander entdeckten. Das natürliche Habitat von Pneumokokken ist der Nasen- und Rachenraum von Menschen, den sie kommensal besiedeln. Bei Menschen mit schwachem oder noch nicht voll entwickeltem Immunsystem wie Kindern, älteren oder kranken Menschen, kann *S. pneumoniae* als opportunistisches Pathogen agieren und Krankheitssymptome verursachen (Mitchell, 2003). Neuere Untersuchungen zeigten, dass Pneumokokken auch andere Säugetiere als Wirt besiedeln können. Neben Isolaten aus Tieren, die in der Nähe von Menschen leben und durch Kontakt mit Menschen wahrscheinlich infiziert werden, sind auch Isolate aus wildlebenden Tieren beschrieben (Chi *et al.*, 2007; Denapaita & Hakenbeck, 2011; van der Linden *et al.*, 2009).

Phylogenetisch betrachtet gehört *S. pneumoniae*, wie alle Streptokokken, im Stamm der Firmicutes zur Gruppe der grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (ca. 40 %). Morphologisch handelt es sich hierbei um ovalförmige Kokken mit einem Durchmesser von 0,5 – 1,5 µm. Diese können paarweise oder in kurzen Ketten auftreten, woher auch die frühere Bezeichnung *Diplococcus pneumoniae* herrührt. Auf Blutagarplatten besitzen Kolonien dieser Bakterienart einen Durchmesser von ca. 1 mm und α -hämolytisches Verhalten. Hierbei handelt es sich um eine unvollständige Hämolyse, bei der das Hämoglobin der Erythrozyten zu Methämoglobin reduziert wird, ohne dabei die Erythrozyten zu zerstören. Dies zeigt sich als grünliche Zone um die Bakterienkolonie. Das Hämolyseverhalten stellt zudem eine klassische Möglichkeit zur Unterscheidung der einzelnen Arten von Streptokokken dar (Brown, 1919). Streptokokken, die wie *S. pneumoniae* α -Hämolyse zeigen, unterscheiden sich dabei zum einen von Streptokokken, die die Fähigkeit zur echten Hämolyse besitzen, zum anderen von denen ohne hämolytisches Verhalten. Bei der als β -Hämolyse bezeichneten echten Hämolyse werden die Erythrozyten durch die gebildeten Exotoxine zerstört, was durch eine klare Zone um die Kolonien sichtbar wird. Streptokokken, die keine Hämolyse zeigen, werden als γ -hämolytisch bezeichnet.

Große Bedeutung für die Molekularbiologie erlangte *S. pneumoniae* durch die Mausversuche von Frederick Griffith in den 1920er Jahren. Anhand dieses Organismus wurde zum ersten Mal das Prinzip

der Transformation gezeigt (Griffith, 1928). Griffith isolierte Pneumokokken, die keine Kapsel ausbildeten. Er stellte fest, dass diese apathogen waren, da Mäuse eine Injektion mit kapsellosen Pneumokokken überlebten. Ebenfalls überlebten Mäuse eine Injektion mit bekapselten, aber hitzeinaktivierten Pneumokokken. Die Mäuse starben hingegen nach der Injektion lebender, kapselloser Pneumokokken zusammen mit abgetöteten, bekapselten Pneumokokken und aus ihrem Blut konnten lebende Pneumokokken mit Kapsel isoliert werden. Diese führten nach Injektion wiederum zum Tod der Mäuse. Griffith zeigte somit, dass eine Substanz, die die Eigenschaft zur Kapselbildung verleiht, in die unbekapselten Pneumokokken übertragen wurde. Ein weiterer Meilenstein für die Molekularbiologie stellten die Versuche von Oswald Avery, Colin MacLeod und Maclyn McCarty dar. Sie führten die Experimente von Griffith fort und zeigten, dass es sich bei der übertragenen Substanz zur Verleihung der Kapselbildung um DNA handelt (Avery *et al.*, 1944). Dies lieferte einen maßgeblichen Beitrag zur Identifizierung der DNA als Träger der Erbinformation und führte zur Überzeugung der Kritiker, die diese Funktion den Proteinen zuschrieben (Sicard *et al.*, 2000).

Die Untersuchung der Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* war mit diesen Versuchen beginnend bis heute das Gebiet intensiver Forschung. So konnte gezeigt werden, dass der als Kompetenz bezeichnete Zustand, in dem *S. pneumoniae* transformierbar ist, von einer Reihe von Bedingungen abhängt. Die Kompetenzentwicklung ist abhängig von der Zelldichte, von extra- und intrazellulären Einflüssen sowie von Umweltbedingungen wie dem Wachstumsmedium, dem pH-Wert und der Sauerstoffkonzentration (Chen & Morrison, 1987a; Echenique *et al.*, 2000; Tomasz & Hotchkiss, 1964). Gesteuert wird die Kompetenz in *S. pneumoniae* von einem autokatalytischen Quorum Sensing System durch ein Peptidpheromon, das Kompetenz stimulierende Peptid (CSP), welches mit dem Zwei-Komponenten System ComDE interagiert und nach Erreichen eines Schwellenwertes die Kompetenzentwicklung induziert (Håvarstein *et al.*, 1995; Pestova *et al.*, 1996). ComDE reguliert wiederum die Expression von Genen zur Aufnahme der extrazellulären DNA (Claverys *et al.*, 2006). Zelluläre Einflüsse, die die Kompetenz beeinflussen, sind regulatorische Systeme wie Oligopeptid-Permeasen (Alloing *et al.*, 1998), Proteasen (Chastanet *et al.*, 2001), Oxidasen (Echenique & Trombe, 2001a) sowie Zwei-Komponenten Systeme (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Echenique & Trombe, 2001b).

Auch heute noch zählt *S. pneumoniae* zu den bedeutendsten Krankheitserregern für Menschen und wird jährlich für über eine Million Todesfälle verantwortlich gemacht (Ramos-Montanez *et al.*, 2010). Wichtigster Virulenzfaktor von Pneumokokken ist die Polysaccharidkapsel, die als Schutzhülle agiert und vor der Immunreaktion des Wirts schützt sowie die Anheftung an die Wirtsoberfläche ermöglicht. Die Polysaccharidkapsel zeigt eine hohe Variabilität in ihrer Zusammensetzung und stellt

dadurch ein Unterscheidungsmerkmal innerhalb der Gruppe der Pneumokokken dar. Anhand ihr erfolgte eine Einteilung in Serotypen und Serogruppen (Bentley *et al.*, 2006). Bisher sind 92 verschiedene Serotypen beschrieben (Cornick & Bentley, 2012). Die Mausexperimente von Griffith wurden mit einem Stamm des Serotyps 2 durchgeführt. Hierbei handelte es sich um ein pathogenes Isolat eines Patienten aus dem Jahre 1916, *S. pneumoniae* D39 (Bentley, 2008). Der in dieser Arbeit für experimentelle Untersuchungen verwendete Stamm *S. pneumoniae* R6 ist ein unbekapselter, avirulenter Nachfahre des von Griffith verwendeten *S. pneumoniae* D39. Dieser Stamm wurde über mehrere Schritte im Labor selektioniert: Avery und Mitarbeiter isolierten zur Aufklärung des Transformationsprinzips das besser zu transformierende Derivat R36A aus *S. pneumoniae* D39, eine bzgl. Morphologie und Transformierbarkeit stabile Variante von R36. Dies erfolgte durch Anzucht des Stammes D39 über 36 Durchgänge in einem Medium mit Antiserum für Pneumokokken (Avery *et al.*, 1944). Die Variante R36A ist der Vorläufer von *S. pneumoniae* R6 (Ottolenghi & Hotchkiss, 1962). Während *S. pneumoniae* R6 heute standardmäßig als Laborstamm zur Untersuchung zellulärer Prozesse Verwendung findet, wird *S. pneumoniae* D39 als Modellorganismus zur Untersuchung der Pathogenität eingesetzt.

Die hohe Anzahl an Serotypen, die genetische Heterogenität von Pneumokokken und die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen in Pneumokokken bedeuten für die Erforschung und Bekämpfung der Pneumokokken eine große Herausforderung. So stellt jede Infektion des Wirtsorganismus mit einem neuen Serotyp für dessen Immunsystem einen neuen Krankheitserreger dar. Zudem weisen Pneumokokken ein unterschiedliches Krankheitspotenzial auf. Verschiedene Serotypen zeigen sich als besonders pathogen, andere treten eher als Kommensale auf (Henriques-Normark & Normark, 2010). Die Entstehung von Antibiotikaresistenzen benötigt neben der Erforschung der Resistenzdeterminanten auch die Suche nach neuen Zielen für Antibiotika. Die Entwicklung und Einführung von Impfstoffen zur Bekämpfung von Pneumokokken erzielte lediglich mäßigen Erfolg, da jeweils nur ein Teil der bekannten Serotypen abgedeckt wurde und zudem Pneumokokken aufgrund ihrer Fähigkeit zur DNA-Aufnahme in der Lage sind Serotypen auszutauschen (Mitchell, 2000; Sham *et al.*, 2012).

Einen bedeutenden Beitrag zum genaueren Verständnis von *S. pneumoniae* erzielte in den letzten Jahren die Genomsequenzierung. Neben der Sequenzierung der Genome der beiden Modellorganismen, D39 und R6 (Hoskins *et al.*, 2001; Lanie *et al.*, 2007), erfolgt zunehmend die Sequenzierung klinischer Pneumokokkenisolate. Momentan sind 14 Pneumokokkengenome vollständig sequenziert, weitere, über 100 Genome, sind in Bearbeitung (Stand März 2012, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Dies könnte zu Fortschritten bei der Identifizierung der Faktoren führen, die einen harmlosen Stamm vom gefährlichen Krankheitserreger unterscheiden (Mitchell & Mitchell, 2010).

2.2 Zwei-Komponenten Systeme in Bakterien

Mit Hilfe von Zwei-Komponenten Systemen (TCS) sind Bakterien in der Lage mit ihrer Umgebung zu kommunizieren und sich rasch ändernden Umweltbedingungen anzupassen. Signale und Stimuli aus der Umgebung können von TCS verarbeitet und in eine zelluläre Antwort umgewandelt werden. Somit können Bakterien auf eine Vielzahl chemischer und physikalischer Reize aus der Umgebung reagieren. Aufgrund der hohen Diversität der Umgebungsbedingungen von Bakterien ist die Anzahl der Stimuli, die von TCS wahrgenommen werden, enorm. Zwei-Komponenten Systeme können Temperaturunterschiede, Änderungen in der Lichtintensität, Osmolarität, pH-Wert oder Sauerstoffkonzentration wahrnehmen. Des Weiteren werden vorhandene Nährstoffe oder chemische Lockstoffe von TCS erkannt. Auch schädliche Substanzen wie Antibiotika oder Komponenten des Immunsystems können als Stimuli dienen. Zudem wird die Kommunikation mit gleichen Artgenossen über Quorumsignale und eine Erkennung von Organismen anderer Gattungen durch TCS ermöglicht. Die Bakterien reagieren nach Wahrnehmung dieser Substanzen mit Änderungen im Stoffwechsel, der Beweglichkeit, Zellintegrität oder durch Abwehrreaktionen (Laub & Goulian, 2007; Mascher *et al.*, 2006b). Auch die Regulation der Virulenz eines pathogenen Organismus (Gao & Stock, 2009), wie z.B. bei *S. pneumoniae*, kann über TCS vermittelt werden.

Zwei-Komponenten Systeme wurden zum ersten Mal 1986 in Bakterien beschrieben (Ninfa & Magasanik, 1986; Nixon *et al.*, 1986). Mittlerweile sind sie auch in Archaeobakterien und Eukaryonten wie Pilzen und Pflanzen identifiziert worden, wo sie an Entwicklungsprozessen wie der Hyphenbildung bei Pilzen oder der Fruchtreife bei der Tomate beteiligt sind. Jedoch existieren sie nicht in Tieren, weshalb sie zu interessanten Forschungsobjekten zur Identifizierung neuer Antibiotika wurden (Stock *et al.*, 2000; West & Stock, 2001). Inzwischen ist eine große Anzahl dieser Systeme in nahezu allen Bakterienarten bekannt und näher charakterisiert. Mit Ausnahme der *Mycoplasma*-Spezies sind TCS in allen Bakterien vorhanden (Mascher *et al.*, 2006b). Die Anzahl der TCS in den jeweiligen Bakterien variiert jedoch. Durchschnittlich besitzen Bakterien 52 TCS (Cock & Whitworth, 2007). Die Anzahl der TCS in einem Organismus kann mit seinem Lebensraum und seiner Lebensweise zusammenhängen. So sind in dem parasitär lebenden Bakterium *Borrelia burgdorferi* vier TCS beschrieben (Fraser *et al.*, 1997), während in dem Fruchtkörper bildenden Bodenbakterium *Myxococcus xanthus* 272 Gene identifiziert wurden, die zu Zwei-Komponenten Systemen gehören (Shi *et al.*, 2008). *S. pneumoniae*, mit dem Nasen- und Rachenraum des Menschen als natürliches Habitat, besitzt 13 komplette TCS und einen einzelnen Response Regulator (Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000).

Klassische Zwei-Komponenten Systeme bestehen aus einer membrangebundenen Sensorkinase (SK) und einem cytoplasmatisch lokalisierten Response Regulator (RR). Die Sensorkinase erkennt die Stimuli und überträgt diese Information an den Response Regulator, der die zelluläre Antwort durchführt (Gao & Stock, 2009). Sensorkinasen bestehen aus einer N-terminalen Sensordomäne und einer C-terminalen Autokinasedomäne. Beide Domänen sind durch eine meist konservierte Linkerregion, der eine bedeutende Rolle zur korrekten Signalübertragung zugeschrieben wird, miteinander verbunden (Krell *et al.*, 2010).

Die Sensordomänen von SK weisen untereinander eine hohe Variabilität auf, jedoch sind die Autokinasedomänen von SK weitestgehend gut konserviert. Die Autokinasedomäne ist stets cytoplasmatisch lokalisiert und wird unterteilt in die DHP-Domäne (dimerization and histidine phosphotransfer) und die katalytisch aktive CA-Domäne (catalytic and ATP-binding). In der DHP-Domäne befindet sich der konservierte Histidinrest, an dem die ATP-abhängige Autophosphorylierung stattfindet (Abb. 2.1). Der Sequenzbereich um dieses Histidin wird auch als H-Box bezeichnet. Die CA-Domäne ist für die Bindung von ATP verantwortlich und die Übertragung der γ -Phosphorylgruppe des ATPs an die DHP-Domäne, wodurch es zur Phosphorylierung des Histidins kommt und damit zur Aktivierung der Sensorkinase. In der CA-Domäne befinden sich ebenfalls gut konservierte Sequenzbereiche, die in Boxen zusammengefasst werden (N, G1, F, G2) und vermutlich eine katalytisch aktive Mulde bilden, in die das ATP gebunden wird (Gao & Stock, 2009; West & Stock, 2001). Sensorkinasen liegen in der Regel als Homodimere vor. Die Phosphorylierungsreaktion an SK kann sowohl *in cis* als auch *in trans* ablaufen, d.h. CA- und DHP-Domäne gehören zum selben oder anderen Monomer der SK. Der Grund für die unterschiedliche Phosphorylierungsart der SK ist weitgehend ungeklärt, jedoch wird der Struktur der DHP-Domäne eine wichtige, aber nicht die alleinige Rolle zugeschrieben (Casino *et al.*, 2010).

Aufgrund der hohen Diversität an Sensordomänen und wahrgenommenen Stimuli können diese in drei große Gruppen eingeteilt werden (Mascher *et al.*, 2006b). Bei Sensorkinasen der größten Gruppe, die zugleich auch als klassische Sensorkinasen bezeichnet werden, ist die Sensordomäne extrazellulär lokalisiert und wird von zwei Transmembrandomänen flankiert. Die Signaltransduktion findet in diesem Fall über die Membran statt. Zu dieser Gruppe gehört z.B. die Sensorkinase EnvZ aus *E. coli*, die zu einer der am besten untersuchten SK zählt und ein Musterbeispiel von SK darstellt. Die zweite Gruppe der SK besitzt zwei bis 20 Transmembrandomänen, die über kurze intra- und extrazelluläre Bereiche miteinander verbunden sind und keine offensichtliche extrazelluläre Sensordomäne besitzen. In diesem Fall ist die Sensordomäne membrangelagert und befindet sich in der Transmembranregion. In der dritten Gruppe der Sensorkinasen befindet sich die Sensordomäne im Cytoplasma. Allgemein sind Sensorkinasen entweder in der Membran verankert und die

Sensordomäne liegt cytoplasmatisch vor oder sie sind löslich und komplett im Cytoplasma lokalisiert (Cheung & Hendrickson, 2010; Gao & Stock, 2009; Mascher *et al.*, 2006b).

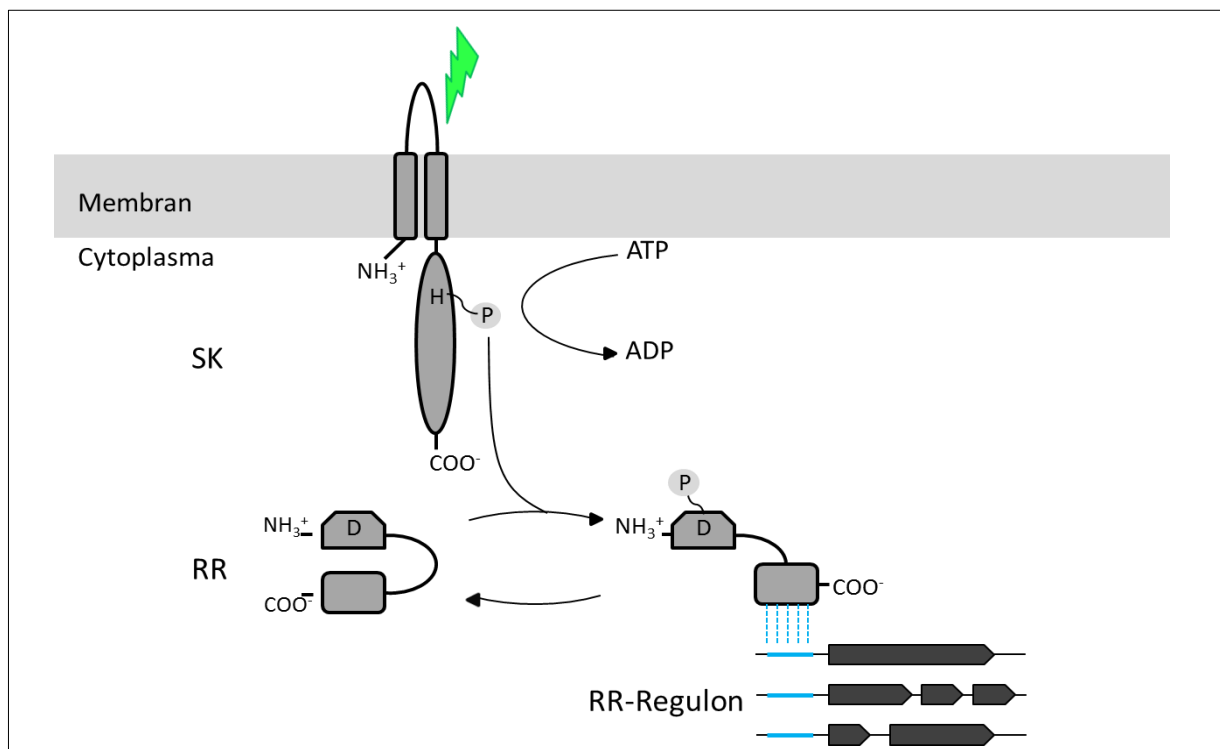


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Signaltransduktion eines klassischen Zwei-Komponenten Systems. Zur besseren Übersicht sind jeweils monomere Strukturen dargestellt: Die membrangebundene Sensorkinase (SK) nimmt einen Stimulus (grün) wahr, wodurch eine ATP-abhängige Autophosphorylierung am konservierten Histidinrest katalysiert wird. Die SK überträgt den Phosphatrest auf den konservierten Aspartatrest in der Receiverdomäne des Response Regulators (RR). Durch die Phosphorylierung geht der RR in seine aktive Konformation über. In seiner aktiven Form reguliert er die Transkription von Genen, in dem er an eine spezifische Erkennungssequenz im Promotorbereich (blau) bindet. Die Deaktivierung des RR erfolgt durch eine hydrolytische Dephosphorylierungsreaktion.

Obwohl oftmals bekannt ist, auf welche Stimuli Sensorkinasen ihre Aktivität ändern, fehlt in den meisten Fällen die Identifizierung des exakten Signals. So ist z.B. für das TCS EnvZ/OmpR aus *E. coli* bekannt, dass es als Antwort auf Änderungen in der Osmolarität die Expression von Porinen in der Membran reguliert. Das Signalmolekül und die Art und Weise der Signalerkennung von EnvZ konnte bisher jedoch nicht geklärt werden, auch aufgrund der unklaren Rolle seiner periplasmatischen Domäne (Krell *et al.*, 2010). Hinweise und Fortschritte zur Identifizierung von Signalmolekülen lieferte in der letzten Zeit die Strukturaufklärung einiger Sensorkinasen. So konnte die Struktur der Sensordomäne von CitA, einer Sensorkinase mit regulatorischer Funktion beim anaeroben Citratmetabolismus in *Klebsiella pneumoniae*, mit und ohne Citrat in Lösung gebracht werden. An- und Abwesenheit von Citrat äußerte sich in strukturellen Änderungen von CitA, so dass Citrat eine aktivierende Rolle zugeschrieben wurde (Sevvana *et al.*, 2008). Ein weiteres Beispiel einer

Sensorkinase, für die ein Signal bekannt ist, ist TodS von *Pseudomonas putida*, die dort eine Rolle beim Toluolmetabolismus spielt. Sie bindet monoaromatische Verbindungen (Busch *et al.*, 2007).

Neuere Untersuchungen in *E. coli* verdeutlichen einen weiteren Aspekt der Signalintegration durch TCS in Bakterien. Dort wurde anhand dreier Sensorkinasen gezeigt, dass diese als kombinatorischer Sensor agieren können, indem sie durch mehrere verschiedene Stimuli unterschiedlich stark aktiviert werden. Durch ihre unterschiedlich starke Aktivierung bilden sie ein kollektives Genexpressionsmuster, das sich mit den jeweiligen Stimuli verändert (Clarke & Voigt, 2011). In dieser Arbeit wird deutlich, dass Sensorkinasen gleiche Stimuli besitzen können, sich die Aktivierungsstärken der jeweiligen Sensorkinase durch jeweiligen Stimulus jedoch unterscheiden.

Die meisten Sensorkinasen sind bifunktionell. Sie besitzen neben der Kinaseaktivität auch Phosphataseaktivität, d.h. sie können den korrespondierenden Response Regulator phosphorylieren und dephosphorylieren und sind somit in der Lage, ihre korrespondierenden Response Regulatoren zu aktivieren oder zu deaktivieren. Bestimmte Stimuli können die Kinaseaktivität, andere Stimuli die Phosphataseaktivität stimulieren und somit über die Sensorkinase unterschiedliche Reaktionen in der Zelle auslösen (Laub & Goulian, 2007). Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist das TCS VanRS in *Streptomyces coelicolor*, das eine effiziente Vermittlung der Vancomycinresistenz reguliert. In Anwesenheit von Vancomycin agiert die Sensorkinase VanS als Kinase für den Response Regulator VanR, der Gene zur Resistenzvermittlung exprimiert. In Abwesenheit von Vancomycin agiert VanS als Phosphatase wodurch die von VanR vermittelte Genexpression inhibiert wird (Hutchings *et al.*, 2006). Ein weiteres Beispiel ist die Sensorkinase DesK von *B. subtilis*. Ihre Aktivität ist abhängig von der Umgebungstemperatur. DesK spielt eine regulatorische Rolle bei der Bewältigung von Kältestress, indem sie vermutlich die Fluidität der Membranlipide detektiert. Bei niedrigen Temperaturen agiert DesK als Kinase, bei normalen Temperaturen als Phosphatase (Aguilar *et al.*, 2001; Laub & Goulian, 2007).

Response Regulatoren bestehen aus einer N-terminalen Receiverdomäne und einer C-terminalen Effektor-domäne. Der Name Response Regulator wurde geprägt durch Daniel Koshland, der 1977 das Chemotaxisprotein CheY beschrieb, welches einzig und allein aus einer Receiverdomäne besteht (Koshland, 1977). Die Receiverdomäne (REC) enthält den konservierten Aspartatrest, an dem die Phosphorylierung stattfindet. Während sie das gemeinsame Merkmal aller Response Regulatoren ist, liegt die Diversität von RR in der Effektor-domäne vor. Die Mehrzahl der RR in Bakterien agiert als Transkriptionsfaktor (66%), d.h. ihre Effektor-domäne ist DNA-bindend. Auch die DNA-bindenden Response Regulatoren unterteilt man wiederum in mehrere Familien. Etwa die Hälfte der Mitglieder gehört zur OmpR/PhoB Familie, zu der auch CiaR aus *S. pneumoniae* gehört (Halfmann, 2008). Die

übrigen Response Regulatoren sind entweder enzymatisch aktiv (13%), Protein- und Ligandenbindend (3%) oder RNA-bindend (1%). Eine große Gruppe von RR besitzt keine Effektor-domäne (17%) und existiert einzelständig wie CheY (Galperin, 2010; Gao & Stock, 2009). Die große Diversität an Effektor-domänen macht die nahezu endlose Vielfalt an physiologischen Antworten von Response Regulatoren erst möglich (Galperin, 2006).

Die Aktivierung der Response Regulatoren erfolgt durch eine Phosphotransferreaktion von der SK an den RR (Abb. 2.1). Hierbei interagiert die Receiverdomäne des RR mit der Autokinasedomäne der SK. Durch die Phosphorylierung geht der Response Regulator in seine aktive Konformation über (Casino *et al.*, 2010). Bei Response Regulatoren, die als Transkriptionsfaktoren agieren, wird durch die Phosphorylierung die Bindungsaffinität zur DNA-Bindestelle erhöht (Hoch, 2000). Allgemein gesehen befinden sich Response Regulatoren in einem Gleichgewicht zwischen inaktiver und aktiver Konformation. Dieses wird durch die Phosphorylierung zur aktiven Form hin verschoben (West & Stock, 2001). In aktivem Zustand erfolgt die physiologische Antwort über die Effektor-domäne.

Die Inaktivierung des Systems erfolgt durch die Dephosphorylierung des Response Regulators in einer hydrolytischen Reaktion. Manche RR besitzen Autophosphataseaktivität, aber auch Sensorkinasen können, wenn sie bifunktional sind, ihren korrespondierenden RR dephosphorylieren (Stock *et al.*, 2000). Somit wird nach Abklingen des Stimulus ein effizientes Abschalten des Systems gewährleistet.

Da die Mehrheit der Response Regulatoren aktiv ist, wenn sie phosphoryliert vorliegen, sind mehrere Möglichkeiten denkbar, die den Phosphorylierungsstatus von Response Regulatoren beeinflussen können. Prinzipiell können Genprodukte an allen Stufen der Signaltransduktion zur Phosphorylierung des Response Regulators posttranslational eingreifen. Tatsächlich ist dies für einige dieser Stufen gezeigt (Buelow & Raivio, 2010; Mitrophanov & Groisman, 2008). So können Konnektorproteine die Autophosphorylierung der Sensorkinase beeinflussen. Beispiele für cytoplasmatisch, periplasmatisch oder extrazellulär mit der Membran assoziierte Konnektoren sind beschrieben, die die Information der Stimuli auf die Sensorkinase übertragen. In letztem Fall agieren die Konnektoren als Kosenoren. Auch ABC-Transporter können als Kosenoren mit TCS interagieren (Jung *et al.*, 2011). Z.B. erkennt in *B. subtilis* ein ABC-Transporter sublethale Konzentrationen an schädlichem Bacitracin was zur Aktivierung eines TCS führt, das wiederum die Expression der Gene des Transporters induziert. Dieser positive Feedback-Mechanismus führt zur Hochregulation des Systems und damit zur verstärkten Abwehr gegen Bacitracin (Dintner *et al.*, 2011). Weiterhin wurden Konnektoren identifiziert, die den Phosphorylierungsstatus von Response Regulatoren durch Interaktion mit der SK und dem RR beeinflussen. Dies kann zwischen SK und korrespondierendem RR stattfinden, aber auch zwischen nicht korrespondierenden SK und RR. Auch sind Proteine bekannt, die die Aktivität der

Effektordomäne beeinflussen (Jung *et al.*, 2011; Mitrophanov & Groisman, 2008). Zudem existiert ein Beispiel für eine allosterische Regulation der SK durch den korrespondierenden RR (Paul *et al.*, 2008). Eine weitere Möglichkeit zur Einbeziehung zusätzlicher potenzieller Stufen zur Regulation der Signaltransduktion stellen Phosphorelaysysteme dar. Hier sind in der Signaltransduktion von der Sensor kinase zum Response Regulator zusätzliche Phosphotransferreaktionen über weitere Response Regulatoren und Phosphotransferproteine zwischengeschaltet, die wiederum selbst reguliert werden können, wie beispielsweise beim Mechanismus zur Sporulation von *B. subtilis* (Laub & Goulian, 2007; Mitrophanov & Groisman, 2008).

Aufgrund dessen ist das klassische Modell eines linearen TCS, das als Reaktion auf einen Stimulus mit Phosphorylierung des RR reagiert, nicht mehr allgemein gültig. Vielmehr können TCS als Teil komplexer regulatorischer Netzwerke angesehen werden.

2.3 Das Zwei-Komponenten System CiaRH

Das Zwei-Komponenten System CiaRH war das erste von 13 Zwei-Komponenten Systemen, welches in *S. pneumoniae* identifiziert wurde. Es handelt sich hierbei nicht um ein essentielles TCS, da eine Inaktivierung von Sensor kinase und Response Regulator möglich ist (Guenzi *et al.*, 1994; Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000). Das TCS CiaRH ist ein pleiotrop, denn es ist an der Ausbildung vieler verschiedener phänotypischer Eigenschaften von *S. pneumoniae* beteiligt.

CiaRH spielt in *S. pneumoniae* eine Rolle bei der Entwicklung der β -Lactamresistenz, was auch zu seiner Entdeckung führte (Kapitel 2.4). Eine starke Aktivierung des Systems bewirkt eine Resistenzerhöhung, während eine Inaktivierung die Resistenz erniedrigt (Giammarinaro *et al.*, 1999; Guenzi *et al.*, 1994; Hakenbeck *et al.*, 1999). Des Weiteren wird durch CiaRH auch die Toleranz gegen Vancomycin unterstützt (Moscoso *et al.*, 2010; Zähner *et al.*, 2002). Wie bereits bei seiner Entdeckung beschrieben, führt eine erhöhte Aktivität des Systems unter Bedingungen, die gewöhnlich die Kompetenz von *S. pneumoniae* ermöglichen, zum Verlust der natürlichen Transformierbarkeit (Guenzi *et al.*, 1994). Dagegen führt ein inaktives CiaRH-System unter kompetenzinhibierenden Bedingungen wieder zur Kompetenzentwicklung. Dazu zählen bestimmte Wachstumsmedien wie THB (Mascher *et al.*, 2003), BHI (Tsui *et al.*, 2010), Maleat anstelle von Phosphat als Pufferkomponente (Giammarinaro *et al.*, 1999), ein niedriger pH-Wert oder eine niedrige Sauerstoffkonzentration im Wachstumsmedium (Echenique *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000). Auch wird CiaRH in Verbindung gebracht mit Schutz vor induzierter Lyse durch Desoxycholat (Giammarinaro *et al.*, 1999) und Triton-X-100 (Mascher *et al.*, 2006a) sowie durch

Zellwandinhibitoren wie Cycloserin, Bacitracin, Vancomycin und Piperacillin (Mascher *et al.*, 2006a; Moscoso *et al.*, 2010). Zudem ist ein aktives *cia*-System nötig zum Schutz vor induzierter Lyse durch Säurestress (Pinas *et al.*, 2008).

Darüber hinaus spielt CiaRH für das Wachstum von *S. pneumoniae* unter Laborbedingungen eine Rolle. Bei einem inaktiven *cia*-System wurden eine kleine, aber signifikante Abnahme der Wachstumsrate (Throup *et al.*, 2000) und leichte Wachstumsdefekte beobachtet (Lange *et al.*, 1999; Tsui *et al.*, 2010) sowie eine frühere Lyse in der stationären Wachstumsphase (Mascher *et al.*, 2006a), wohingegen ein erhöht aktives *cia*-System zu verzögerter Lyse in der stationären Wachstumsphase führt (Müller, 2011).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass CiaRH auch eine Rolle bei der Virulenz spielt. So führt die Inaktivierung des Systems zur Reduktion der Virulenz bzw. zur Verringerung des Überlebens von pathogenen *S. pneumoniae*-Stämmen im Mausmodell (Throup *et al.*, 2000). Ein aktives System wird zudem im Rattenmodell zur Kolonisierung benötigt (Sebert *et al.*, 2002). Zusätzlich beeinflusst CiaRH im Mausmodell die Translokation von *S. pneumoniae* vom Nasenrachenraum zur Lunge und zum Gehirn und die Adhärenz an humane Lungenepithelzelllinien (Trappetti *et al.*, 2011). Des Weiteren hat das *cia*-System einen negativen Einfluss auf die Bakteriocinproduktion von *S. pneumoniae* (Dawid *et al.*, 2009).

Es handelt sich hierbei um ein klassisches TCS mit der membrangebundenen Sensorkinase CiaH und dem im Cytoplasma lokalisierten Response Regulator CiaR (Abb. 2.2). Beide Komponenten zeigen strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu dem Zwei-Komponenten System EnvZ/OmpR aus *Escherichia coli* (Halfmann, 2008). Die beiden Gene *ciaR* und *ciaH* liegen in einem Operon und überlappen mit 8 bp (Guenzi *et al.*, 1994). Die aus 444 Aminosäuren (AS) bestehende Sensorkinase CiaH besitzt eine N-terminale Sensordomäne und eine C-terminale cytoplasmatische Autokinasedomäne. Die Sensordomäne besitzt eine extracytoplasmatische Schleife, die von zwei Transmembrandomänen flankiert wird. Die Schleife dient vermutlich als Sensor zur Erkennung von Signalen aus der Umgebung. Die Autokinasedomäne von CiaH besitzt eine DHp- und eine CA-Domäne, die die ATP-abhängige Autophosphorylierung der Sensorkinase durchführen und wichtig für den Phosphotransfer auf die Receiverdomäne des Response Regulators sind. Der konservierte, nicht variable Histidinrest, an dem die Autophosphorylierung stattfindet, befindet sich an Position 226 (Müller *et al.*, 2011). Der aus 224 AS bestehende Response Regulator CiaR ist cytoplasmatisch lokalisiert und besitzt eine N-terminale Receiverdomäne und eine C-terminale DNA-bindende Domäne. CiaR agiert als Transkriptionsfaktor. Der konservierte, nicht variable Aspartatrest befindet sich an Position 51. Durch DNA-Bindungsstudien wurde gezeigt, dass die Bindungsaffinität von CiaR an das DNA-Bindemotiv in Anwesenheit von Acetylphosphat deutlich zunimmt, was ein deutlicher

2. Einleitung

Hinweis für die Phosphorylierung von CiaR durch Acetylphosphat *in vitro* ist. Diese findet offensichtlich an dem konservierten Aspartatrest statt, da die Substitution des Aspartats durch einen nicht phosphorylierbaren Alaninrest an CiaR zur Affinitätsabnahme an das DNA-Bindemotiv führt. Zudem wird unter *in vivo* Bedingungen der konservierte Aspartatrest zur Ausbildung der CiaR-abhängigen Genexpression benötigt (Halfmann *et al.*, 2007b; Halfmann *et al.*, 2011).

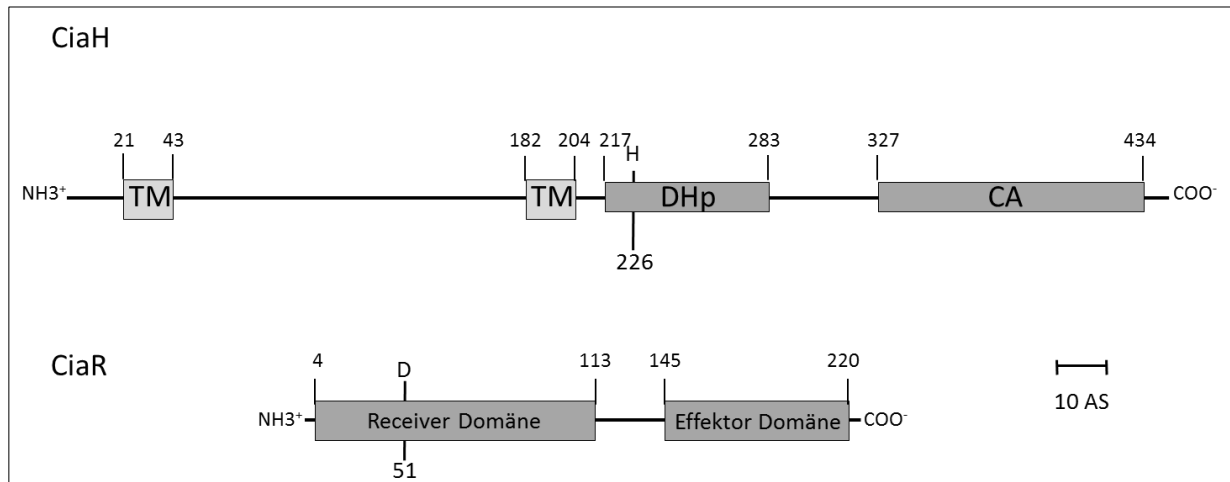


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Proteine des TCS CiaRH. Die konservierten und funktionell wichtigen Aminosäuren an beiden Proteinen sind markiert. Die konservierten Domänen wurden durch Analyse in der Pfam Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk>) ermittelt und sind unter Angabe der jeweiligen Position im Protein in Kästen dargestellt. Die Transmembrandomänen von CiaH wurden mittels des Programmes SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) ermittelt. Die Domänenbegrenzungen sind jeweils angegeben.

CiaR kontrolliert direkt 15 Promotoren, die die Transkription von 24 Genen steuern. Diese sind in 5 Operons und 10 monocistronischen Einheiten organisiert. Die DNA-Bindestelle von CiaR ist ein direkter Repeat mit der Konsensussequenz TTTAAG-N5-TTTAAG, die 10 bp upstream der -10 Region lokalisiert ist. CiaR reguliert die Promotoraktivität mit Ausnahme eines Promotors positiv. Im Falle des negativ regulierten Promotors liegt die DNA-Bindestelle auf dem komplementären Strang innerhalb des transkribierten Genbereiches. Zum CiaR-Regulon gehören Gene, die an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt sind. Man unterscheidet zudem zwischen Genen, deren Expression strikt von CiaR abhängt, und Genen, bei deren Transkription neben CiaR weitere Faktoren eine Rolle spielen (Halfmann *et al.*, 2007b).

Ein von CiaR strikt reguliertes Operon mit den Genen *htrA* und *parB* liegt benachbart zum Replikationsursprung. *HtrA* kodiert für eine Serinprotease, die an der Zelloberfläche vorliegt und ein Verbindungsglied von CiaRH zum Virulenzphänotyp darstellt (Ibrahim *et al.*, 2004a; Ibrahim *et al.*,

2004b; Sebert *et al.*, 2002; Sebert *et al.*, 2005). Das Genprodukt von *parB* spielt eine unterstützende Funktion bei der Chromosomenauftrennung während der Zellteilung (Minnen *et al.*, 2011).

Das essentielle *lic1*-Operon mit den Genen *licABC* und *tarIJ* und das *dlt*-Operon mit den Genen *dltXABCD* werden ebenfalls von CiaR reguliert. Die Genprodukte sind an der Zellwandsynthese beteiligt. Die Enzyme LicA, LicB und LicC sind essentiell für die Cholinaufnahme in die Zelle sowie für das Anhängen von Phosphorylcholin an die Teichonsäuren verantwortlich. *TarI* und *tarJ* kodieren für Enzyme zur Synthese von aktiviertem Ribitol (CDP-Ribitol), das als Vorstufe zur Synthese von Teichonsäuren und Kapselpolysacchariden dient (Baur *et al.*, 2009; Denapaite *et al.*, 2012; Kharat & Tomasz, 2006). Die Genprodukte des *dlt*-Operons sind beteiligt an der D-Alanylierung von Teichonsäuren (Denapaite *et al.*, 2012; Kovács *et al.*, 2006). Die Expression beider Operons ist nicht strikt von CiaR abhängig. Die Expression des *lic1*-Operons wird zum einen von zwei Promotoren reguliert, wobei der nicht von CiaR regulierte Promotor konstitutiv aktiv ist. Zudem wird der von CiaR regulierte Promotor von einem zusätzlichen Regulator kontrolliert (Denapaite *et al.*, 2012). Das *dlt*-Operon wurde in Mikroarraystudien als CiaR reguliert beschrieben (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Mascher *et al.*, 2003), Promotorfusionsexperimente zeigten allerdings nur bei erhöhter Aktivierung des Systems eine CiaR abhängige Genexpression (Denapaite *et al.*, 2012).

Des Weiteren reguliert CiaR die Gene des *malMP*-Operons und des *manLMN*-Operons, deren Produkte am Zuckermetabolismus beteiligt sind. Die Gene des *malMP*-Operons kodieren für eine Amylomaltase (MalM) und eine Maltosephosphorylase (MalP). Diese Enzyme sind an der Verwertung von Maltose und Maltodextrin beteiligt (Puyet & Espinosa, 1993).

Der Promotor des *manLMN*-Operons ist der einzig negativ regulierte CiaR-Promotor. Die Gene kodieren für ein Phosphotransferasesystem (PTS) der Mannose-Klasse, das eine niedrige Substratspezifität besitzt. Es handelt sich hierbei hauptsächlich um ein Transportsystem für Glucose, jedoch zeigt es auch Spezifität für Mannose, N-Acetylglucosamin, Glucosamin und Galactose (Bidossi *et al.*, 2012). In vielen Milchsäurebakterien ist dieses System an der Katabolitrepression, einem System zur Adaptation der Bakterien an sich ändernde Zuckerquellen, beteiligt (Abranches *et al.*, 2003).

Weiterhin ist die Expression des *ciaRH*-Operons autoreguliert. Die Expression des Promotors vor *ciaR* wird durch CiaR selbst schwach positiv reguliert.

Die 5 stärksten, strikt von CiaR regulierten Promotoren steuern die Expression von kleinen, nicht kodierenden, regulatorischen RNAs (csRNAs), mit einer Größe von 87 bis 151 Nukleotiden. Sie sind beteiligt an dem Autolysephänotyp von CiaRH (Halfmann *et al.*, 2007b) und spielen eine Rolle bei der Kompetenz und der Cefotaximsuszeptibilität von *S. pneumoniae* (Müller, 2011; Tsui *et al.*, 2010).

Weitere einzelne Transkriptionseinheiten des CiaR-Regulons sind die Gene *axe*, *spr0931*, *ppmA*, und *spr0782*, wobei die Promotoren der ersten beiden Gene strikt von CiaR reguliert werden. Das Genprodukt des Acetylerasegens *axe* ist vermutlich eine Deacetylase, deren Substrat ein Polysaccharid sein könnte (Halfmann *et al.*, 2007b). Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Axe an der Cefotaximresistenz (Mascher, 2001). *PpmA* kodiert für eine Peptidyl-Prolylisomerase, die wie HtrA an der Virulenz beteiligt ist (Overweg *et al.*, 2000). Die Funktionen der Genprodukte von *spr0782* und *spr0931* sind unbekannt. Beide liegen offensichtlich extrazellulär oder membranassoziiert vor (Halfmann *et al.*, 2007b).

Die Ausbildung der Phänotypen, an denen CiaRH beteiligt ist, hängt eng mit seiner Aktivität zusammen. Es wurde gezeigt, dass dieses System unter Laborbedingungen immer aktiv ist. In allen gängigen Wachstumsmedien für *S. pneumoniae* (C+Y, BHI, THB, THY und TSB) wird durch CiaRH eine hohe Regulation der Genexpression vermittelt (Halfmann *et al.*, 2011). Eine Inaktivierung des Response Regulators CiaR führt bei strikt CiaR-regulierten Promotoren zu einem Verlust der Genexpression bzw. liegt die Promotoraktivität nicht mehr im messbaren Bereich (Halfmann *et al.*, 2007b). Eine Inaktivierung der Sensor kinase CiaH wirkt sich dagegen unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen unterschiedlich auf die CiaR-vermittelte Genexpression aus. Beispielsweise nimmt in BHI-Medium die CiaR-Aktivität deutlich ab, jedoch nicht auf das Niveau eines Stammes mit inaktiviertem Response Regulator. In C+Y-Medium dagegen nimmt die CiaR Aktivität leicht zu (Halfmann *et al.*, 2011). Dies deutet auf andere Quellen hin, die zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von CiaR führen. Untersuchungen in anderen TCS zeigten, dass niedermolekulare, energiereiche Phosphodonatoren wie Acetylphosphat oder andere, nicht korrespondierende Sensor kinasen als Quellen zur Phosphorylierung fungieren können (Laub & Goulian, 2007; Wolfe, 2010). *In vitro* stimuliert Acetylphosphat die Bindung von CiaR an seine DNA-Bindestelle. CiaR katalysiert offensichtlich *in vitro* seine Autophosphorylierung unter Verwendung von Acetylphosphat als Phosphodonator (Halfmann *et al.*, 2011). Daher gilt dieses Molekül als Kandidat für die Phosphatquelle *in vivo* wenn CiaH fehlt. Die Überprüfung dessen wird in dieser Arbeit durchgeführt. Des Weiteren existieren Bedingungen, die zu einer deutlichen Zunahme der Aktivität von CiaR führen. Hierbei handelt es sich nicht um Einflüsse von außerhalb der Zelle, sondern um intrinsische Dinge am CiaRH System selbst. So sind Aminosäureaustausche in der Histidinkinase CiaH verantwortlich für eine Stimulierung der Kinaseaktivität von CiaH, so dass diese eine Hyperaktivität von CiaR vermittelt (Müller *et al.*, 2011) (Kapitel 2.4). CiaH fungiert diesen Untersuchungen zu Folge als bifunktionelle Sensor kinase mit Kinase- und Phosphataseaktivität (Halfmann *et al.*, 2011). Signale zur Stimulierung beider Aktivitäten sind jedoch nicht bekannt.

Allerdings ist eine Reihe von Einflüssen beschrieben, die die Aktivität des *cia*-Systems beeinflussen. Ein negativer Einfluss von Ca^{2+} sowie ein positiver Einfluss von Phosphat wurden diskutiert (Giammarinaro *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde ein aktivierender Einfluss auf CiaRH durch das β -Lactam Penicillin (Rogers *et al.*, 2007) und das Glykopeptid Vancomycin (Haas *et al.*, 2005) beschrieben. Zudem wurde spekuliert, dass die aufgrund der Antibiotikawirkung entstehenden Zellwandschäden von CiaH erkannt werden und dadurch eine Abwehrreaktion von *S. pneumoniae* auslösen (Rogers *et al.*, 2007; Zähner *et al.*, 2002). Wie diese Faktoren die Aktivität von CiaRH beeinflussen ist bislang allerdings unbekannt. Die diskutierten Signale wie Ca^{2+} , Phosphat, β -Lactame und Zellwandschäden wurden zudem nicht als direkte Stimuli für CiaH nachgewiesen. Es wird eher davon ausgegangen, dass hier ein indirekter Effekt auf CiaRH vorliegt.

Dahingegen wurde in *S. mutans* gezeigt, wie Ca^{2+} die CiaRH Aktivität reprimiert. Hier ist Ca^{2+} nicht direkt ein Stimulus von CiaH, vermittelt jedoch eine Aktivitätsabnahme über das kleine Peptid CiaX, das mit *ciaRH* in einem Operon liegt und gemeinsam exprimiert wird. CiaX agiert in diesem Fall als Konnektorprotein, indem es den Stimulus erkennt und die Information an CiaH weiterleitet. Allerdings fehlt *ciaX* in *S. pneumoniae* (He *et al.*, 2008).

Weitere Untersuchungen zeigten Einflüsse einer Feedback-Regulation auf die Aktivität von CiaRH. So übt die Kompetenz, an deren Regulation CiaRH eine negative Rolle spielt, selbst eine positive Wirkung auf die Aktivität aus (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Müller, 2011). Zudem sind auch einige Genprodukte des CiaR-Regulons an der Feedback-Regulation beteiligt. So bewirkt die Inaktivierung von *htrA*, den Genen für die kleinen regulatorischen RNAs (*ccnA-E*) oder des *manLMN*-Operons eine leichte Zunahme der Aktivität, die Inaktivierung von *ppmA* eine leichte Abnahme der Aktivität (Müller, 2011). Auch Kolonievarianten von *S. pneumoniae* beeinflussen vermutlich die Aktivität. Es sind transparente und opake Kolonievvarianten von *S. pneumoniae* auf Festmedium beschrieben, wobei in opaken Varianten eine niedrigere *cia*-Aktivität als in den transparenten Varianten auftritt (Dawid *et al.*, 2009).

Das CiaRH System existiert auch in anderen Streptokokken, jedoch nicht in Bakterien anderer Gattungen (Marx *et al.*, 2010). Neben *S. pneumoniae* ist dieses System noch in *S. mutans* weitergehend untersucht. Die DNA-Bindestelle und das CiaR-Regulon sind dort beschrieben (Wu *et al.*, 2010). Die von CiaRH beeinflussten Phänotypen in anderen Streptokokken ähneln denen in *S. pneumoniae*. CiaRH ist in *S. mutans* assoziiert mit Bakteriocinproduktion, Kompetenzentwicklung, der Biofilmbildung, Stresstoleranz und Resistenz gegen antimikrobielle Peptide (Ahn *et al.*, 2005; Biswas *et al.*, 2008; Lévesque *et al.*, 2007; Liu & Burne, 2009a; Mazda *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2004). Zudem wurde in *S. mutans* beobachtet, dass CiaH dort unter den verwendeten Wachstumsbedingungen (BHI-Medium) offensichtlich als Phosphatase agiert, denn durch die Inaktivierung von *ciaH* wird die

Expression von *htrA* hochreguliert (Ahn *et al.*, 2005). In *S. gordonii* spielt CiaRH eine Rolle bei der Stresstoleranz (Liu & Burne, 2009b). In *S. agalactiae* und *S. suis* ist eine Rolle bei der Virulenz beschrieben (Li *et al.*, 2011; Quach *et al.*, 2009). Stimuli für CiaRH sind in diesen Organismen jedoch nicht bekannt.

2.4 Die β -Lactamresistenz in *S. pneumoniae* und der Einfluss des CiaRH Systems

Zur Behandlung von Krankheiten, die durch *S. pneumoniae* und andere pathogene Bakterien verursacht werden, setzt man als Therapeutikum häufig β -Lactamantibiotika ein. Erster Vertreter der β -Lactame war das Penicillin, dessen keimtötende Wirkung von Alexander Fleming im Jahre 1928 entdeckt wurde (Fleming, 1929). Ernst Florey und Howard Chain führten weitere Studien zur Wirkung dieser Substanz durch und entdeckten dabei seine heilende Wirkung für den Menschen. Dies lieferte den entscheidenden Beitrag zu dessen Einsatz in der Medizin. Penicillin fand seitdem eine breite Anwendung als Antibiotikum und wurde in der frühen Nachkriegszeit des Zweiten Weltkrieges in der Medizin als Wundermittel bezeichnet.

Die Wirkung der β -Lactame erfolgt in Pneumokokken wie auch anderen grampositiven Bakterien an der Zellwandsynthese. Hierbei handelt es sich um Strukturanaloga der Substrate der Penicillin bindenden Proteine (PBPs). Dies sind Enzyme, die an späten Stufen der Zellwandsynthese beteiligt sind und die Untereinheiten des Peptidoglykans durch Transpeptidierungs- und Transglykosylierungsreaktionen miteinander verknüpfen (Hakenbeck *et al.*, 2012).

Die Wirkung der β -Lactame erfolgt durch Imitieren des D-Ala-D-Ala-Rests der Pentapeptidkette der N-Acetylmuraminsäure-Unterheit des Peptidoglykans. Das aktive Serin der PBPs bindet kovalent an den β -Lactamring, wodurch ein Komplex entsteht, der sehr langsam hydrolysiert wird und somit weitere Reaktionen inhibiert. Dies führt zur Reduktion der Peptidoglykansynthese, zur Reduktion der Zellwandintegrität und damit zum langsameren Wachstum und zur Lyse der Zellen (Zapun *et al.*, 2008).

Die exzessive und teilweise fehlerhafte medizinische Anwendung der β -Lactamantibiotika führte jedoch zur Evolution und Verbreitung antimikrobieller Resistenzen. In Pneumokokken wurde die Resistenz gegen Penicillin zunächst als Laborphänomen beschrieben (Shockley & Hotchkiss, 1970). Allerdings wurden erste penicillinresistente klinische Isolate in der 1960er Jahren beobachtet (Kislak *et al.*, 1965), denen zunächst keine Beachtung geschenkt wurde. Erst Ende der 1970er Jahre wurde die Resistenz mit dem Auftreten multiresistenter Stämme gegen Penicillin und anderen Antibiotika in Südafrika (Jacobs *et al.*, 1978) als ernst zu nehmendes Problem in der Therapie von Pneumokokkenerkrankungen erkannt.

Seitdem kam es neben einer weltweiten Verbreitung resistenter Pneumokokken und auch zu einem Resistenzanstieg. Ein bekanntes Beispiel für einen resistenten, weltweit verbreiteten Pneumokokkenklon ist der spanische Serotyp 23F Klon (Croucher *et al.*, 2011; Hakenbeck, 1999).

Heutzutage ist als klassischer Resistenzmechanismus gegen Penicillin und andere β -Lactame in *S. pneumoniae* die Modifikation der PBPs beschrieben (Cornick & Bentley, 2012). Diese Veränderungen führen zu einer niedrigeren Bindungsaffinität der PBPs mit den β -Lactamen, wodurch eine höhere Konzentration des β -Lactams zur Inhibierung der Zellwandsynthese nötig ist, was eine Abnahme der biologischen Aktivität der β -Lactame in diesen Fällen bedeutet (Guenzi *et al.*, 1994). Mittlerweile sind weitere Resistenzmechanismen zur Verringerung der Wirksamkeit der β -Lactamantibiotika beschrieben (Hakenbeck *et al.*, 2012). Das Auftreten verringerter β -Lactamsuszeptibilität ist in klinischen Pneumokokkenisolaten auf einige Serotypen beschränkt und variiert zudem zwischen verschiedenen Ländern (Hakenbeck, 1999; Imöhl *et al.*, 2010). Die Ausbreitung der β -Lactamresistenz wird weiterhin durch die Eigenschaft der Pneumokokken zur natürlichen genetischen Kompetenz verstärkt.

Zur Erlangung eines besseren Verständnisses über die Resistenzentwicklung in Pneumokokken wurde in den 1980er Jahren eine Studie durchgeführt, in der die Resistenzentwicklung im Labor nachgestellt wurde (Laible & Hakenbeck, 1987). Hierzu wurde der sensitive Laborstamm *S. pneumoniae* R6 einem künstlichen Selektionsdruck mit sukzessiv gesteigerten Antibiotikakonzentrationen ausgesetzt. Die verwendeten Antibiotika waren die β -Lactame Cefotaxim und Piperacillin. Bei Piperacillin handelt es sich um ein Penicillin mit breitem Wirkungsspektrum und hoher Affinität zu allen pneumokokkalen PBPs. Cefotaxim ist ein Cephalosporin der dritten Generation mit einem eingeschränkteren Wirkungsspektrum, da es eine sehr niedrige Bindungsaffinität zu dem Penicillin bindenden Protein PBP2b besitzt (Hakenbeck *et al.*, 1987). Durch diese Experimente entstanden mehrere Familien spontan resistenter Mutanten, die verringerte Suszeptibilität gegen mehrere Penicilline und Cephalosporine aufwiesen (Hakenbeck *et al.*, 1999). Die Höhe der Resistenz nahm dabei mit jedem Selektionsschritt zu. Bezeichnet wurden die einzelnen Stämme nach dem Anfangsbuchstaben des verwendeten Selektionsantibiotikums und einer dreistelligen Ziffer, wobei die erste Ziffer für den Selektionsschritt und die letzte Ziffer für die jeweilige Mutantenfamilie steht (Abb. 2.3). Jedes somit entstandene *S. pneumoniae*-Derivat wurde auf bekannte und unbekannte Resistenzdeterminanten hin untersucht. Neben den Mutationen in verschiedenen PBPs, die bereits in klinischen Pneumokokken-Isolaten bekannt waren, wurden bisher unbekannte Nicht-PBP-Resistenzdeterminanten identifiziert (Hakenbeck *et al.*, 1999; Zähler *et al.*, 2002). In mehreren Spontanmutanten traten Mutationen in einem Gen auf, das für die Histidinkinase des TCS CiaRH kodiert. Untersuchungen zu einer dieser Mutationen in der Mutante C306 zeigten eine Verringerung der Cefotaximsuszeptibilität und zusätzlich einen Verlust der natürlichen Kompetenz. Daher wurde

das Gen, das für diese Histidinkinase kodiert, als *ciaH* für „competence induction and altered cefotaxime susceptibility“ benannt. Das Gen, das für den korrespondierenden Response Regulator kodiert, wurde *ciaR* genannt. Damit war das Zwei-Komponenten System CiaRH die erste identifizierte Nicht-PBP-Resistenzdeterminante (Guenzi *et al.*, 1994). Weitere Arbeiten zeigten, dass die *ciaH*-Mutation in C306 die transkriptionelle Regulation des Response Regulators CiaR erhöht (Giammarinaro *et al.*, 1999; Halfmann *et al.*, 2007b; Mascher *et al.*, 2003).

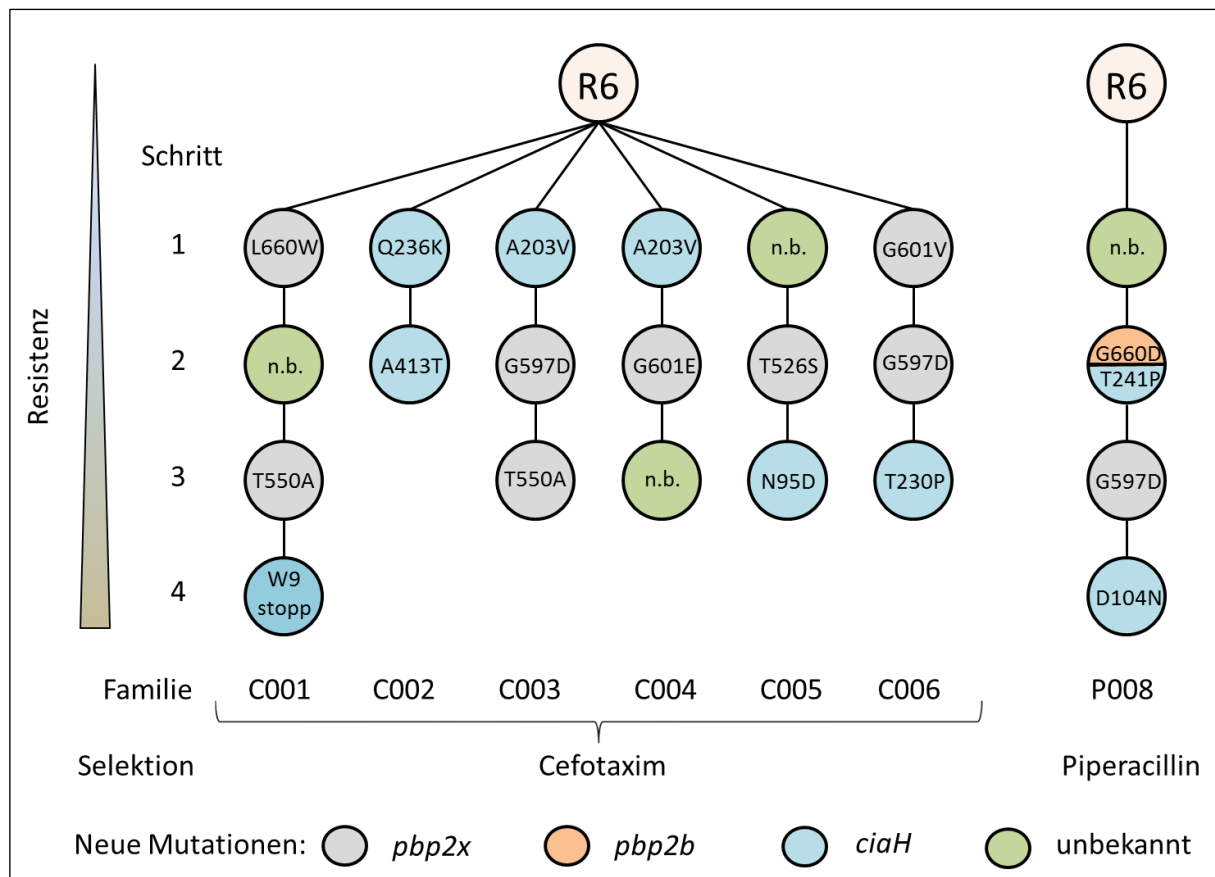


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der C-Mutantenfamilien C001 bis C006 und P-Mutantenfamilie P008 (nach Müller, 2011 und Zähler *et al.* 2002). Die Stämme wurden ausgehend von *S. pneumoniae* R6 in bis zu vier Schritten durch ansteigende Cefotaxim- bzw. Piperacillinkonzentrationen selektiert. Jeder Kreis steht für einen Stamm. Die im jeweiligen Selektionsschritt identifizierten Resistenzdeterminanten sind farblich gekennzeichnet. Der jeweils durch die Punktmutation vermittelte Aminosäureaustausch, der im Vorgängerstamm nicht vorhanden war, ist angegeben. Zu beachten ist, dass auch nicht identifizierte Resistenzdeterminanten existieren können.

Zur genaueren Charakterisierung der Mutationen in *ciaH* auf die transkriptionelle Regulation durch CiaR und den damit korrelierenden Phänotypen wurden die *ciaH* Varianten unabhängig von den übrigen in den Mutanten auftretenden, teils nicht charakterisierten Mutationen hin untersucht. Dazu wurden die jeweiligen *ciaH*-Allele in *S. pneumoniae* R6 eingebracht, indem das Wildtyp-Allel mit den jeweiligen *ciaH*-Varianten ausgetauscht wurde. Alle *ciaH*-Allele aus den Labormutanten führten zu einer Erhöhung der CiaR vermittelnden Promotoraktivität zwischen 4-fach und 26-fach (Tab 2.1).

2. Einleitung

Da das *cia*-System auch ohne diese Mutationen aktiv ist (Halfmann *et al.*, 2011), wird der Effekt der Mutationen auf CiaR, die eine deutliche Erhöhung der Aktivierung bewirken, als Hyperaktivierung bezeichnet (Müller *et al.*, 2011). Phänotypisch wurde eine Abnahme der Suszeptibilität gegen β -Lactamantibiotika beobachtet sowie der Verlust der natürlichen Transformierbarkeit. Des Weiteren trat ein verlangsamtes Wachstum in der exponentiellen Wachstumsphase und eine spätere Autolyse in der stationären Wachstumsphase auf, die mit der durch das jeweilige *ciaH*-Allel vermittelten Aktivitätsstärke von CiaRH korreliert (Müller, 2011).

Tab. 2.1: *CiaH*-Allele in Labormutanten von *S. pneumoniae* R6 mit Herkunft, Nukleotidaustausch, AS-Austausch und der Änderung der CiaR-vermittelten Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp

Spontanmutante	<i>ciaH</i> -Allel	Punktmutation in <i>ciaH</i>	Aminosäureaustausch in CiaH	<i>ciaH</i> -Allel/ <i>ciaRH</i> -wt ¹
C102	<i>ciaH</i> 102	<i>ciaH</i> C706A	Q236K	26
C103	<i>ciaH</i> 103	<i>ciaH</i> C608T	A203V	24
C202	<i>ciaH</i> 202	<i>ciaH</i> C706A G1237A	Q236K, A413T	15
P208	<i>ciaH</i> 208	<i>ciaH</i> A721C	T241P	6
C305	<i>ciaH</i> 305	<i>ciaH</i> A283G	N95D	5
C306	<i>ciaH</i> 306	<i>ciaH</i> A688C	T230P	10
P408	<i>ciaH</i> 408	<i>ciaH</i> G310A A721C	D204N, T241P	6
-	<i>ciaH</i> 202	<i>ciaH</i> G1237A	A413T	0,4
-	<i>ciaH</i> 408	<i>ciaH</i> G310A	T241P	0,9

¹Angegeben ist die Änderung der transkriptionellen Regulation des CiaR regulierten Promotors P_{htrA} vom *S. pneumoniae* R6 Derivat mit jeweiligen *ciaH*-Allel zum Wildtyp (nach Müller *et al.*, 2011).

Die *ciaH*-Allele sind durchgängig über das gesamte Protein verteilt. Die aktivierenden Allele *ciaH*102, *ciaH*103, *ciaH*208 und *ciaH*306 sind um den konservierten Histidinrest (His226) lokalisiert, *ciaH*103 am Ende der zweiten Transmembrandomäne und *ciaH*305 in der extrazellulären Domäne.

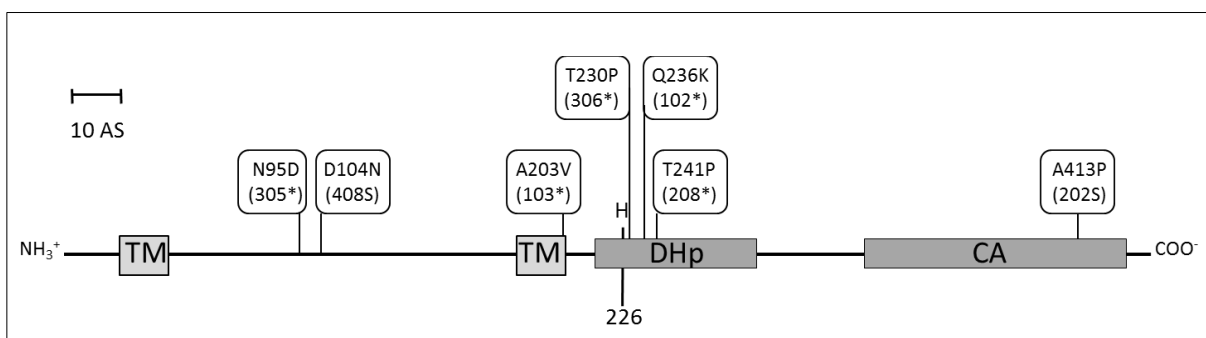


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Sensorkinase CiaH mit den Positionen der Aminosäureaustausche in den CiaH-Varianten der Labormutanten (nach Müller *et al.* 2011). Die Positionen der Transmembrandomänen (TM), Dimerisierungs- und Histidinphosphotransferdomäne (DHp) und katalytischen ATP-bindenden Domäne (CA) sind in Kästen angegeben. Die Nummern der *ciaH*-Allele sind in Klammern dargestellt. Die Allele, die eine Hyperaktivität von CiaR vermitteln, sind mit * markiert. Der konservierte und funktionell wichtige Histidinrest ist angegeben.

Die nicht aktivierenden Allele *ciaH202S* und *ciaH408S* befinden sich in der cytoplasmatischen CA-Domäne bzw. in der extrazellulären Domäne (Abb. 2.4). Hierbei handelt es sich jedoch um kompensatorische Mutationen, die in späteren Selektionsstufen entstanden sind (Abb. 2.3) und zur genetischen Stabilität des *ciaRH* Systems beitragen (Müller, 2011).

Lange Zeit war das Auftreten von *ciaH*-Mutationen nur in Labormutanten bekannt. In den veröffentlichten kompletten Genomsequenzen von *S. pneumoniae* existierten keine Änderungen in den Genen *ciaRH* (Camilli *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; Croucher *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2009; Dopazo *et al.*, 2001; Hoskins *et al.*, 2001; Lanie *et al.*, 2007; Tettelin *et al.*, 2001). Mit dem Aufschwung der Isolierung klinischer Isolate und deren Genomsequenzierung in den letzten Jahren änderte sich dies. So wurde 2010 zum ersten Mal eine Mutation in einem klinischen Isolat beschrieben, dem Vancomycin toleranten Stamm Tupelo (Moscoso *et al.*, 2010). Das veränderte *ciaH* spielt in diesem Stamm eine Rolle für den Phänotyp der Vancomycintoleranz und trägt zum Schutz vor Lyse in Anwesenheit von Vancomycin bei (Moscoso *et al.*, 2010), was bereits für *ciaH*-Allele aus den Labormutanten bekannt ist (Mascher *et al.*, 2006a). Weiterhin treten Veränderungen in *ciaH* in weiteren unveröffentlichten und unvollständigen *S. pneumoniae*-Genomen auf. Eine genauere Analyse dieser Mutationen, wie sie bereits für die *ciaH*-Allele aus den Labormutanten durchgeführt wurde, erfolgt in dieser Arbeit.

2.5 Crosstalk bei Zwei-Komponenten Systemen und die Rolle von Acetylphosphat

Viele Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit dem Gebiet der Linearität von Zwei-Komponenten Systemen. Sensorinasen und Response Regulatoren verschiedener Familien besitzen signifikante Sequenz- und strukturelle Homologien, weswegen vermutet wurde, dass Sensorinasen nicht nur die Phosphorylierung ihres korrespondierenden Response Regulators durchführen, sondern auch Response Regulatoren anderer TCS phosphorylieren können. Dieses als Crosstalk bezeichnete Phänomen ist eine ungewollte Kommunikation zwischen zwei individuellen, unabhängigen Signaltransduktionswegen. Wird diese Kommunikation eliminiert, bleiben beide Signaltransduktionswege intakt (Laub & Goulian, 2007). Dies wird von dem als Cross-Regulation bezeichneten Mechanismus unterschieden. Hierbei handelt es sich um die adäquate Antwort auf einen Stimulus notwendige Verzweigung von Signaltransduktionswegen. Eine einzelne Sensorinase katalysiert dabei die Aktivität mehrerer Response Regulatoren oder es wird umgekehrt die Aktivität eines Response Regulators durch mehrere Sensorinasen reguliert. Letzteres existiert beispielsweise bei der Chemotaxis in *E. coli*, wo die Sensorinase CheA die beiden Response Regulatoren CheY und

CheB als Antwort auf differenzierte Stimuli phosphoryliert (Laub & Goulian, 2007). Weiterhin als Crosstalk bezeichnet man auch die Phosphorylierung von Response Regulatoren durch niedermolekulare hoch energetische Moleküle, die Phosphatgruppen besitzen und als Phosphodonoren agieren können, wie Acylphosphate.

Experimente mit aufgereinigten Sensorkinasen und Response Regulatoren zeigten, dass Crosstalk zwischen nicht korrespondierenden Partnern eines TCS *in vitro* möglich ist. Allerdings wurde in einer Studie, in der in *E. coli* alle Proteine von Zwei-Komponenten Systemen bzgl. Crosstalk überprüft wurden, gezeigt, dass von 692 möglichen Crosstalk Paaren dieser *in vitro* nur in 3 % der Fälle auftritt (Yamamoto *et al.*, 2005). Weiterhin laufen die Phosphorylierungsreaktionen zwischen nicht korrespondierenden Partnern mit einer deutlich niedrigeren Kinetik ab als zwischen korrespondierenden Partnern. Beispielsweise benötigt die Sensorkinase EnvZ aus *E. coli in vitro* 10 Sekunden zur vollständigen Phosphorylierung ihres korrespondierenden Response Regulator OmpR, jedoch für den nicht spezifischen Transfer des Phosphats an CpxA eine Stunde (Skerker *et al.*, 2005). In einigen *in vivo* Experimenten konnte Crosstalk zwischen nicht korrespondierenden Partnern nur dann gezeigt werden, wenn die jeweils korrespondierenden Partner von Sensorkinase und Response Regulator genetisch deletiert oder die Sensorkinase genetisch überproduziert wurden. Beispielsweise findet die Phosphorylierung des Response Regulators OmpR durch die nicht korrespondierende Sensorkinase CpxA *in vivo* in *E. coli* nur dann statt, wenn die jeweiligen Partner EnvZ und CpxR fehlen. Crosstalk kann also in den entsprechenden Stämmen identifiziert werden, wenn die Mechanismen zur Unterdrückung des Crosstalks eliminiert wurden. Jedoch ist dieser in Wildtyp-Zellen nicht physiologisch relevant (Siryaporn & Goulian, 2010).

Ein Grund für die Verhinderung des Crosstalks zwischen nicht korrespondierenden Partnern eines TCS ist die höhere Affinität zwischen korrespondierenden Partnern eines TCS im Vergleich zu Partnern verschiedener TCS. Bifunktionelle Sensorkinasen können über ihre Phosphataseaktivität die Phosphorylierung ihres Response Regulators durch andere Sensorkinasen verhindern. Zudem kann der Response Regulator selbst durch seine Interaktion mit der Sensorkinase verhindern, dass diese als Phosphodonor für Response Regulatoren anderer TCS agiert. Weiterhin sind auch Beispiele beschrieben, in denen Crosstalk verhindert wird, wenn die Sensorkinase monofunktional ist, also nur Kinaseaktivität besitzt. Dies spricht dafür, dass Crosstalk zwischen nicht korrespondierenden Komponenten eines TCS in der Zelle verhindert wird. Für Organismen ist dies zudem sinnvoll, damit eine passende zelluläre Antwort auf einen spezifischen Stimulus stattfinden kann (Laub & Goulian, 2007; Siryaporn & Goulian, 2010).

Anfang der 1990er Jahre wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch niedermolekulare hoch energetische Moleküle als Phosphatquellen für Response Regulatoren fungieren können. *In vitro* wurde gezeigt, dass Response Regulatoren sich autophosphorylieren und dabei Acetylphosphat, Carbamoylphosphat, Phosphoramidat und γ -Glutamylphosphat als Phosphodonoren verwenden können (Lukat *et al.*, 1992; Ogura *et al.*, 1994). Seitdem ist die Überprüfung der Rolle dieser Verbindungen zur Phosphorylierung von Response Regulatoren Teil intensiver Forschungsarbeiten und es existieren viele Hinweise, dass zumindest Acetylphosphat *in vivo* als Phosphatquelle fungieren kann (Wolfe, 2010).

Physiologische Relevanz wurde zunächst den Verbindungen Acetylphosphat, Carbamoylphosphat und γ -Glutamylphosphat zugeschrieben. Für γ -Glutamylphosphat wurde dies bisher in einem Fall lediglich vermutet. Dafür, dass Carbamoylphosphat *in vivo* als Phosphodonor agiert, gibt es bisher keine Hinweise (Wolfe, 2010). Lediglich eine Studie existiert, in der die Rolle von Carbamoylphosphat zur Phosphorylierung des Response Regulators Rrp2 in *Borrelia burgdorferi in vivo* untersucht wurde und offensichtlich nicht als Phosphodonor agiert (Xu *et al.*, 2010).

Die physiologische Relevanz von Acetylphosphat wird durch viele Hinweise gestützt. Viele, aber nicht alle aufgereinigte Response Regulatoren können *in vitro* ihre Autophosphorylierung durch Acetylphosphat katalysieren (Wolfe, 2005). Im Gegensatz zu Crosstalk mit nicht korrespondierenden Sensorkinasen, tritt Crosstalk mit AcP *in vitro* weitaus häufiger auf. Allein statistisch gesehen ist es ein Hinweis darauf, dass Crosstalk mit Acetylphosphat weitaus häufiger sein sollte als mit Sensorkinasen anderer TCS. Zudem kann in *E. coli* die intrazelluläre Acetylphosphatmenge eine Konzentration erreichen, die für eine effiziente Autophosphorylierung *in vitro* nötig ist (Keating *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2007). Untersuchungen mit dem Response Regulator CheY von *E. coli* zeigten, dass die Rate des Phosphotransfers von Acetylphosphat zum Response Regulator linear ansteigt und keine Sättigung erreicht (Da Re *et al.*, 1999).

Die intrazelluläre Menge an Acetylphosphat (AcP) variiert als Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen und ist vom metabolischen Status der Zelle abhängig. Daher wird vermutet, dass Acetylphosphat in der Zelle als globales Signal agieren kann und eine Verbindung zwischen dem Metabolismus bzw. Energiestatus der Zelle und der Signaltransduktion über Zwei-Komponenten Systeme darstellt (Wolfe 2005, Laub & Goulian 2007). Diese Fähigkeit von Acetylphosphat könnte einen ursprünglichen Mechanismus darstellen. Eine Hypothese von Wolfe (2010) besagt, dass Acetylphosphat in den ursprünglichen Anfängen der Evolution komplexer Organismen als Energiequelle genutzt werden konnte. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass AcP eine energiereichere Verbindung ist als ATP. So könnten sich AcP-sensitive Response Regulatoren zur Erkennung des Energiestatus und zur Anpassung des Stoffwechsels in der Zelle entwickelt haben. Später in der Evolution war eine genauere Regulation dieser Signalwege nötig, weswegen

Regulatoren mit Phosphataseaktivität entstanden sein sollten. Darauffolgend könnte sich auch die Kinaseaktivität der Regulatoren entwickelt haben und in manchen Fällen ging die Phosphataseaktivität verloren (Wolfe, 2010).

Die Überprüfung der Phosphorylierung von Response Regulatoren *in vivo* durch Acetylphosphat ist häufig nicht trivial. Um einen Einfluss von AcP feststellen zu können, muss dies zum einen in Stämmen ohne die korrespondierende Sensorkinase durchgeführt werden, um deren Einfluss auf die Aktivität des Response Regulators zu verhindern. Außerdem muss diese Überprüfung unter Bedingungen erfolgen, in denen verschiedene intrazelluläre Mengen an Acetylphosphat vorliegen. Dazu muss die Acetylphosphatkonzentration intrazellulär verändert werden. Eine gängige Methode ist dabei die genetische Manipulation, und zwar das Ausschalten von Genen, deren Produkte enzymatisch an der Acetylphosphatsynthese beteiligt sind. In *E. coli* beispielsweise entsteht Acetylphosphat als Zwischenprodukt bei der reversiblen Reaktion von Acetyl-CoA in Acetat durch die Enzyme Pta (Phosphotransacetylase) und AckA (Acetatkinase). Die Phosphotransacetylase wandelt Acetyl-CoA in Acetylphosphat um, während die Acetatkinase Acetylphosphat und ADP in Acetat und ATP umwandelt. Das Ausschalten dieser Enzyme einzeln und in Kombination führt zur Akkumulation oder Verringerung von intrazellulärem Acetylphosphat. Eine weitere Möglichkeit, unterschiedliche Acetylphosphatkonzentrationen zu erzeugen, kann durch Wachstum mit unterschiedlichen Zuckerquellen erzielt werden oder direkt durch Änderung der Acetatkonzentration, welches als direktes Substrat von AckA verwendet wird (Wolfe, 2005; Wolfe, 2010).

In den meisten Fällen wird die Autophosphorylierung von Response Regulatoren unter Verwendung von Acetylphosphat durch die korrespondierende Sensorkinase unterdrückt. Nur in seltenen Fällen kann ein Einfluss von Acetylphosphat in Anwesenheit der Sensorkinase beobachtet werden (Wolfe, 2005). Aufgrund dessen ist man umgekehrt allerdings in der Lage, falls die Funktionalität der Sensorkinase nicht geklärt ist, diese näher zu charakterisieren. Ist beispielsweise unklar, ob sie bifunktionell agiert, so kann dies durch die Überprüfung der Aktivität des Response Regulators im Wildtyp mit der Aktivität in einem Stamm ohne Sensorkinase unter definierten Acetylphosphatbedingungen erfolgen.

2.6 Der Stoffwechsel von *S. pneumoniae*: Pyruvatmetabolismus und die Synthese von Acetylphosphat

Wie alle Streptokokken gehört *S. pneumoniae* zu den Milchsäurebakterien mit fermentativem Stoffwechsel. Die einzigen Nährstoffe, die von Pneumokokken zur Energiegewinnung verwertet werden können, sind Zucker. Sein zentraler Metabolismus besteht aus der Glykolyse, in der die Zucker zur Generierung von zwei Molekülen ATP durch Substratkettenphosphorylierung zu Pyruvat oxidiert werden (Hoskins *et al.*, 2001). *S. pneumoniae* besitzt keinen Citratzyklus und keine Atmungskette (Hoskins *et al.*, 2001; Ramos-Montanez *et al.*, 2010). Zudem fehlen viele Stoffwechselwege zur Synthese verschiedener essentieller Verbindungen wie Vitamine, Purine, Pyrimidine, Aminosäuren und Peptide (Hoskins *et al.*, 2001; Kazmierczak *et al.*, 2009; Tettelin *et al.*, 2001). Diese werden von Pneumokokken über den Wirt aufgenommen. Aufgrund dieser Nährstoffanforderungen wird zur Anzucht im Labor ein komplexes Kulturmedium, das diese Verbindungen enthält, verwendet. Während der Glykolyse werden zwei Moleküle NAD^+ zu NADH reduziert. In den Gärungsprozessen wird Pyruvat als Endprodukt der Glykolyse im Pyruvatmetabolismus weiter verwertet, wobei NADH wieder zu NAD^+ oxidiert und damit zur Wiederverwendung in der Glykolyse regeneriert wird, wodurch das Redoxpotenzial und der glykolytische Flux aufrechterhalten werden (Taniai *et al.*, 2008). Pneumokokken besitzen die Fähigkeit zum homofermentativen und heterofermentativen Metabolismus. Als Endprodukte der Pyruvatverwertung entstehen dabei Lactat, Acetat, Format und Ethanol, deren Konzentration abhängig von der Art der Gärungsprozesse variiert. Beide Gärungsarten befinden sich in *S. pneumoniae* in einem Gleichgewicht, das sich je nach verwendeter Zuckerquelle in Richtung homofermentativen und heterofermentativen Metabolismus verschiebt. Die bevorzugte Zuckerquelle von Pneumokokken ist Glucose (Carvalho *et al.*, 2011; Yesilkaya *et al.*, 2009). Diese liegt in geeigneter Konzentration im Blutstrom seines natürlichen Wirts während der Infektion der Atemwege vor (Philips *et al.*, 2003). Die Verwertung von Glucose erfolgt über den homofermentativen Stoffwechsel, bei dem Lactat als Hauptfermentationsprodukt sowie geringe Mengen an Acetat gebildet werden. Die Verwertung anderer Zucker als Glucose verschiebt den Pyruvatmetabolismus in Richtung heterofermentative Gärung, wobei neben Lactat auch Acetat, Format und Ethanol als Endprodukte gebildet werden (Carvalho *et al.*, 2011; Spellerberg *et al.*, 1996). Dies findet allerdings nur unter Glucose-limitierten Bedingungen bzw. in Abwesenheit von Glucose statt, da dieser Zucker bevorzugt verwertet wird. Zusätzlich wird hierbei während der Generierung von Acetat ein weiteres Molekül ATP gewonnen. Galactose beispielsweise, das in Pneumokokken vermutlich über den Leloir-Weg und den Tagatose-6-phosphat-Weg in die Glykolyse gelangt, führt zur Produktion gleicher Mengen Lactat und Acetat sowie gleichen Mengen an Format und Ethanol,

wobei Lactat und Acetat etwa 2/3 der Endprodukte, Formiat und Ethanol 1/3 der Endprodukte ausmachen. Die Wachstumsrate ist im Gegensatz zu Glucose als C-Quelle verlangsamt (Carvalho *et al.*, 2011; Yesilkaya *et al.*, 2009). Im Wirt verwerten Pneumokokken Galactose während der Infektion des Nasen- und Rachenraumes, da Galactose dort eine der vorherrschenden Zucker ist (King, 2010). Das Aufrechterhalten des fermentativen Stoffwechsels ist unabhängig von Sauerstoff. Pneumokokken sind aerotolerante Anaerobier, d.h. sie sind in der Lage in Anwesenheit von Sauerstoff zu wachsen, benötigen ihn aber nicht zum Überleben (Yesilkaya *et al.*, 2009).

Acetylphosphat entsteht in *S. pneumoniae* als Zwischenprodukt des Pyruvatmetabolismus, wo es in drei enzymatischen Reaktionen synthetisiert wird. Die Phosphotransacetylase (Pta) wandelt Acetyl-CoA und Phosphat (P_i) in Acetylphosphat und Coenzym A um. Die Acetatkinase (AckA) kann Acetat unter ATP-Verbrauch in Acetylphosphat und ADP umwandeln (Carvalho *et al.*, 2011; Ramos-Montanez *et al.*, 2010). Beide Reaktionen sind reversibel, wobei in letzterer das Reaktionsgleichgewicht vermutlich in Richtung Acetat liegt, da eine Deletion von *ackA* in vielen Organismen zur Akkumulation von Acetylphosphat führt (Wolfe, 2005). In Organismen ohne Zitratzyklus und Elektronentransportkette besitzt AckA eine wichtige Rolle bei der Energiegewinnung durch die Bereitstellung eines zusätzlichen Moleküls ATP (Wolfe, 2005; Wolfe, 2010). Die dritte enzymatische Reaktion, in der AcP entsteht, wird durch die Pyruvatoxidase (SpxB) katalysiert. SpxB decarboxyliert Pyruvat unter Verwendung von Phosphat in einer irreversiblen Reaktion und in Anwesenheit von Sauerstoff in Acetylphosphat um, wobei als Nebenprodukte CO_2 und H_2O_2 entstehen (Spellerberg *et al.*, 1996).

SpxB katalysiert in Pneumokokken offensichtlich den größten Teil der Acetylphosphatproduktion. Ausschalten des Gens für die Pyruvatoxidase führte in Arbeiten mit *S. pneumoniae* D39 zu einer Abnahme der intrazellulären AcP-Menge auf etwa 20% der des Wildtyps (Pericone *et al.*, 2003; Ramos-Montanez *et al.*, 2010). Weiterhin wurde ein Einfluss von SpxB auf die Virulenz und die Kompetenz von *S. pneumoniae* beobachtet (Bättig & Mühlemann, 2008; Ramos-Montanez *et al.*, 2008; Regev-Yochay *et al.*, 2007; Spellerberg *et al.*, 1996). Zudem entsteht in der durch SpxB katalysierten Reaktion toxisches H_2O_2 . *S. pneumoniae* besitzt zwar keine Katalase zur Entgiftung von H_2O_2 (Hoskins *et al.*, 2001), zeigt aber weitestgehend Resistenz gegen H_2O_2 , was durch die Expression von *spxB* selbst vermittelt wird (Pericone *et al.*, 2003). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass H_2O_2 als molekulares Signal einen Einfluss auf die Fettsäurezusammensetzung der Membran nimmt und somit eine Rolle bei der Anpassung der Membran an verschiedene Wachstumsbedingungen spielt (Benisty *et al.*, 2010). Weiterhin kann *S. pneumoniae* durch die Produktion von H_2O_2 das Wachstum kompetitiver Organismen wie *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* in seiner Umgebung hemmen (Pericone *et al.*, 2000). Dennoch wird das von SpxB synthetisierte H_2O_2 für das Absterben von *S. pneumoniae* in der stationären Wachstumsphase (Regev-Yochay *et al.*,

2007) verantwortlich gemacht. In Pneumokokken existieren verschiedene *spxB*-Allele, die eine unterschiedliche Aktivität von SpxB bewirken und damit einen Einfluss auf die bereits von Avery *et al.* (1944) beobachtete raue bzw. glatte Morphologie der Kolonien auf Blutagarplatten haben (Belanger *et al.*, 2004; Ramos-Montanez *et al.*, 2008). Die Expression von *spxB* ist abhängig von den transkriptionellen Regulatoren SpxR, der auf Adenosyl- und Coenzym A-enthaltende Komponenten reagiert (Ramos-Montanez *et al.*, 2008), und CcpA, dem Kernprotein zur Kontrolle des Katabolismus in grampositiven Bakterien (Carvalho *et al.*, 2011).

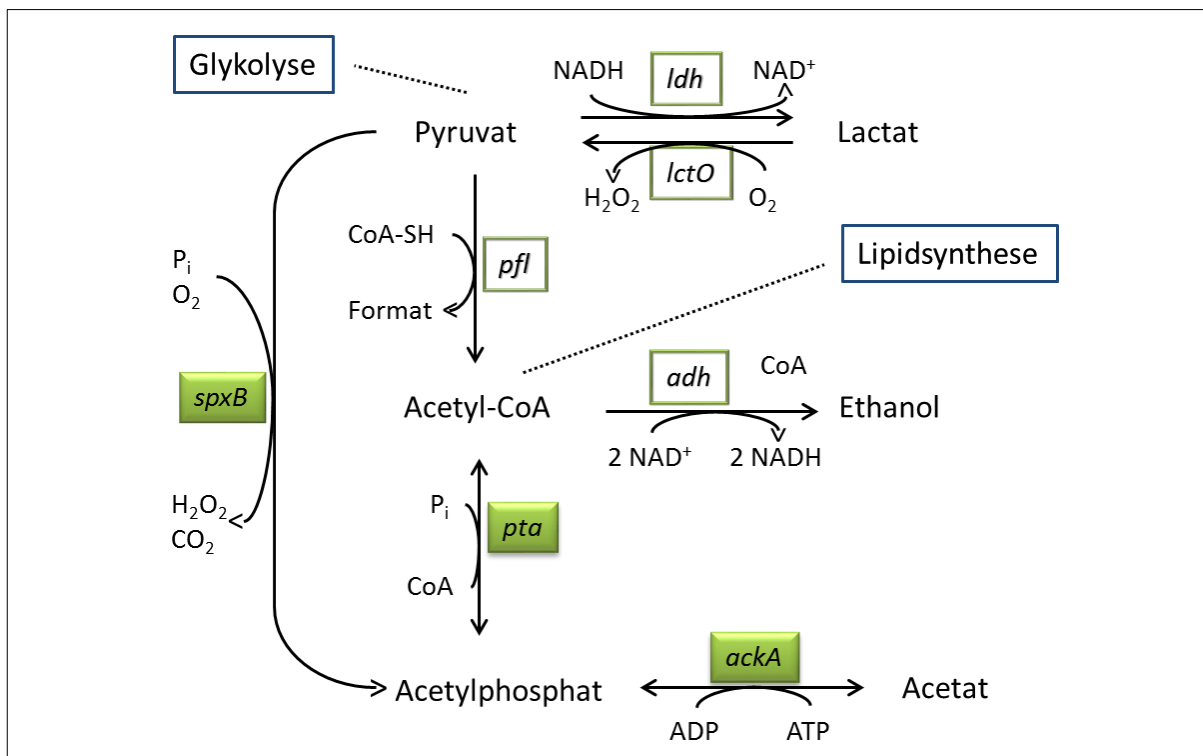


Abb. 2.5 Schematische Darstellung des Pyruvatmetabolismus in *S. pneumoniae* (nach Carvalho *et al.* 2011 und Ramos-Montanez *et al.* 2010). Pyruvat entsteht als Endprodukt der Glykolyse zur Generation von zwei Molekülen ATP. Homofermentativer Stoffwechsel führt hauptsächlich zur Bildung von Lactat, während im heterofermentativen Stoffwechsel zusätzlich Acetat, Format und Ethanol gebildet werden. Die Gene, deren Produkte die jeweilige Reaktion durchführen, sind in Kästen dargestellt, wobei diejenigen zur Synthese von Acetylphosphat grün markiert sind: *spxB*, Pyruvat Oxidase; *pta*, Phosphotransacetylase; *ackA*, Acetatkinase; *ldh*, Lactatdehydrogenase; *lctO*, Lactatoxidase; *pfl*, Pyruvat-Format-Lyase; *adh*, Alkoholdehydrogenase. Acetyl-CoA wird auch zur Lipidsynthese verwendet.

Der Pta-AckA Reaktionsweg in *S. pneumoniae* ist weitestgehend uncharakterisiert. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Expression von *pta* und *ackA* abhängig von CcpA ist (Carvalho *et al.*, 2011). In Arbeiten mit *S. pneumoniae* D39 sind Deletionen von *pta* und *ackA* beschrieben. Inaktivierung von *pta* führt zu leicht verringerter Koloniegröße auf Blutagarplatten. Die Inaktivierung von *ackA* führt zur Instabilität des Stammes und zur Akkumulation von Suppressormutationen im

Kapselgencluster sowie in den Genen *spxB* und *spxR*. Eine stabile Inaktivierung von *ackA* benötigt zuvor offensichtlich die Deletion von *spxB* (Ramos-Montanez *et al.*, 2010).

Demnach ist die Veränderung der AcP-Konzentration in *S. pneumoniae* durch genetische Manipulation nicht banal, aber ein Ausschalten der drei Gene zur AcP-Synthese prinzipiell möglich. Aufgrund des Wechsels zwischen homofermentativem und heterofermentativem Metabolismus ist es denkbar, dass durch verschiedene Zuckerquellen im Wachstumsmedium die zelluläre AcP-Produktion verändert werden kann. Außerdem könnte die AcP-Menge durch Änderung der Acetatkonzentration im Wachstumsmedium verändert werden, da Acetat das Substrat von *AckA* darstellt. Über die Aufnahme von Acetat ist in *S. pneumoniae* jedoch nichts bekannt. In *E. coli* wird angenommen, dass Acetat durch die Membran permeieren kann, jedoch wird auch ein Transportsystem für Acetat vermutet (Wolfe, 2005).

2.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Zwei-Komponenten System *CiaRH* wurde in einer Studie zur Untersuchung der Entstehung von β -Lactamresistenzen in *S. pneumoniae* R6 (Laible & Hakenbeck, 1987) als erste Nicht-PBP Resistenzdeterminante identifiziert. Eine Punktmutation im für die Sensor kinase *CiaH* kodierenden Gen führte zum Aminosäureaustausch von Threonin zu Prolin (*ciaH306*; T230P) in der Nähe des konservierten Histidinrests (Guenzi *et al.*, 1994). Diese *ciaH306*-Variante führte neben einer verringerten Suszeptibilität gegen das β -Lactamantibiotikum Cefotaxim auch zu einem Verlust der natürlichen Kompetenz (Giammarinaro *et al.*, 1999; Guenzi *et al.*, 1994; Mascher *et al.*, 2003) sowie zu einer früheren Autolyse in der stationären Wachstumsphase (Mascher *et al.*, 2006a). Durch die *ciaH306*-Mutation wird die transkriptionelle Regulation durch den Response Regulator *CiaR* stimuliert (Giammarinaro *et al.*, 1999; Halfmann *et al.*, 2007b; Mascher *et al.*, 2003), was als Hyperaktivierung von *CiaR* bezeichnet wurde (Müller *et al.*, 2011). Die in der Studie von Laible und Hakenbeck (1987) erzeugten cefotaxim- und piperacillinresistenten Mutanten weisen in mehreren Familien weitere Mutationen in *ciaH* auf (Zähner *et al.*, 2002). Alle *ciaH*-Allele der Mutantenfamilien bewirken eine Erhöhung der *CiaR*-Aktivität und verursachen die gleichen Phänotypen wie *ciaH306*, wobei die Stärke der Aktivierung in Zusammenhang mit den Phänotypen steht (Müller *et al.*, 2011). Veränderungen in *ciaH* schienen auf Labormutanten beschränkt zu sein, bis im Jahre 2010 die erste *ciaH*-Mutation in dem vancomycintoleranten Isolat *S. pneumoniae* Tupelo beschrieben wurde (Moscoso *et al.*, 2010). Zudem wurde eine Reihe klinischer Pneumokokken-Genome veröffentlicht. Eine detaillierte Analyse zur Identifizierung weiterer Änderungen in *ciaH*-Genen in klinischen Isolaten wird in dieser Arbeit durchgeführt. Die neuen entdeckten klinischen *ciaH*-Allele werden analog zu

den Untersuchungen der Laborallele bzgl. ihres Einflusses auf die Aktivität von CiaR überprüft sowie die phänotypischen Konsequenzen auf *S. pneumoniae* R6 untersucht und mit denen der Laborallele verglichen.

Neben der Untersuchung der Auswirkungen von Änderungen in CiaH auf die Aktivität von CiaRH beschäftigt sich diese Arbeit auch eingehend mit der CiaR-Aktivität, wenn CiaH nicht funktionell ist. Die Inaktivierung von *ciaH* führt während des Wachstums von *S. pneumoniae* in dem semisynthetischen C+Y-Medium nicht zum Verlust der CiaR-vermittelten Promotoraktivität, sie nimmt im Gegenteil sogar leicht zu (Halfmann *et al.*, 2011). Demnach scheint es für CiaR andere Quellen zu geben, die als Phosphodonor für CiaR agieren können. Denkbar ist, dass die Phosphorylierung von CiaR über Crosstalk durch eine andere Histidinkinase stattfindet oder über Autophosphorylierung durch kleine, hoch energetische Moleküle wie Acetylphosphat (Laub & Goulian, 2007; Lukat *et al.*, 1992). Dass AcP *in vivo* als Phosphodonor für CiaR agieren könnte, wird unterstützt durch die Tatsache, dass dieses Molekül *in vitro* die Bindungsaffinität von CiaR zu seiner DNA-Bindestelle deutlich erhöht (Halfmann *et al.*, 2011). In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die CiaH-unabhängige Aktivierung von CiaR *in vivo* tatsächlich durch AcP erfolgt. Dazu soll die zelluläre AcP-Produktion in *S. pneumoniae* variiert werden und mittels vergleichender Aktivitätsanalyse CiaR-regulierter Promotoren der Einfluss von AcP auf die CiaR-Aktivität überprüft werden. Zudem wird unter den jeweiligen Bedingungen veränderter AcP-Konzentrationen näher auf die Rolle von CiaH eingegangen.

Die CiaH-unabhängige Aktivierung von CiaR ist abhängig vom Wachstumsmedium. Während in C+Y-Medium bei inaktivierter CiaH die CiaR-Aktivität leicht ansteigt, fällt sie in BHI-Medium dagegen drastisch ab (Halfmann *et al.*, 2011). Daher wird auch der Zusammenhang der zellulären AcP-Konzentration von *S. pneumoniae* nach dem Wachstum in beiden Medien und der CiaH-unabhängigen CiaR-Aktivität untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

In Tab. 3.1 sind die Bakterienstämme aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Tab. 3.2 zeigt die Derivate von *S. pneumoniae* R6, die als Ausgangsstämme für die in dieser Arbeit konstruierten Stämme in Tab. 3.3 – 3.5 dienen.

Tab. 3.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp, relevante Merkmale	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5α	φ80dlacZΔM15, (<i>lacZYA-argF</i>), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>phoA</i> , <i>relA1</i>	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	kapsellos, Serotyp 2	(Ottolenghi & Hotchkiss, 1962)
<i>S. pneumoniae</i> Hu15	Kapsel, Serotyp 19A	(Müller <i>et al.</i> , 2011; Reichmann <i>et al.</i> , 1995)
<i>S. pneumoniae</i> Hu17	Kapsel, Serotyp 19A	(Müller <i>et al.</i> , 2011; Reichmann <i>et al.</i> , 1995)
<i>S. pneumoniae</i> Tupelo_VT	Kapsel, Serotyp 14	(McCullers <i>et al.</i> , 2000; Moscoso <i>et al.</i> , 2010)

Tab. 3.2: In dieser Arbeit verwendete Derivate von *S. pneumoniae* R6

RKL-Nummer	Stamm (Genotyp, relevante Merkmale)	Referenz
	R6 <i>ciaH::aad9</i> (<i>Spc^R</i>)	(Halfmann <i>et al.</i> , 2011)
	R6 <i>ciaR::aad9</i> (<i>Spc^R</i>)	(Halfmann <i>et al.</i> , 2007b)
RKL161	R6 <i>rpsL41 ciaH::aphIII rpsL</i> (Januskassette in <i>ciaH</i> , <i>Sm^S</i> , <i>Kan^R</i>)	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL222	R6 <i>rpoB</i> C1456T (<i>Rif^R</i>)	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL242	R6 <i>rpsL41</i> (<i>Sm^R</i>)	(Halfmann <i>et al.</i> , 2011)
RKL168	R6 <i>ciaH306 rpsL41</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL188	RKL168, <i>bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL189	RKL168, <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL43	R6 <i>bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2007b)
RKL30	R6 <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2007b)
RKL20	R6 <i>bgaA::tetM-PccnA-lacZ</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2007b)
RKL45	R6 <i>bgaA::tetM-PvegM-lacZ</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2007b)
RKL86	R6 <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2011)
RKL81	R6 <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2011)
RKL74	R6 <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-PccnA-lacZ</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2011)
RKL87	R6 <i>ciaH::aad9 bgaA::tetM-PvegM-lacZ</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2011)
RKL95	R6 <i>spxB::ermB</i>	(Halfmann, 2008)
RKL98	R6 <i>spxB::ermB bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	(Halfmann, 2008)
RKL96	R6 <i>spxB::ermB bgaA::tetM-PccnA-lacZ</i>	(Halfmann, 2008)
RKL99	R6 <i>spxB::ermB bgaA::tetM-PvegM-lacZ</i>	(Halfmann, 2008)
RKL102	R6 <i>ciaH::aad9 spxB::ermB bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	(Halfmann, 2008)
RKL100	R6 <i>ciaH::aad9 spxB::ermB bgaA::tetM-PccnA-lacZ</i>	(Halfmann, 2008)

3. Material und Methoden

RKL103	R6 <i>ciaH::aad9 spxB::ermB bgaA::tetM-PvegM-lacZ</i>	(Halfmann, 2008)
	R6 <i>htrA::lox72</i>	(Peters, unveröffentlicht)
RKL229	R6 <i>ccnC::lox72 ccnD::lox72 ccnE::lox72 ccnAB::lox72</i>	(Kovács, 2009)
RKL501	R6 <i>spxB::ermB bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	(Halfmann, unveröffentlicht)
RKL502	R6 <i>spxB::ermB ciaH::aad9 bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	(Halfmann, unveröffentlicht)

Tab. 3.3: Derivate von *S. pneumoniae* R6 mit Veränderungen in *ciaH*

RKL-Nummer	Stamm (Genotyp, relevante Merkmale)	Referenz
RKL243	R6 <i>ciaH232 rpsL41</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL244	R6 <i>ciaH_{TPVT} rpsL41</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL245	R6 <i>ciaH556 rpsL41</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL246	R6 <i>ciaH1057 rpsL41</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL248	RKL243, <i>bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL249	RKL243, <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL251	RKL244, <i>bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL252	RKL244, <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL254	RKL245, <i>bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL255	RKL245, <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL257	RKL246, <i>bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)
RKL258	RKL246, <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	(Müller <i>et al.</i> , 2011)

Tab. 3.4: Derivate von *S. pneumoniae* R6 mit Deletionen im Acetylphosphat-Syntheseweg

RKL-Nummer	Stamm	Referenz
RKL366	RKL95 <i>bgaA::tetM-PccnA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL369	R6 <i>spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL370	R6 <i>spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL371	R6 <i>spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII bgaA::tetM-PccnA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL372	R6 <i>spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII bgaA::tetM-PvegM-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL377	RKL369 <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL379	R6 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL380	R6 <i>pta::cat</i>	diese Arbeit
RKL381	RKL43 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL382	RKL30, <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL383	RKL20 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL384	RKL45 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL386	RKL380 <i>bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL387	RKL380 <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL388	RKL380 <i>bgaA::tetM-PccnA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL389	RKL380 <i>bgaA::tetM-PvegM-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL394	RKL95 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL395	RKL98 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL396	RKL100 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL397	RKL367 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL398	RKL368 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL399	RKL380 <i>spxB::ermB</i>	diese Arbeit
RKL395	RKL98, <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL396	RKL501, <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL397	RKL366, <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL398	RKL99, <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit

3. Material und Methoden

RKL406	RKL399 <i>bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL407	RKL399 <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL408	RKL399 <i>bgaA::tetM-PccnA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL409	RKL399 <i>bgaA::tetM-PvegM-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL416	RKL380 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL417	RKL386 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL418	RKL387 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL419	RKL388 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL420	RKL389 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit

Tab. 3.5: Derivate von *S. pneumoniae* R6 mit Deletionen im Acetylphosphat-Syntheseweg und inaktivierten *ciaH*

RKL-Nummer	Stamm	Referenz
RKL367	RKL74 <i>spxB::ermB</i>	diese Arbeit
RKL368	RKL87 <i>spxB::ermB</i>	diese Arbeit
RKL373	R6 <i>ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL374	R6 <i>ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL375	R6 <i>ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII bgaA::tetM-PccnA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL376	R6 <i>ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII bgaA::tetM-PvegM-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL378	RKL373 <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL385	RKL380 <i>ciaH::aad9</i>	diese Arbeit
RKL390	RKL385 <i>bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL391	RKL385 <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL392	RKL385 <i>bgaA::tetM-PccnA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL393	RKL385 <i>bgaA::tetM-PvegM-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL400	R6 <i>ciaH::aad9, spxB::ermB</i>	diese Arbeit
RKL401	RKL400 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL402	RKL102 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL403	RKL502 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL404	RKL367 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL405	RKL368 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL410	RKL399 <i>ciaH::aad9</i>	diese Arbeit
RKL411	RKL385 <i>spxB::ermB</i>	diese Arbeit
RKL412	RKL390 <i>spxB::ermB</i>	diese Arbeit
RKL413	RKL391 <i>spxB::ermB</i>	diese Arbeit
RKL414	RKL392 <i>spxB::ermB</i>	diese Arbeit
RKL415	RKL393 <i>spxB::ermB</i>	diese Arbeit
RKL421	R6 <i>htrA::lox72 ciaH::aad9</i>	diese Arbeit
RKL422	RKL421 <i>bgaA::tetM-PhtrA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL423	RKL421 <i>bgaA::tetM-Pspr0931-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL424	RKL421 <i>bgaA::tetM-PccnA-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL425	RKL421 <i>bgaA::tetM-PvegM-lacZ</i>	diese Arbeit
RKL426	RKL421 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL427	RKL422 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL428	RKL423 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL429	RKL424 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL430	RKL425 <i>ackA::aphIII</i>	diese Arbeit
RKL502	RKL229 <i>ciaH::aad9</i>	diese Arbeit

3.2 Plasmide

In Tab. 3.6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide dargestellt, die Plasmide sind replikativ in *E. coli* und integrativ in *S. pneumoniae*.

Tab. 3.6: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Selektionsbedingungen	Referenz
pPP2- <i>htrA</i>	pPP2-Derivat, <i>PhtrA-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> , Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2007b)
pPP2-spr0931	pPP2-Derivat, <i>Psp0931-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> , Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2007b)
pPP2- <i>ccnA</i>	pPP2-Derivat, <i>PccnA-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> , Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2007b)
pPP2- <i>vegM</i>	pPP2-Derivat, <i>PvegM-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> , Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	(Halfmann <i>et al.</i> , 2007b)

3.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Die Oligonukleotid-Stammlösungen wurden in einer Konzentration von 100 pmol/µl in 1xTE hergestellt, die Gebrauchslösungen (10 pmol/µl) durch 1:10 Verdünnung der Stammlösungen in H₂O. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

In Tab 3.7 sind die Oligonukleotide zur Überprüfung der korrekten Integration der pPP2-Derivate in das Genom von *S. pneumoniae* R6 aufgelistet.

Tab. 3.7: Oligonukleotide zur Überprüfung der korrekten Integration der pPP2-Derivate in das Genom von *S. pneumoniae*

Primernamen	Sequenz (5' → 3')
EII_fwd_Kontr	GATATCTGGCACTTGTCTATCACAGG
tetM_rev_kontr	TATCTTTACGGGCATATAACGATGC
lacZ_fwd_kontr	CGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTG
bgaA_rev_Kontr	GGGATTGGTACTTATGGCCAATAACC

Tab. 3.8 zeigt die Oligonukleotide, die zur Amplifikation und Sequenzierung der *ciaRH*-Region sowie zur Überprüfung der Integration der *ciaH*-Deletion verwendet wurden, Tab. 3.9 die Oligonukleotide

3. Material und Methoden

zur Darstellung von Punktmutationen in *ciaH*. In Tab. 3.10 sind die Oligonukleotide aufgelistet, die zur Amplifikation und Überprüfung der Integration der Deletionen von *spxB*, *pta* und *ackA* verwendet wurden, sowie zur Amplifikation und Sequenzierung der *spxB*- und *spxR*-Regionen dargestellt.

Tab. 3.8: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der *ciaRH*-Region und zur Überprüfung der Integration der *ciaH*-Deletion

Primername	Sequenz (5' → 3')
CiaHup_ff	CGGTATGGGAATCAAGGAAATTGCAGCACG
CiaHdown_rr	CCAAGAAGTCTAAGAAAGGCTTGATACGGTCC
CiaH_for	TCGGTTGTGCAAGTCTATGTTTCAAAGTC
CiaH_rev	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
Cia_P3	GGTGTCTATGACTTGATTTTGCTGGCTTGATGTTGCC
R1728	CCCATCATCTCTCCGAGC
CiaR_down_r	CACATCCATAATGGTAGCTTCTGGCTTACG
CiaHup_f	TGCAGTCGAAGCAGTTGTTCTTCAATACGG
CiaHdown_r	ATTGACCGCAACGAGCAATTCCTTACCAGC

Tab. 3.9: Oligonukleotide zur Generierung gerichteter Mutagenesen in *ciaH*

Primername	Sequenz (5' → 3')
Mut-CiaHV186l_f	GCAATTGATTGTG <u>A</u> TCGTGATGGC
Mut-CiaHV186l_r	GCCATCACGA <u>T</u> CACAATCAATTGC
Mut-CiaHD353N_f	GGAGGATGGTGAAATT <u>A</u> ATTTTCTTATCTCG
Mut-CiaHD353N_r	CGAGATAAGAAAAT <u>T</u> AATTTACCACCTCTCC

Die Nukleotide zur Einbringung der gewünschten Mutation sind unterstrichen

Tab. 3.10: Oligonukleotide zur Amplifikation und Überprüfung der Integration der Deletionen von *spxB*, *pta* und *ackA* und zur Amplifikation und Sequenzierung der *spxB*- und *spxR*-Regionen

Primername	Sequenz (5' → 3')
spxB_for	GGCCTTAGTTCTGTATCTGTTCTG
spxB_rvs	GTCAAATGACTACGCGACCTATTTCC
ptaf3	GGAGACGGGCTAACAGTTTC
ptar2	GGGAATTTATCGTTTTACGGAC
ackAf4	GTGGAGCAGCAAGCAATCAAG
ackAr4	TGTGCCTGTACTACGGCCTCG
spxB_fwd2	CGGTTCAAGTTCATACGAACGCTC
spxB_rev2	CAACTGGGTTTACTTTGTCAAGG
ackAseqf2	GCCCATCACTTGCTCATGG
ackAseqr2	GACTCCTTTTGCATTCTGG
spxB_fwd3	CTCCATGGTGGCGTGCAAAC
spxB_r2	CAAGTCAGCACAGACTTGGG
spxB_rev3	GAGCGTTCGTATGAACCTGAACCG
spxR-F1	GTGTGGGCAATTTGTGACCAG
spxR-F2	GGAGACCCGTCCTAGAAGTG
spxR-F3	GGGATTCCTGTTCTAAGAAG
spxR-R1	AAAGCGTGAGCCACTTCATCG
spxR-R2	CCACTGTAATGACTACTTC
spxR-R3	CTTCTTAGAACAGGAATCCC

3.4 Nährmedien

3.4.1 C+Y-Medium

Bei dem C+Y-Medium (Lacks & Hotchkiss, 1960) handelt es sich um ein semisynthetisches Komplexmedium, das in dieser Arbeit, sofern nicht gesondert angegeben, für die Anzucht und Transformation von *S. pneumoniae*-Stämmen verwendet wurde. Die Zusammensetzung des C+Y-Mediums, sowie seiner Einzelkomponenten und deren Zusätze sind in den Tab. 3.11 - 3.13 dargestellt. Die Einzelkomponenten wurden getrennt voneinander autoklaviert oder sterilfiltriert und bei Bedarf steril zusammenpipettiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C unter Lichtausschluss.

Tab. 3.11: Zusammensetzung des C+Y-Mediums

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

Tab. 3.12: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C+Y-Medium

Komponente	Menge
PreC	
Na-Acetat, wasserfrei	1,2 g
Casaminosäuren	5 g
L-Tryptophan	5 mg
L-Cystein	50 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1 l
pH 7,5 einstellen mit NaOH, autoklavieren	
Supplement	
3 in 1 Salze	60 ml
Glucose (20 %)	120 ml
Saccharose (50 %)	6 ml
Adenosin (2 mg/ml)	120 ml
Uridin (2 mg/ml)	120 ml
alle Komponenten einzeln autoklavieren, Supplement steril zusammenpipettieren	
Adams III	
Adams I	160 ml
Adams II	40 ml
Asparagin	2 g
Cholinchlorid	200 mg
CaCl ₂ (0,1 M)	1,6 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1 l
sterilfiltrieren und in abgedunkelten Gefäßen lagern	

Phosphatpuffer, pH 8

1M KH ₂ PO ₄	53 ml
1M K ₂ HPO ₄	947 ml
autoklavieren	

Tab. 3.13: Zusätze der Einzelkomponenten des C+Y-Mediums

Komponente	Menge
3 in 1 Salze	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 g
CaCl ₂ , wasserfrei	500 mg
100 mM MnSO ₄ x 4 H ₂ O	200 µl
H ₂ O _{dest}	ad 1 l
autoklavieren	
Adams I	
Biotin	150 µg
Nicotinsäure	150 mg
Pyridoxin-HCl (B ₆)	175 mg
Ca-Pantothenat	600 mg
Thiamin-HCl	160 mg
Riboflavin	70 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1 l
sterilfiltrieren und in abgedunkelten Gefäßen lagern	
Adams II	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	500 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	200 mg
HCl _{konz.}	10 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1 l
sterilfiltrieren und in abgedunkelten Gefäßen lagern	

3.4.2 Modifizierte C+Y-Medien

Neben dem klassischen C+Y-Medium, das in dieser Arbeit zur Anzucht und Transformation von *S. pneumoniae* verwendet wurde, wurden weiterhin, zur Untersuchung der CiaR-Aktivität, C+Y-Medien mit veränderter Acetatkonzentration sowie veränderter Kohlenstoffquelle (C-Quelle) verwendet.

Änderung der Acetatkonzentration im C+Y-Medium

Klassisches C+Y-Medium enthält Natriumacetat in einer Endkonzentration von 12,5 mmol/l in der Einzelkomponente PreC (Tab. 3.12).

In dieser Arbeit wurden, neben dem klassischen C+Y-Medium mit 12,5 mmol/l Na-Acetat, C+Y-Medien mit 0, 25 und 50 mmol/l Na-Acetat sowie 50 mmol/l Kaliumacetat und 50 mmol/l NaCl

anstelle des Na-Acetats verwendet. Die jeweilige Menge der Acetate bzw. des NaCl wurde der Einzelkomponente PreC zugegeben. Die somit veränderten PreC-Zusammensetzungen wurden mit den weiteren Komponenten gemischt und bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

Änderung der Kohlenstoffquelle im C+Y-Medium

Das standardmäßig verwendete C+Y-Medium enthält Glucose in einer Endkonzentration von 0,16% und Saccharose in einer Endkonzentration von 0,02%. Die Kohlenstoffquellen sind in der Einzelkomponente Supplement enthalten (Tab 3.12).

Neben dem klassischen C+Y-Medium, wurden in dieser Arbeit C+Y-Medien mit veränderter C-Quelle verwendet. Diese C+Y-Medien enthielten jeweils nur eine einzelne C-Quelle (Glucose, Lactose oder Galactose).

Hierzu wurde die Einzelkomponente Supplement folgendermaßen modifiziert: Die Zucker Glucose, Lactose bzw. Galactose wurden in einer Menge von 120 ml in 20%iger Lösung einzeln autoklaviert und anschließend mit den übrigen Zusätzen des Supplements zusammenpipettiert und sterilfiltriert. Die Menge an enthaltener 50%iger Saccharose-Lösung, die im klassischen Supplement enthalten ist, wurde durch die gleiche Menge an H₂O_{dest} ersetzt. Die jeweiligen modifizierten C+Y-Medien wurden als C+Y_{Glc}⁻, C+Y_{Lac}⁻ und C+Y_{Gal}⁻-Medium (Glucose, Lactose bzw. Galactose als C-Quelle) bezeichnet.

3.4.3 D-Blutagar

Als Festmedium für *S. pneumoniae* wurde D-Agar (Tab. 3.14) mit defibriniertem Schafsblut (Oxoid GmbH, Wesel) verwendet. Das Blut wurde dem autoklavierten D-Agar in einer Endkonzentration von 3 % (v/v) zugesetzt, nachdem dieser auf 48-50°C abgekühlt war. Bei Bedarf wurden dem Medium Antibiotika in den benötigten Konzentrationen zugegeben (Tab. 3.15).

Tab. 3.14: Zusammensetzung des D-Agars

Komponente	Menge
Glucose	1 g
NaCl	5 g
Tris	1,25 g
Bactopepton	10 g
Neopepton	5 g
Hefeextrakt	1,5 g
Agar	15 g
H ₂ O _{dest}	1 l

3.4.4 BHI-Medium

BHI-Medium (Brain Heart Infusion) wurde als Fertigpulver bezogen, nach Herstellerangaben (Becton, Dickinson) angesetzt und für 15 Minuten autoklaviert.

Weiterhin wurde in einigen Experimenten BHI_{Acetat}-Medium verwendet. Dieses setzt sich aus BHI-Medium (Becton, Dickinson) und Natrium-Acetat (Stammlösung: 3M; pH 7,8) in einer Endkonzentration von 50 mmol/l zusammen. Beide Komponenten wurden nach dem Autoklavieren steril zusammenpipettiert.

3.4.5 LB-Medium und LB-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 H₂O_{dest} versetzt und autoklaviert. Zur Anzucht von *E. coli* auf Festmedium wurde LB-Agar verwendet, der ebenfalls als Fertigpulver von der Firma Roth bezogen und nach Herstellerangaben angesetzt wurde. Dem Agar bzw. Medium wurden nach dem Autoklavieren gegebenenfalls Antibiotika (Tab. 3.15) in entsprechender Konzentration zugegeben.

Tab. 3.15 In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel der Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	H ₂ O _{dest}	100 µg/ml
Cefotaxim	H ₂ O _{dest}	variabel
Chloramphenicol	EtOH p.a., 70 %	3 µg/ml
Erythromycin	EtOH p.a., 50 %	0,5 µg/ml
Kanamycin	H ₂ O _{dest}	200 µg/ml
Oxacillin	H ₂ O _{dest}	variabel
Rifampicin	DMSO	0,5 µg/ml
Spectinomycin	H ₂ O _{dest}	80 µg/ml
Streptomycin	H ₂ O _{dest}	200 µg/ml
Tetracyclin	EtOH p.a., 70 %	3 µg/ml

3.5 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

3.5.1 Bakterienwachstum

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 in einer Verdünnung von mindestens 1:20 entweder aus einer Glycerinkultur oder einer exponentiell wachsenden Kultur in vorgewärmtes Medium. Alternativ wurden Kolonien von einer D-Blutagar- bzw. LB-Agarplatte angeimpft.

Die Wachstumsmessung erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer (Ultrospec 500, Biochrom Ltd). Als Referenz diente das jeweils verwendete unbeimpfte Medium.

Die Bestimmung der Wachstumsrate μ und der Generationszeit g erfolgte über den linearen Bereich der halblogarithmisch dargestellten exponentiellen Wachstumsphase nach der Formel:

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

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

X = Zellzahl zum Zeitpunkt t

X_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt t_0 ,

$t - t_0$ = Zeitdifferenz [min]

Zum Wachstum auf Festmedien wurden die Glycerinkulturen bzw. Einzelkolonien mit einer Impföse oder sterilen Zahnstochern auf dem Nähragar ausgestrichen oder entsprechende Mengen der Flüssigkulturen mit einem Drygalsky-Spatel ausplattiert und anschließend bei 37°C inkubiert.

3.5.2 Stammkonservierung

Eine geeignete Methode zur dauerhaften Konservierung von Bakterienkulturen ist das Anlegen von Glycerinkulturen. Glycerin dient hierbei als Gefrierschutzmittel, da es den Gefrierpunkt von Wasser herabsetzt und somit verhindert, dass sich Eiskristalle in den Bakterien bilden. Es wirkt damit stabilisierend auf den Lebensapparat. Dadurch kann die Lebensfähigkeit von Bakterien über lange Zeiträume erhalten werden.

Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurde Glycerin (99,5 %) in Reagenzgläsern vorgelegt und mit der wachsenden Kultur gemischt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (ERG) aliquotiert. Alternativ wurde Glycerin direkt in ERGs vorlegt und mit der wachsenden Kultur gemischt. Der Glycerinanteil betrug hierbei 10-20%. Diese Mischung wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Aufgetaute Glycerinkulturen wurden nicht wieder eingefroren, sondern

verworfen. Zur Überprüfung der Reinheit der Glycerinkulturen wurden diese auf dem jeweils zu verwendenden Nähragar ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

3.5.3 Mikroskopie

Zur Untersuchung der Zellmorphologie und Reinheit von Bakterienkulturen wurde eine mikroskopische Analyse durchgeführt. Hierzu wurden 5-10 µl einer wachsenden Kultur auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas überschichtet. Zur Minimierung der Flüssigkeit zwischen Objektträger und Deckglas wurde das Deckglas mit einem Wischtuch (Kimberly-Clark) angedrückt. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mittels Nikon Eclipse E600 durch ein 100x-Objektiv unter Verwendung von Immersionsöl. Die Zellmorphologie wurde mit einer Kamera dokumentiert und mittels Software (LUCIA Image) analysiert.

3.6 Transformation von *Streptococcus pneumoniae* R6

3.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

Streptococcus pneumoniae ist ein natürlich kompetentes Bakterium, das seine maximale Kompetenz in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase erreicht. Zur Herstellung kompetenter *S. pneumoniae*-Zellen wurde daher die Kultur des zu transformierenden Stammes in C+Y-Medium, in dem sich *S. pneumoniae* als besonders kompetent zeigt, bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,3 angezogen und als Glycerinkultur in 200 µl Aliquots konserviert. Gegebenenfalls wurde zur Steigerung der Kompetenz dem C+Y-Medium Rinderserumalbumin (BSA, Sigma Aldrich) in einer Endkonzentration von 0,072 % zugegeben. In besonderen Fällen wurde die exponentiell wachsende Kultur direkt transformiert ohne vorheriges Anlegen der Glycerinkultur.

3.6.2 Transformation von *S. pneumoniae*

Zur Transformation von *S. pneumoniae* wurde eine Glycerinkultur kompetenter Zellen auf Eis auftauen gelassen. 20 µl der kompetenten Zellen wurden 1:10 in 180 µl C+Y-Medium verdünnt und mit 50-500 ng der zu transformierenden DNA versetzt.

Zur Aufnahme der DNA wurden die Ansätze für 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte zur phänotypischen Expression eine weitere Inkubation für 2 Stunden bei 37°C

im Wasserbad. Die Transformationsansätze wurden unverdünnt sowie in geeigneten Verdünnungen in Saline (0,9 % NaCl) auf mit dem benötigten Antibiotikum versetzten, selektiven D-Blutagar ausplattiert.

Die Inkubation erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C für mindestens 18 Stunden. Einzelkolonien erhaltener Transformanten wurden großflächig auf dieselben selektiven D-Blutagarplatten ausgestrichen und erneut für mindestens 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Diese somit großflächig gewachsenen Kolonien wurden in 2-4 ml vorgewärmtes C+Y-Medium überimpft und bei 37°C im Wasserbad inkubiert bis die Kultur dicht bewachsen war. Anschließend wurden davon Glycerinkulturen hergestellt, die bei -80°C dauerhaft gelagert wurden.

Gegebenenfalls wurde zur Steigerung der Transformationseffizienz der wachsenden Kultur direkt DNA zugegeben ohne vorheriges Anlegen von Glycerinkulturen. Des Weiteren wurde den Transformationsansätzen CSP (competence stimulating peptide) in einer Endkonzentration 100 ng/ml zugefügt, da dieses Peptid die Kompetenz induziert (Håvarstein *et al.*, 1995). Bei Zugabe von CSP wurden die Transformationsansätze zusätzlich für 5 min bei 37°C inkubiert und erst darauffolgend für 30 min bei 30°C inkubiert.

Zur Inkubation der Transformanten von *S. pneumoniae* R6 unter anaeroben Bedingungen wurden die D-Blutagarplatten luftdicht in einem Anaerobiertopf unter Verwendung von Anaerocult C bei 37 °C verschlossen. Anaerocult C setzt sich aus Kieselgur, Eisenpulver, Natriumcarbonat und Zitronensäure zusammen. Durch Zugabe von 6 ml Wasser auf den Beutel entsteht nach 1-2 Stunden unter luftdichten Bedingungen eine anaerobe Atmosphäre. Dabei wird eine bestimmte Menge Sauerstoff an das Eisenpulver chemisch gebunden und gleichzeitig CO₂ aus Natriumcarbonat freigesetzt. Somit entsteht in einem 2,5l Anaerobiertopf eine Atmosphäre mit ca. 8-10% Kohlendioxid und 5-7% Sauerstoff. Die Inkubationsbedingungen blieben ansonsten gleich.

3.6.3 Bestimmung der Transformationseffizienz

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung der Kompetenz von *S. pneumoniae*-Stämmen mit verändertem *ciaH* während des exponentiellen Wachstums untersucht.

Zur Beobachtung der Kompetenzentwicklung war es wichtig, dass sich die Kulturen bei Versuchsstart in einem nicht kompetenten Zustand befanden. Da die Entwicklung der Kompetenz von *S. pneumoniae* abhängig vom pH-Wert des Wachstumsmediums ist (Chen & Morrison, 1987b; Tomasz & Mosser, 1966) wurde eine Vorkultur in C+Y-Medium mit einem pH-Wert von 6,8 hergestellt. Diese Vorkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 angezogen und als Glycerinkultur konserviert. Alle darauffolgenden Schritte wurden in C+Y-Medium mit einem pH-Wert von 7,8 durchgeführt. Anschließend wurde diese Glycerinkultur in einer 1:100 Verdünnung in C+Y-Medium beimpft. Ab

dem Zeitpunkt des Animpfens ($t=0$) wurden nach $t = 5$ min, von $t = 90-150$ min im Abstand von 15 min sowie ab $t = 150$ min bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase im Abstand von 30 min Proben der Kultur entnommen und als Glycerinkulturen konserviert.

Die *S. pneumoniae*-Stämme mit verändertem *ciaH* sind alle Streptomycin resistent (Kapitel 3.18). Aus diesem Grund konnte der für die Bestimmung der Transformationseffizienz in *S. pneumoniae* gewöhnlich verwendete Streptomycinresistenzmarker, chromosomale DNA des Stammes RKL242 (Halfmann *et al.*, 2011), nicht verwendet werden. Als Alternative dazu wurde chromosomale DNA des Stammes RKL222 eingesetzt. Dieser Stamm besitzt ein *rpoB*-Allel mit der Punktmutation C1456T, die zum Aminosäureaustausch von Histidin zu Tyrosin an der Stelle 486 führt und Rifampicinresistenz vermittelt. Die Transformationseffizienz liegt bei diesem Marker um einen Faktor 10 niedriger als die des Streptomycinresistenzmarkers (Müller *et al.*, 2011).

Die Glycerinkulturen wurden auf Eis auftauen gelassen und 20 μ l davon in 180 μ l C+Y-Medium 1:10 verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 ng chromosomaler DNA des Stammes RKL222. Nach der Inkubation der Transformationsansätze für 30 min bei 30°C wurde zum Verhindern weiterer DNA-Aufnahme DNaseI (Roche Applied Science) in einer Endkonzentration von 20 μ g/ml zugegeben. Anschließend wurden die Kulturen für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Von den Kulturen wurden Verdünnungsreihen in Saline (0,9% NaCl) hergestellt. Zur Bestimmung der Transformantenzahl wurden niedrige Verdünnungen auf D-Blutagarplatten mit 0,5 μ g/ml Rifampicin ausplattiert. Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurden hohe Verdünnungen auf D-Blutagarplatten ohne Antibiotikum ausplattiert. Die Transformationseffizienz wurde bestimmt als prozentualer Anteil der Transformantenzahl bezogen auf die Lebendkeimzahl.

3.7 Transformation von *Escherichia coli*

3.7.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Möglichkeit DNA in *E. coli* einzuführen ist die Grundvoraussetzung für Klonierungen. Die Transformation von *E. coli* durch Behandlung mit CaCl_2 war deshalb ein Meilenstein der Molekularbiologie (Cohen *et al.*, 1972; Mandel & Higa, 1970). Darauf folgend wurden verschiedene Varianten dieser Methode entwickelt, wobei in dieser Arbeit kompetente *E. coli*-Zellen nach einem vereinfachten Protokoll von Hanahan hergestellt wurden (Hanahan, 1983)

Hierzu wurden *E. coli*-Kolonien von einer LB-Platte oder einer Übernachtskultur in 50 ml LB-Medium so angeimpft, dass die optische Dichte (OD_{600}) ca. 0,05 betrug. Die Kultur wurde bei 37°C schüttelnd

inkubiert bis zu einer OD_{600} von 0,5. 40 ml der Kultur wurde in 50 ml Greiner Röhrchen überführt und für 10 min bei 8000 Upm und 4°C abzentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Nach vollständigem Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 15 ml eiskaltem TFB1-Puffer (Tab. 3.17) resuspendiert und für 90 min auf Eis gehalten. Die Zentrifugation wurde wie oben beschrieben wiederholt und das Zellpellet in 2 ml eiskaltem TFB2-Puffer (Tab. 3.16) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis in 100 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte bei -80°C.

3.7.2 Transformation

Zur Transformation von *E. coli* wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-10 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA gemischt. Die Transformationsansätze wurden für 20 min auf Eis gehalten, anschließend für 90 s bei 42°C im Wasserbad inkubiert (Hitzeschock) und wieder für 5 min auf Eis gehalten. Danach wurde dem Transformationsansatz 1 ml Psi-Broth (Tab. 3.16) zugegeben und in ein Reagenzglas überführt. Zur phänotypischen Expression wurden die Zellen eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die transformierten Zellen wurden unverdünnt oder in geeigneten Verdünnungen in 0,9% NaCl auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und für mindestens 18 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Tab. 3.16 Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen und zur Transformation von *E. coli*

Komponente	Menge / Konzentration
TFB1-Puffer	
RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
K-Acetat	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glyzerin	15 %
pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern	
TFB2-Puffer	
MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glyzerin	15 %
pH 8 mit NaOH einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern	
Psi-Broth	
LB-Medium, nach dem Autoklavieren zugeben:	
MgSO ₄ (autoklaviert)	4 mM
KCl (autoklaviert)	10 mM

3.8 Isolierung chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae* wurde in dieser Arbeit eine Methode verwendet, die auf der Methode von Marmur (Marmur, 1961) basiert. Die Methode ist schnell, beinhaltet allerdings die Gefahr der Fragmentierung der chromosomalen DNA durch Scherkräfte. Für die Zwecke, für die die chromosomale DNA in dieser Arbeit benötigt wurde, musste jedoch keine große Rücksicht auf eine mögliche Fragmentierung der DNA genommen werden, weshalb die Anwendung dieser Methode anwendbar war.

Für die Präparation wurden 10 ml einer *S. pneumoniae* Kultur in C+Y-Medium bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,8$ angezogen und geerntet, indem sie in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 8000 Upm für 10 min zentrifugiert wurde (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Bakterienpellet in 2 ml 0,9% NaCl resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 1 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß aliquotiert und 1 min bei 14000 Upm in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 180 μ l 1xTE resuspendiert und mit 20 μ l RNase-Lösung (Tab. 3.17) versetzt. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zur Zellyse wurden 200 μ l 2% SDS zugegeben, durch Invertieren gemischt bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach vollendeter Lyse wurden 100 μ l Proteinase K – Lösung (20 mg/ml) in das ERG dazugegeben und für weitere 10 min bei 37°C inkubiert.

Zum Entfernen der Proteine wurde eine Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt.

500 μ l einer Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) wurden in den Ansatz zugefügt und für 30 min auf einem Eppendorfschüttler (Vortex Genie, Scientific Industry) gemischt. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 14000 Upm wurde die DNA-haltige wässrige Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wiederholt bis die Interphase klar war. Zum Fällen der DNA wurde 1 Vol. (500 μ l) Isopropanol (100%) zugegeben und durch mehrfaches Invertieren gemischt. Die Fällung erfolgte für ca. 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 5 min bei 14000 Upm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit Ethanol (100%, p.a.) gewaschen und getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 200 μ l 1xTE gelöst, indem die Ansätze gevortext und über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei 37°C inkubiert wurden.

Tab 3.17: Lösungen zur Herstellung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae*

Komponente	Konzentration
TE-Puffer	
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH 7,6 mit HCl einstellen	
Rnase Lösung	
Rnase A (Roth)	
lösen in:	
Tris	
NaCl	
pH 7,5 einstellen, autoklavieren	
10 min kochen und bei -20°C lagern	
SDS	2%
lösen in H ₂ O _{dest}	
Proteinase K (Roth)	20 mg/ml
lösen in H ₂ O _{dest}	
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Roth)	25:24:1
Isopropanol	100 %
Ethanol p.a.	100 %

3.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde in dieser Arbeit entweder das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder, zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA, das NucleoBond PC 100 Kit (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben verwendet.

Dazu wurden die *E. coli*-Zellen in der jeweils angegebenen Menge des Mediums angezogen. Als Wachstumsmedium wurde hierzu 2xTY Medium (16g Trypton, 5g NaCl, 5g Hefeextrakt pro Liter H₂O_{dest}; autoklavieren), versetzt mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum, verwendet. Die *E. coli*-Zellen wurden über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert und nach dem Abernten durch Zentrifugieren die Plasmid-DNA isoliert.

Die Durchführung basiert dabei jeweils auf der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim & Doly, 1979). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Lyse der Zellen durch Detergenz (SDS) bei gleichzeitiger Denaturierung der chromosomalen DNA bei hohem pH (NaOH). Nach Neutralisierung durch Na- oder K-Acetat bilden die denaturierten DNA-Stränge und Proteine sowie hochmolekulare RNA unlösliche Komplexe, die nach Abzentrifugieren von der in Lösung bleibenden

Plasmid-DNA getrennt werden. Der Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten Kits liegt in der rascheren Durchführbarkeit und saubereren Aufreinigung über Säulen.

3.9 Bestimmung der β -Lactam Suszeptibilität von *S. pneumoniae*

Die Suszeptibilität von *S. pneumoniae* gegen β -Lactamantibiotika wurde in dieser Arbeit nach einer Methode bestimmt, die auf der von Andrews beschriebenen Methode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) beruht. Als MHK wird hierbei die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums beschrieben, die sichtbares Wachstum eines Mikroorganismus nach Inkubation über Nacht auf Nähragarplatten hemmt (Andrews, 2001).

Zur Bestimmung der β -Lactamsuszeptibilität von *S. pneumoniae* wurden D-Blutagarplatten mit stufenweise steigenden β -Lactamkonzentrationen hergestellt (3.18). Die getesteten β -Lactame waren Cefotaxim und Oxacillin (Tab. 3.15). Die zu untersuchenden *S. pneumoniae*-Kulturen wurden in C+Y-Medium bei 37°C im Wasserbad bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 angezogen und 1:1000 in eiskalter 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 30 μ l auf die D-Blutagarplatten aufgetropft. Die Platten wurden so lange steril angetrocknet bis keine Tropfen mehr auf der Plattenoberfläche zu sehen waren. Nach Inkubation für 48 h bei 37°C erfolgte die Dokumentation der mit den Kulturen betroffenen Stellen mittels MV-1500AE Digitalkamera.

Tab. 3.18: Pipettierschema zur Herstellung von D-Blutagarplatten zur Bestimmung der β -Lactam Suzeptibilität

Komponente	Menge
D-Medium	47,5 ml
Agar	0,75 g
Schafsblut	1,5 ml
Antibiotikum	abhängig von der Konzentration
H ₂ O _{dest}	ad 1 ml
Gesamtvolumen	50 ml

3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis *et al.*, 1986). Hierbei amplifiziert eine thermostabile DNA-Polymerase den Teil einer DNA-Sequenz, der durch zwei Oligonukleotide (Primer) begrenzt wird. Ein Primer ist zu einem Strang komplementär, der andere Primer ist komplementär zum Gegenstrang. Des Weiteren werden zur PCR freie Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), die thermostabile DNA-Polymerase sowie der entsprechende Puffer zur Aufrechterhaltung des pH-Optimums der DNA-Polymerase benötigt. Diese Komponenten werden zusammen in einen Ansatz gegeben mit dem anschließend die Reaktion erfolgt.

Eine PCR besteht typischerweise aus drei Schritten. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch hohe Temperaturen (95-98°C) in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung), bevor sich in einem zweiten Schritt durch Herabsetzen der Temperatur die Primer an die komplementären Stellen der DNA anlagern (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist dabei abhängig vom GC-Gehalt sowie der Länge der Primer. Sie liegt in der Regel 5°C unter der Schmelztemperatur (T_m) des Primers mit der niedrigsten Schmelztemperatur.

Anschließend erfolgt eine von 5' nach 3' gerichtete Verlängerung der Oligonukleotide durch Einbau von dNTPs, die jeweils komplementär zu dem als Matrize dienenden DNA-Template sind (Elongation). Die Elongationstemperatur richtet sich nach dem thermodynamischen Wirkungsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase und liegt bei den üblichen aus *Thermus aquaticus* isolierten Polymerasen bei 72°C. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Amplifikationsrate der DNA-Polymerase. Durch die Wiederholung dieser Schritte, in der Regel sind es 30 Zyklen, erzielt man somit eine exponentiell steigende Anzahl an Kopien des DNA-Fragments, da in jedem Zyklus die zuvor neu synthetisierten DNA-Fragmente als Template dienen können. Die Durchführung der PCRs erfolgte in den Thermocyclern Biometra UNO Thermoblock und Biometra TGradient.

Für analytische Zwecke wurde in dieser Arbeit die DreamTaq DNA-Polymerase (Fermentas) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine weiterentwickelte Taq-Polymerase, die für alle PCR-Anwendungen optimiert wurde. Diese wurde als fertiger 2x Master Mix bezogen. In dem Master Mix lagen die DNA-Polymerase, dNTPs und der von der DNA-Polymerase benötigte Reaktionspuffer sowie $MgCl_2$ in vom Hersteller optimierter Menge als 2x konzentrierte Mischung vor. Zur Herstellung der PCR-Ansätze wurde der Master Mix direkt mit den jeweiligen Primern und dem DNA-Template gemischt (Tab. 3.19) und für die Reaktion eingesetzt (Tab 3.20).

3. Material und Methoden

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen und Transformationen wurde die iProof High Fidelity DNA-Polymerase (Bio-Rad) verwendet. Diese besitzt im Gegensatz zur DreamTaq eine 3`-5`-Exonukleaseaktivität, also eine Korrekturlesefunktion und damit eine geringere Fehlerrate, sowie eine höhere Amplifikationsrate. Ein typischer PCR-Ansatz ist in Tab. 3.21 dargestellt, ein typisches Programm in Tab. 3.22.

Tab. 3.19: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit Dream Taq-Polymerase

Komponente	Menge
¹ Dream Taq PCR Master Mix (2x)	25 µl
Primer Forward (10 pmol/µl)	1 µl
Primer Reverse (10 pmol/µl)	1 µl
Template DNA	1-2 µl
H ₂ O _{dest}	ad 50 µl

¹enthält die DreamTaq-Polymerase, dNTPs und den Dream Taq-Puffer und MgCl₂

Tab. 3.20: Programm für eine PCR mit Dream Taq DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	
1 Initiale Denaturierung	96 °C	5 min	
2 Denaturierung	96 °C	30 s	} 30x
3 Annealing	T _m – 5°C	30 s	
4 Elongation	72 °C	1 min/kb	
5 Finale Elongation	72°C	5 min	
6 Kühlung	10 °C	∞	

T_m: Schmelztemperatur der Primer

Tab. 3.21: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit iProof High Fidelity DNA-Polymerase

Komponente	Menge
iProof HF-Buffer (5x)	10 µl
dNTPs (10 mM, Roth)	1 µl
Primer Forward (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer Reverse (10 pmol/µl)	2,5 µl
Template DNA	1-2 µl
iProof High Fidelity DNA Polymerase (2U/µl)	1 µl
H ₂ O _{dest}	ad 50 µl

Tab. 3.22: Programm für eine PCR mit iProof High Fidelity DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	
1 Initiale Denaturierung	98 °C	2 min	
2 Denaturierung	98 °C	10 s	} 30x
3 Annealing	T _m	15 s	
4 Elongation	72 °C	30 s/kb	
5 Finale Elongation	72°C	5 min	
6 Kühlung	10 °C	∞	

T_m: Schmelztemperatur der Primer

Als Template-DNA wurde in der Regel isolierte chromosomale DNA eingesetzt. Bei der Überprüfung von Transformanten wurden Zellkulturen direkt als Template eingesetzt. Hierfür wurden 500 µl einer Kultur in der spätexponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert (3 min, 15 000 rpm). Das Zellpellet wurde in 50 µl H₂O_{dest} resuspendiert und für 10 min bei 95 °C im Thermoblock (Biozym Diagnostik GmbH) inkubiert. Nach Inkubation auf Eis für 2 min wurden 2 µl des resuspendierten Zellpellet als Template eingesetzt.

Überlappende PCR

Die überlappende PCR ist eine Art der PCR, die es ermöglicht mindestens zwei DNA-Fragmente miteinander zu einem DNA-Fragment zu verknüpfen und zu vervielfältigen. Ursprüngliche Anwendung, wie auch in dieser Arbeit, fand sie als Methode zur Generierung gezielter Mutagenesen (Ho *et al.*, 1989); in dieser Arbeit zur Generierung gezielter *ciaH*-Mutationen (Kapitel 3.18).

Hierzu wurden zwei Primerpaare benötigt, wobei jeweils ein Primer jeden Paares die Mutationssequenz besitzt und mit dem Primer des anderen Paares überlappt. Zunächst wurden die gewünschten Einzelfragmente mit den jeweils überlappenden Enden mittels konventioneller PCR amplifiziert (Abb. 3.1 A).

In der darauffolgenden überlappenden PCR wurden die Einzelfragmente miteinander gemischt und dienten dabei als Template-DNA. Zunächst wurde ein PCR Zyklus ohne Primer durchgeführt. Dabei binden die jeweils überlappenden Enden der Einzelfragmente miteinander, wobei die 3'-Überhänge jeden Stranges gleichzeitig als Primer für die Extension des komplementären Stranges dienen. Durch Verlängerung mittels DNA-Polymerase entstanden somit fusionierte DNA-Stränge, die aus beiden einzelnen Fragmenten bestanden (Abb. 3.1 B). Durch anschließende Zugabe der beiden äußeren Primer wurde das fusionierte DNA-Fragment in einer konventionellen PCR amplifiziert (Abb. 3.1 C). Die überlappende PCR zur Generierung gezielter Mutagenesen wurde mit der iProof High Fidelity DNA-Polymerase durchgeführt. Ein Standardansatz ist in Tab 3.23, ein Standardprogramm in Tab 3.24 dargestellt.

Tab. 3.23: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für eine überlappende PCR mit iProof High Fidelity DNA-Polymerase

Komponente	Menge
iProof HF-Buffer (5x)	10 µl
dNTPs (10 mM, Roth)	1 µl
¹ Template DNA PCR-Fragment 1	100-500 ng
¹ Template DNA PCR-Fragment 2	100-500 ng
² Primer Forward (10 pmol/µl)	2,5 µl
² Primer Reverse (10 pmol/µl)	2,5 µl
iProof High Fidelity DNA Polymerase (2U/µl)	1 µl
H ₂ O _{dest}	ad 50 µl

¹Die Zugabe der Einzelfragmente erfolgte im gleichen Mischungsverhältnis

²Die Zugabe der Primer erfolgte nach dem ersten PCR-Durchlauf

Tab. 3.24: Programm für eine Überlappende-PCR mit iProof High Fidelity DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Erste initiale Denaturierung	98 °C	2 min
2 Annealing	50 °C	1 min
3 Elongation	72 °C	30 s/kb
4 Zugabe der äußeren Primer	30 °C	variabel
5 Zweite initiale Denaturierung	98 °C	30 s
6 Denaturierung	98 °C	10 s
7 Annealing	T _m	15 s
8 Elongation	72 °C	30 s/kb
9 Finale Elongation	72 °C	5 min
10 Kühlung	10 °C	∞

} 30x

T_m: Schmelztemperatur der Primer

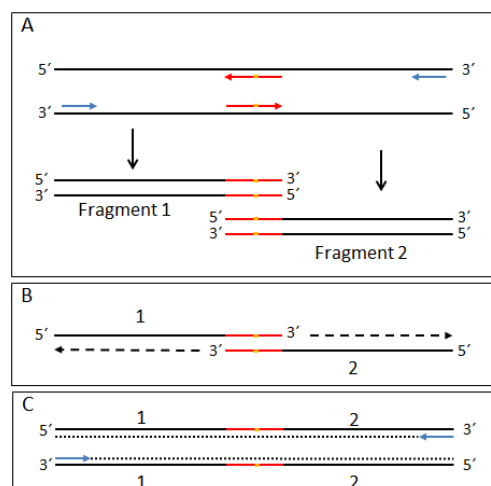


Abb. 3.1: Schematische Darstellung zur Funktionsweise einer Überlappenden PCR zur Generierung gezielter Mutagenesen. (A) Zunächst werden zwei PCR-Fragmente mit überlappenden Enden hergestellt. **(B)** Im ersten Zyklus der überlappenden PCR lagern sich die Einzelfragmente in den überlappenden Bereichen aneinander und es kommt zur Extension des jeweiligen Stranges am 3'-Ende. **(C)** In den weiteren PCR-Zyklen erfolgt die Amplifikation der beiden fusionierten Einzelfragmente. Die äußeren Primer sind als blaue Pfeile, die Mutageneseprimer als rote Pfeile dargestellt, wobei die theoretische Nukleotidmutation als gelbe Region gekennzeichnet ist.

3.11 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wandern die zu trennenden DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch das Agarosegel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt, die den Stromfluss ermöglicht, in Richtung der positiv geladenen Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist abhängig von ihrer Größe und der Konzentration des Agarosegels.

Die Agarosekonzentration wurde abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente gewählt. Für größere Fragmente wurde eine Konzentration von 1%, für kleinere Fragmente 1,5% bzw. 2%, verwendet. Die Agarose (SeaKem LE, Biozym) wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle in 1x TAE-Puffer (Tab. 3.25) gelöst und in horizontale Gelkammern gegossen, in die ein Kamm eingesetzt wurde zur Ausbildung von Taschen, in die die DNA-Proben pipettiert wurden. Nach vollständiger Polymerisation des Agarosegels wurde es in eine Laufkammer gesetzt, die mit jeweils demselben Puffer wie zum Gießen des Gels, gefüllt wurde.

Tab 3.25 Lösungen zur Agarosegelelektrophorese

Komponente	Menge / Konzentration
TAE-Puffer (50x)	
Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA 0,5 M, pH 8	100 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1 l
zum Gebrauch 1:10 verdünnen	
6x DNA-Probenpuffer	
Bromphenolblau	0,03%
Orange G	0,03%
Glyzerin	60%
Tris/HCl (pH 7,6)	1 mM
EDTA	60 mM
Ficoll	0,075%
SDS	1 %
in H ₂ O _{dest}	

Die DNA-Proben wurden mit 2 µl 6x Probenpuffer (Tab. 3.25) und H₂O_{dest} so gemischt, dass immer ein Ansatz von 12 µl in die Taschen des Gels pipettiert wurde; der Probenpuffer lag somit 1x konzentriert vor. Im Probenpuffer sind Farbstoffe gelöst, um den Gang der Elektrophorese zu verfolgen. Zusätzlich enthält er Zucker, um das Absinken der DNA-Proben in die Taschen des Gels zu erleichtern. Die Laufzeit war abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente und der angelegten

Spannung, wobei diese im Allgemeinen zwischen 100-150 Volt lag. Als Größenstandard wurde der GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas) verwendet. Dieser enthält Fragmentgrößen von 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 und 250 Basenpaaren.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Agarosegele zum Färben für 15-30 min in eine Ethidiumbromidlösung (Konzentration 0,5-1 µg/ml), einem interkalierendem Fluoreszenzfarbstoff, gelegt und anschließend in einem Wasserbad gewaschen. Durch UV-Licht wurden die DNA-Fragmente in dem Agarosegel auf einem Transilluminator (Modell M-20) sichtbar gemacht und das Gel zur Dokumentation fotografiert (Mitsubishi Video Copy).

3.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten diente dem Entfernen von Puffern, Salzen, Nukleotiden, Oligonukleotiden und Enzymen, die den Ablauf nachfolgender Reaktionen stören könnten. Diese erfolgte durch Aufreinigung über Säulen unter Verwendung des Ron's PCR-Pure Kits (Bioron) oder des JETquick-PCR Purification Spin Kits (Genomed) nach Anleitung der Hersteller. Die Prozeduren beider Kits sind ähnlich.

Die Reaktionsansätze mit den enthaltenen DNA-Fragmenten wurden mit Bindungspuffer gemischt und auf Säulenmaterial gegeben. Dabei wurden die DNA-Fragmente, jedoch nicht die anderen Substanzen, an Säulenmaterial gebunden. Durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer wurden die anderen Substanzen von dem Säulenmaterial entfernt. Nach dem Trocknen der Säulen wurden die DNA-Fragmente mit H₂O_{dest} oder Tris/HCl (pH 7,6) wieder von der Säule eluiert.

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden diese zunächst mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 30 min in einem frisch angesetzten Ethidiumbromidbad (Konzentration 0,5 µg/ml) gefärbt. Die DNA wurde so kurz wie möglich mit langwelligem UV-Licht unter einer Tischlampe belichtet und das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution aus dem Agarosegel erfolgte unter Verwendung des innuPrep Gel Extraction Kits (Analytik Jena) nach Herstellerangaben. Bei dieser Prozedur handelte es sich ebenfalls um eine Säulenaufreinigung, wobei hier zunächst die Agarose durch Inkubation bei 50°C verflüssigt wurde und anschließend über Säulen aufgereinigt wurde.

3.13 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Ermittlung der Konzentration von DNA in Lösung wurde die spektralphotometrische Lichtabsorption des NanoDrops (ND-1000 NanoDrop Technologies) angewendet. Es wird hier bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei der DNA ihr Absorptionsmaximum besitzt, der Bruchteil des eingestrahnten Lichts gemessen, der von der in Lösung befindlichen DNA absorbiert wird. Dieser ist abhängig von der Konzentration der DNA und der Strecke, die der Lichtstrahl im absorbierenden Medium zurücklegen muss. Diese Beziehungen sind im Lambert Beerschen Gesetz zusammengefasst:

$$A = c \cdot d \cdot \epsilon$$

A: Absorption $\left[\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$

c: Konzentration der Substanz $\left[\frac{1}{\text{mol}} \right]$

d: Lichtweg [cm]

ϵ : Extinktionskoeffizient der absorbierenden Substanz bei gemessener Wellenlänge

Eine Lösung, die 50 ng doppelsträngige DNA beinhaltet, erhält hierbei den Absorptionswert 1. Zur Bestimmung der Reinheit der DNA wird der Quotient der Absorption OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Das Verhältnis sollte idealerweise zwischen 1,8 – 2 liegen. Kontaminationen (Proteine, Phenol), die bei 280 nm absorbieren, reduzieren dieses Verhältnis.

Zur Durchführung wurde 1 μl einer DNA-Lösung auf das Ende einer optischen Kabelfaser pipettiert (Receiving Fiber). Eine zweite optische Kabelfaser (Source Fiber) wurde mit der Probe in Kontakt gebracht. Die DNA-Lösung bildet somit die Verbindung zwischen den beiden optischen Faserenden. Die DNA-Konzentration wurde aus der OD bei 260 nm und einem für die DNA spezifischen Multiplikationsfaktor errechnet.

Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der DNA. Für eine DNA-Probe gilt ein Verhältnis von 1,8 - 2 als „rein“. Ist das Verhältnis niedriger ist dies ein Hinweis auf die Anwesenheit von Proteinrückständen oder Phenol-Kontaminationen, da diese ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen.

3.14 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde nach einer Methode durchgeführt, die auf der von Sanger basiert (Sanger *et al.*, 1977). Sie wird auch als „Didesoxymethode“ und „Kettenabbruchmethode“ bezeichnet.

Hierbei werden dem Ansatz der Sequenzreaktion das zu sequenzierende DNA-Fragment, der jeweilige Primer, DNA-Polymerase mit entsprechendem Puffer und ein Nukleotidgemisch aus Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und 2'-3'-Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) zugegeben. Die ddNTPs sind jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

Die Sequenzreaktion verläuft nach dem Prinzip einer Polymerasekettenreaktion, wobei hier allerdings durch das Fehlen eines zweiten Primers im Reaktionsansatz die Synthese des DNA-Stranges nur in eine Richtung abläuft. Während der Sequenzreaktion wird willkürlich statt eines dNTPs ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP in die Kette des neusynthetisierten DNA-Stranges eingebaut. Aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe am ddNTP kann keine neue Phosphodiesterbindung mit einem weiteren dNTP oder ddNTP gebildet werden und es kommt somit zum Abbruch der Reaktion.

In der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung in einer Kapillare werden die fluoreszenzmarkierten ddNTPs am 3'-Ende der DNA-Fragmente durch einen Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt. Mittels Computersoftware werden die Fluoreszenzsignale detektiert und mit der entsprechenden Software ausgewertet.

In dieser Arbeit wurde die DNA-Sequenzierung zur Nachkontrolle unsicherer Sequenzabschnitte sowie zur Überprüfung der erfolgreichen Integration von DNA-Fragmenten ins Genom konstruierter *S. pneumoniae* Derivate durchgeführt. Hierzu wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte zunächst mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden diese PCR-Produkte über Säulen aufgereinigt und in einer Menge von ≥ 200 μg mit den jeweils zur Sequenzierung benötigten Primern zur Firma Seq-IT GmbH (Kaiserslautern) verschickt, von der die Sequenzreaktion und die Verpackung der Sequenzdaten in Software-Dateien durchgeführt wurde. Die fertigen Sequenzdaten wurden von Seq-IT in ab1- und seq-Dateiformaten zugesandt, die mit den gängigen Programmen analysiert werden konnten.

Im Falle von sequenzierten DNA-Fragmenten mit einer Größe von ≤ 500 bp erfolgte die Auswertung und Überprüfung der Daten mittels der Computersoftware Chromas Lite Version 2.01. Im Falle von DNA-Fragmenten mit einer Größe von ≥ 500 bp wurden aufgrund der Begrenztheit der Leselänge eines Sequenzierdurchlaufs mehrere einzelne DNA-Sequenzen erhalten, die zu einem einzigen Contig miteinander assembliert wurden. Hierzu wurden die Programme Phred/Phrap und Consed verwendet, wobei mittels Phred/Phrap die Assemblierung der Einzelsequenzen durchgeführt wurde

und Consed als graphisches Werkzeug zur Qualitätskontrolle der Assemblierung verwendet wurde (Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998).

Im Anschluss wurden die ermittelten Sequenzdaten mittels Blastanalyse (Altschul *et al.*, 1990) mit den theoretischen DNA-Sequenzen verglichen, die zuvor mittels des Programmes Clone Manager und verfügbaren Genomsequenzen aus der Datenbank des NCBI *in situ* erzeugt wurden.

3.15 Analyse von Expressionssignalen in *S. pneumoniae*

Die Analyse von Expressionssignalen in *S. pneumoniae* erfolgte unter Verwendung des genetischen Werkzeugs des Pneumo-Promotor-Probes (pPP2), womit es möglich war, Expressionssignale von Promotoren indirekt über die Menge an gebildeter β -Galaktosidase in der Zelle zu bestimmen. Die Bestimmung der Aktivität eines Promotors erfolgte durch β -Galaktosidaseassays, wobei hier die β -Galaktosidaseaktivität das Maß für die Promotorstärke darstellt.

3.15.1 Das Reporterplasmid pPP2 und seine Derivate

Zur Analyse der Expressionsstärke CiaR-regulierter Promotoren in *S. pneumoniae* Derivaten sowie unter verschiedenen Wachstumsbedingungen standen Derivate des Reporterplasmids pPP2 (Pneumo-Promotor-Probe, Abb. 3.2 A) zur Verfügung (Halfmann *et al.*, 2007a).

Das Plasmid pPP2 repliziert in *E. coli* und vermittelt durch das β -Lactamase Gen *bla* Resistenz gegen Ampicillin zur Selektion in diesem Wirt. Zusätzlich besitzt es das β -Galaktosidasegen *lacZ* von *E. coli*, vor das der zu untersuchende Promotor kloniert wurde. Die Signale zur Initiation der Translation des *lacZ* Gens stammen von dem Gen *htrA* aus *S. pneumoniae*, um die effiziente Translation von *lacZ* in *S. pneumoniae* zu ermöglichen.

Zusätzlich zu den Funktionen zur Replikation in *E. coli*, den Reporter- und Ampicillin Resistenzgenen sind auf pPP2 Gene vorhanden, die eine Integration ins *S. pneumoniae* Genom ermöglichen. Hierzu sind die beiden unvollständigen Gene '*bgaA*' und '*spr0564*' aus *S. pneumoniae*, die die Reporterfusion von *lacZ* mit dem zu untersuchenden Promotor sowie *tetM*, ein Tetracyclinresistenz-vermittelndes Gen zur Selektion in *S. pneumoniae*, flankieren, vorhanden.

Über diese Gene erfolgt durch homologe Rekombination die Integration dieses Plasmidbereiches in das Genom von *S. pneumoniae*, und zwar an die Stelle des nativen β -Galaktosidasegens *bgaA* (Abb. 3.2 B). Somit wurde sichergestellt, dass die Menge an gebildeter β -Galaktosidase nur von der Stärke des untersuchten Promotors abhängt.

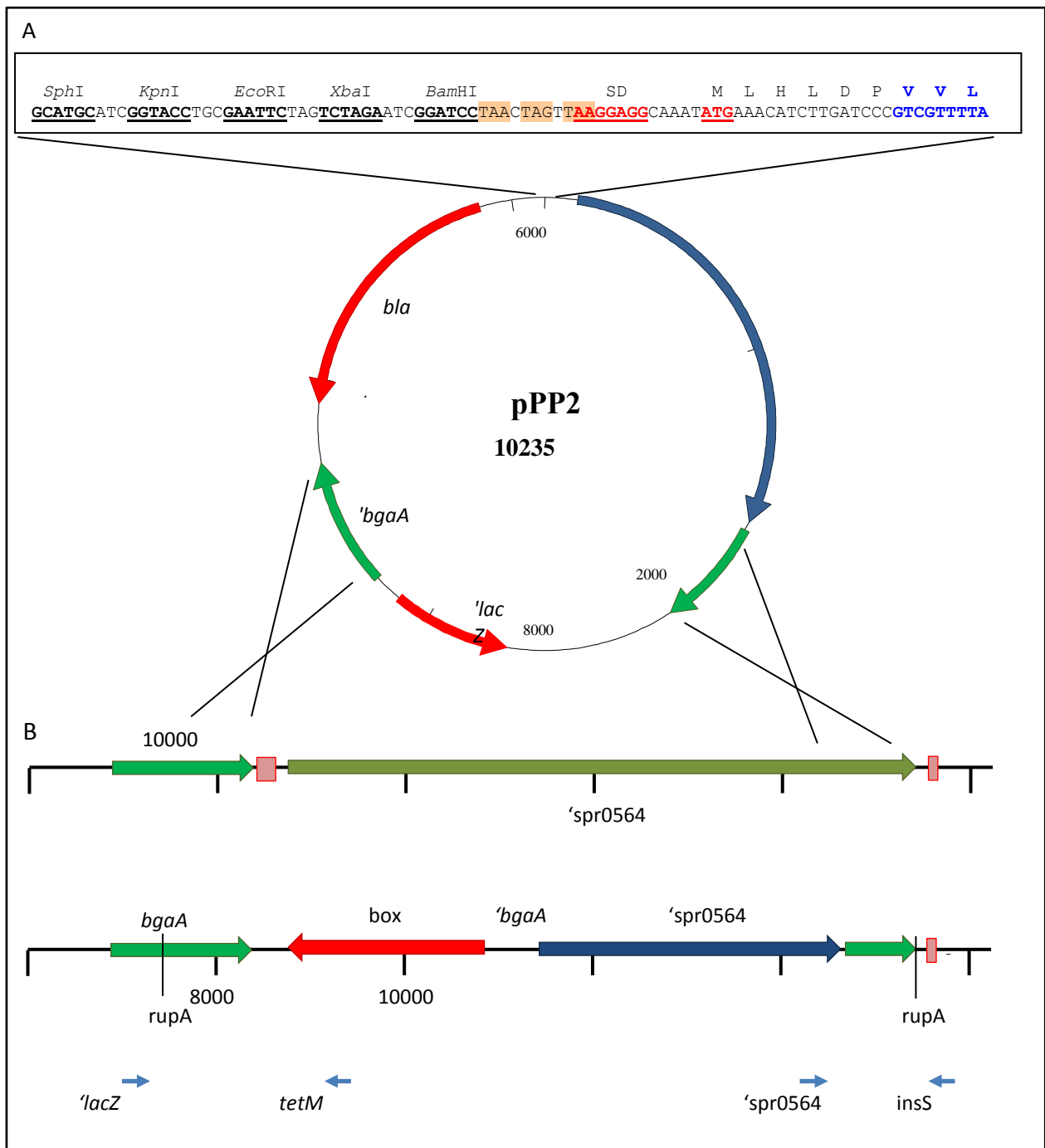


Abb. 3.2 Schematische Darstellung der genetischen Organisation des Promotorprobe-Plasmids pPP2 (A) und dessen Integration ins Genom von *S. pneumoniae* (B). Die Gene sind durch Pfeile gekennzeichnet: *bla*: β -Lactamase (Ampicillin Resistenz); *tetM*: Tetracyclin Resistenz; '*lacZ*': β -Galaktosidase; '*bgaA*': endogene β -Galaktosidase; *rupA* und *box*: repetitive Elemente; *insS* und *insE*: Start und Ende des integrierten Promotorprobes. In dem Sequenzausschnitt sind der multiple cloning site (MCS) und der Beginn des promotorlosen β -Galaktosidase Gens '*lacZ*' gezeigt. Die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD, Ribosomenbindestelle) und das '*lacZ*' Startcodon sind rot unterstrichen. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme im MCS sind unterstrichen. Die Primer zu Überprüfung der Integration von pPP2 in das *S. pneumoniae* Genom sind als blaue Pfeile dargestellt.

In dieser Arbeit wurden Derivate von pPP2 mit *lacZ*-Reporterfusion der CiaR-regulierten Promotoren P_{htrA} , $P_{spr0931}$ und P_{ccnA} sowie des konstitutiv exprimierten Promotors P_{vegM} verwendet (Tab 3.6), wobei die Promotorfragmente über *SphI* und *BamHI* Schnittstellen in pPP2 kloniert wurden (Halfmann *et al.*, 2007b).

Die Überprüfung der Integration der Reporterplasmide ins Genom von *S. pneumoniae* erfolgte durch PCR. Hierzu wurden die Primerpaare EII_fwd_kontr / tetM_rev_kontr und lacZ_fwd_kontr / bgaA_rev_kontr (Tab.3.7) verwendet, mit denen bei erfolgreicher Integration ein 1,7 kb bzw. 1,2 kb großes Fragment erhalten wurde (Abb. 3.2 B).

Mit den jeweils konstruierten Reporterstämmen verschiedener *S. pneumoniae* Derivate erfolgte somit die Bestimmung der Promotoraktivität CiaR regulierter Promotoren.

3.15.2 Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität

In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der Promotorstärke in *S. pneumoniae* mittels β -Galaktosidaseassay. Die Durchführung orientiert sich an der Methode von Miller (Miller, 1972). Hierbei wird die Menge an β -Galaktosidase indirekt über die enzymatische Spaltung von o-Nitrophenol- β -Galaktopyranosid (ONPG) zu Galaktose und o-Nitrophenol (ONP) bestimmt. Die Zunahme von ONP kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen werden und ist das Maß für die Menge an β -Galaktosidase im Reaktionsansatz. Im Gegensatz zu der Methode nach Miller handelt es sich bei den in dieser Arbeit durchgeführten Assays nicht um Endpunktassays. Stattdessen wird hier die lineare Zunahme der Extinktion bei 420 nm über die Zeit photometrisch aufgezeichnet. Des Weiteren diente nicht die optische Dichte der eingesetzten Kultur als Bezugsgröße für die β -Galaktosidaseaktivität, sondern die Gesamtproteinmenge im Ansatz.

Zur Durchführung eines β -Galaktosidaseassays wurden 2 ml einer Zellkultur, bei hohen Zelldichten 1 ml, für 3 min bei 14000 Upm in einer Eppendorfszentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet in 500 μ l Lysepuffer (Tab 3.26) resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend solange bei 37°C im Wasserbad inkubiert, bis die Zellyse sichtbar war bzw. bis der Ansatz klar wurde. Nach vollständiger Zellyse wurden die Lysate bis zur Verwendung auf Eis gestellt.

Zum Starten des Assays wurden 200 μ l des Zellysats bzw. geeignete Verdünnungen mit 800 μ l auf 30°C vorgewärmtem ONPG (Tab. 3.26) in einer Küvette gemischt. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung der Mischung bei 420 nm im UV/Vis Photometer (Thermo Scientific) als Kinetik mit einem Messintervall von 45 s über einen Zeitraum von 9-15 min unter Verwendung der Software

3. Material und Methoden

VISIONlite. Als Nullwert wurde ein Ansatz mit 200 µl Lysepuffer und 800 µl ONPG verwendet. Nach Beendigung der Messung konnte aus dem linearen Bereich des Absorptions-Zeit-Graphen die Steigung berechnet werden, die ein Maß für die β-Galaktosidasekonzentration im Ansatz darstellte.

Tab. 3.26: Lösungen zur Durchführung des β-Galaktosidaseassays

Komponente	Menge
Z-Puffer	
Na ₂ HPO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
MgSO ₄	1 mM
β-Mercaptoethanol (Roth, vor Gebrauch zugeben) pH 7 mit NaOH einstellen	2,7 ml/l
Lysepuffer	
Z-Puffer	
Triton-X-100 (Stammlösung 10%)	0,05%
ONPG	
ONPG (Sigma Aldrich)	1 mg/ml in Z-Puffer

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

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

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

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

$$\epsilon = \text{Absorptionskoeffizient von o-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 420 nm}$$

$$= 4,5 \cdot 10^3 \left[\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$$

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

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

Die Bestimmung der Masse des Proteins im Reaktionsansatz erfolgte durch Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Lysate mittels Bradford-Assay (Kapitel 3.17).

3.16 Bestimmung der Acetylphosphatkonzentration in *S. pneumoniae*

Die Bestimmung der Acetylphosphatkonzentration einer *S. pneumoniae*-Kultur erfolgte durch eine Methode, die auf den von Pericone und Ramos-Montanez durchgeführten Methoden basiert (Pericone *et al.*, 2003; Ramos-Montanez *et al.*, 2010).

Hierbei wird zunächst das von den Zellen endogen gebildete ATP durch Aktivkohlebehandlung aus der Zellsuspension entfernt. Darauf folgend wird das von den Zellen endogen produzierte Acetylphosphat exogen in einer Acetatkinasereaktion in ATP umgewandelt. Die ATP-Konzentration wird anschließend durch Messung der Biolumineszenz bestimmt und zeigt somit die Menge an vorhandenem Acetylphosphat an. Als Bezugsgröße zur Acetylphosphatkonzentration dient die Gesamtproteinmenge.

Zur Durchführung wurde eine 12 ml Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,4 angezogen. Die Kultur wurde anschließend aufgeteilt: 2 ml in ein ERG zur Bestimmung der Proteinmenge und 10 ml in ein 15 ml Greiner Röhrchen (Greiner Bio-One) zur Bestimmung der Acetylphosphatkonzentration. Die 2 ml-Kultur wurde für 3 min bei 14000 Upm in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert, das Zellpellet in 500 μ l Lysepuffer (Tab. 3.26) resuspendiert und bei 37°C im Wasserbad zur vollständigen Lyse gebracht. Nach erfolgter Zelllyse wurde das Lysat auf Eis gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Bradfordassay (Kapitel 3.17).

Die 10 ml Zellkultur wurde mit 9000 Upm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert (Hermle Z513K). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Luziferase-Puffer (Tab 3.27) resuspendiert, in ein 1,5 ml ERG überführt und auf Eis gehalten. Die Zelllyse erfolgte durch Inkubation der Zellsuspension für genau 2 min bei 95°C im Thermoblock (Biozym Diagnostik GmbH). Sofort danach wurde die Zellsuspension für 10 min zur Abkühlung und zur Vermeidung des Abbaus von Acetylphosphat auf Eis gehalten. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 2 min bei 10000 Upm in der Eppendorffzentrifuge. Das ERG wurde anschließend wieder auf Eis gehalten. Der Überstand wurde in ein 2 ml ERG mit 50 mg/ml Aktivkohle (Sigma Aldrich) überführt, durch Vortexen gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Durch Filtrieren (Porengröße der Filter: 0,22 μ m) wurde die Aktivkohle von der Zellsuspension entfernt.

Die Umwandlung des in der Zellsuspension vorhandenen Acetylphosphats in ATP erfolgte mittels einer Acetatkinasereaktion. Hierzu wurde die Acetatkinase von *Bacillus stearothermophilus* (Sigma Aldrich) verwendet (Nakajima *et al.*, 1978). Dabei erfolgt die Umwandlung von Acetylphosphat und ADP in Acetat und ATP. Ein Reaktionsansatz ist in Tab. 3.28 dargestellt.

Tab 3.27: Lösungen zur Bestimmung der Acetylphosphatkonzentration

Komponente	Menge
Lysepuffer (siehe Tab 3.27)	
Luziferase-Puffer	
Tris	100 mM
EDTA	4 mM
pH 7,6 mit HCl einstellen	
MgCl₂-Lösung	500 mM
ADP (Sigma Aldrich)	1 mM

Tab. 3.28: Reaktionsansatz der Acetatkinasereaktion

Komponente	Menge / Konzentration
Zellsuspension (Aktivkohle behandelt)	100 µl
MgCl ₂	20 mM
ADP (Sigma Aldrich)	30 µM
Acetatkinase (<i>B. stearothermophilus</i>)	0,5 U/µl

Der Reaktionsansatz wurde für 4 h bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde jeweils zweimal angesetzt zur Doppeltbestimmung der jeweiligen zellulären Acetylphosphatkonzentration. Des Weiteren wurde ein Ansatz ohne Acetatkinase als Negativkontrolle angesetzt und gleichermaßen inkubiert.

Nach erfolgter Acetatkinasereaktion wurde die damit gebildete ATP-Menge, die die AcP-Menge angibt, bioluminometrisch unter Verwendung des ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Roche) bestimmt.

Hierbei wurden die Ansätze der Acetatkinasereaktion (mit und ohne Acetatkinase) jeweils im Verhältnis von 1:1 mit 100 µl Luciferase Reagent in Glastubes gemischt und für 2 min bei RT inkubiert. Der Luciferase Reagent enthält D-Luziferin und Luziferase von *Photinus pyralis*. Das Enzym Luziferase katalysiert die Umwandlung von ATP und D-Luziferin in Anwesenheit von Sauerstoff in Oxyluziferin, Pyrophosphat, AMP, CO₂ und Licht. Die freigesetzte Menge an Licht wurde bioluminometrisch bestimmt und ist das Maß für die ATP-Menge bzw. Acetylphosphatmenge. Die Messung der Biolumineszenz erfolgte mittels des BioOrbit 1253 Luminometers (Bio-Orbit).

Die beiden Messwerte der Biolumineszenz [rlu] mit Acetatkinase im Reaktionsansatz wurden gemittelt. Der erhaltene Messwert ohne Acetatkinase im Reaktionsansatz wurde vom gemittelten Wert mit Acetatkinase im Reaktionsansatz substrahiert.

Als Standard wurde parallel eine doppeltlogarithmische Eichgerade mit Acetylphosphat (Sigma Aldrich), das zuvor in mittels Acetatkinasereaktion in ATP umgewandelt wurde, in Konzentrationen zwischen 0,2 und 50 μM hergestellt. Hierbei wurde die Biolumineszenz [rlu] gegen die Acetylphosphatkonzentration aufgetragen. Die jeweilige AcP-konzentration der Zellkultur wurde über die ermittelten Biolumineszenzdaten anhand der Eichgerade bestimmt.

3.17 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung nach Bradford ermöglicht die Bestimmung der Proteinmenge einer Lösung (Bradford, 1976). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 liegt in drei verschiedenen Zuständen vor, deren Absorptionsmaxima jeweils bei verschiedenen Wellenlängen liegen. Bei Komplexbildung des Farbstoffes mit Proteinen geht er vom kationischen in den anionischen Zustand über, wobei sich sein Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschiebt. Die Absorptionsänderung des Farbstoff-Protein-Komplexes ist über weite Bereiche proportional zur Proteinkonzentration und kann photometrisch bei einer Wellenlänge 595 nm gegen die freie Färbelösung als Nullwert photometrisch gemessen werden. Die Intensität des gebildeten Farbkomplexes ist dabei ein Maß für die vorhandene Proteinmenge.

In dieser Arbeit wurde die Coomassie Brilliant Blue-G250-Färbelösung Roti®-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®-Quant, 790 μl Z-Puffer (Tab. 3.26) und 10 μl Lysat der *S. pneumoniae*-Kultur (bzw. Lysepuffer für den Blindwert). Die Ansätze wurden jeweils 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption photometrisch bei OD_{595} bestimmt.

Als Standard wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt, wobei die OD_{595} gegen eine BSA-Menge von 1-10 μg aufgetragen wurde. Die jeweiligen Proteinmengen der Zelllysate wurden somit über die ermittelten Absorptionsdaten und die Eichgerade bestimmt.

3.18 Darstellung von *S. pneumoniae*-Stämmen mit verändertem *ciaH*-Allel

Die Untersuchung der *ciaH*-Allele aus klinischen *S. pneumoniae*-Isolaten erfolgte in einem definierten einheitlichen genetischen Hintergrund. Hierzu wurden diese in den Stamm *S. pneumoniae* R6 eingebracht, indem das *ciaH*_{WT}-Allel durch das veränderte *ciaH*-Allel ersetzt wurde.

Der Austausch erfolgte unter Anwendung der Janus-Kassette, womit es möglich ist Konstrukte in *S. pneumoniae* einzubringen, die keinen selektierbaren Phänotyp verleihen (Sung *et al.*, 2001). Die Janus-Kassette besteht aus dem Kanamycinresistenzgen *aphIII* und dem dominant, Streptomycinsensitivität verleihenden Wildtyp-Allel des Gens *rpsL*. Voraussetzung für die Benutzung dieser Kassette ist ein *S. pneumoniae* Derivat, welches das *rpsL*41-Allel (Salles *et al.*, 1992) im Genom enthält, das Streptomycinresistenz verleiht. Somit besteht die Möglichkeit zur Selektion beim Einbringen und Entfernen der Janus-Kassette. Der Austausch eines Gens mit Hilfe der Janus-Kassette erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird die Janus-Kassette durch Selektion auf Kanamycin ins Genom eingebracht. Der dadurch entstehende Stamm ist kanamycinresistent und durch das dominante *rpsL*_{WT}-Allel streptomycinsensitiv. Im zweiten Schritt wird die Janus-Kassette durch homologe Rekombination mit dem gewünschten DNA-Fragment durch Selektion auf Streptomycin entfernt. Der somit entstehende Stamm ist wieder streptomycinresistent, kanamycinsensitiv und enthält die gewünschte Änderung.

Zum Austausch des *ciaH*_{WT}-Allels in *S. pneumoniae* R6 mit den veränderten *ciaH*-Allelen aus klinischen *S. pneumoniae* Isolaten, wurden diese in den Stamm RKL161 (Tab 3.2) eingebracht, in dem *ciaH* durch die Janus-Kassette ersetzt ist (Müller *et al.*, 2011). Durch Transformation der Amplifikate der *ciaRH*-Regionen mit verändertem *ciaH* wurde die Janus-Kassette durch homologe Rekombination ersetzt.

Die Amplifikation der *ciaRH*-Region mit *ciaH*232 erfolgte mit chromosomaler DNA von *S. pneumoniae* Hu15, von *ciaRH* mit *ciaH*_{TpVT} mit chromosomaler DNA von *S. pneumoniae* Tupelo_VNT (P147; Moscoso *et al.*, 2010). Dazu wurden die Primer *ciaHup_ff* und *ciaHdown_rr* verwendet (Tab. 3.8).

Da die *S. pneumoniae*-Stämme mit den Allelen *ciaH*556 und *ciaH*1057 nicht zur Verfügung standen, wurden diese Allele durch gerichtete Mutagenese mittels überlappender PCR konstruiert. Zur Generierung beider Veränderungen in *ciaH* wurden die Primer Mut-CiaHV186I_r und Mut-CiaHV186I_f für *ciaH*556 und die Primer Mut-CiaHD353N_r und Mut-CiaHD353N_f für *ciaH*1057 verwendet (Tab. 3.9). Die Amplifikate wurden durch Selektion auf Streptomycin ins Genom von *S. pneumoniae* integriert und ersetzen dabei die Janus-Kassette. Zur Überprüfung des korrekten Austauschs wurde die *ciaRH*-Region sequenziert.

3.19 Darstellung von *S. pneumoniae*-Stämmen mit Deletionen im Acetylphosphat-syntheseweg

Zur Untersuchung des Einflusses von Acetylphosphat auf Aktivität des Response Regulators CiaR wurden in dieser Arbeit die Gene *spxB*, *pta* und *ackA*, deren Produkte die Acetylphosphatsynthese in *S. pneumoniae* katalysieren, einzeln und in Kombination deletiert, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit der korrespondierenden Sensorkinase CiaH.

Die Deletionen der Gene zur Acetylphosphatsynthese erfolgte durch Einbringen von Resistenzkassetten (Abb. 3.3). Das Deletionskonstrukt von *spxB* (*spxB::ermB*) entstand durch Insertion der Erythromycinresistenzkassette *ermB* über die *HindIII* Restriktionsschnittstelle des amplifizierten *spxB*-Fragments (Bättig & Mühlemann, 2008).

Das Deletionskonstrukt von *pta* (*pta::cat*) wurde durch Einbringen des Gens *cat*, dessen Expression unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten Promotors P_{vegM} steht und dessen Produkt Resistenz gegenüber Chloramphenicol vermittelt, hergestellt. Dieses Konstrukt wurde über die Restriktionsschnittstellen *SphI* und *SpeI* in *pta* eingefügt, wobei gleichzeitig der kodierende Bereich zwischen den Nukleotiden 7 und 366 von *pta* deletiert wurde (Günzler, 2010).

Das Deletionskonstrukt von *ackA* (*ackA::aphIII*) besitzt das Gen *aphIII*, dessen Produkt Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt. Hierbei wurde der gesamte kodierende Bereich von *ackA* durch Einfügen des *aphIII* Fragments über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *SphI* deletiert (Günzler, 2010).

Die jeweiligen Deletionskonstrukte waren bereits vorhanden und wurden durch Transformation der PCR-Produkte in die jeweiligen *S. pneumoniae* Derivate und durch Selektion mit den entsprechenden Antibiotika eingebracht sowie durch homologe Rekombination ins Genom integriert. Die Transformation der *spxB*- und *pta*-Deletionskonstrukte erfolgte unter aeroben Bedingungen, die Transformation des *ackA*-Deletionskonstruktes unter anaeroben Bedingungen. Die Überprüfung der erfolgreichen Integration erfolgte durch PCR. Bei erfolgreicher Integration von *spxB::ermB* wurde mit den Primern *spxB_fwd2* und *spxB_rev2* ein Fragment von 1,7 kb erhalten, im Gegensatz zu 500 bp beim Wildtyp. Bei erfolgreicher Integration von *pta::cat* wurde mit den Primern *ptaf3* und *ptar2* ein 3,2 kb großes Fragment anstelle des 2,5 kb großen Fragments beim WT erhalten. Die Integration von *ackA::aphIII* wurde mit den Primern *ackAseqf2* und *ackAseqr2* überprüft, wobei hier ein 1,6 kb großes Fragment anstelle des 1,9 kb großen Fragments im Falle des Wildtyps erhalten wurde. Die jeweiligen Primersequenzen sind in Tab 3.10 aufgeführt.

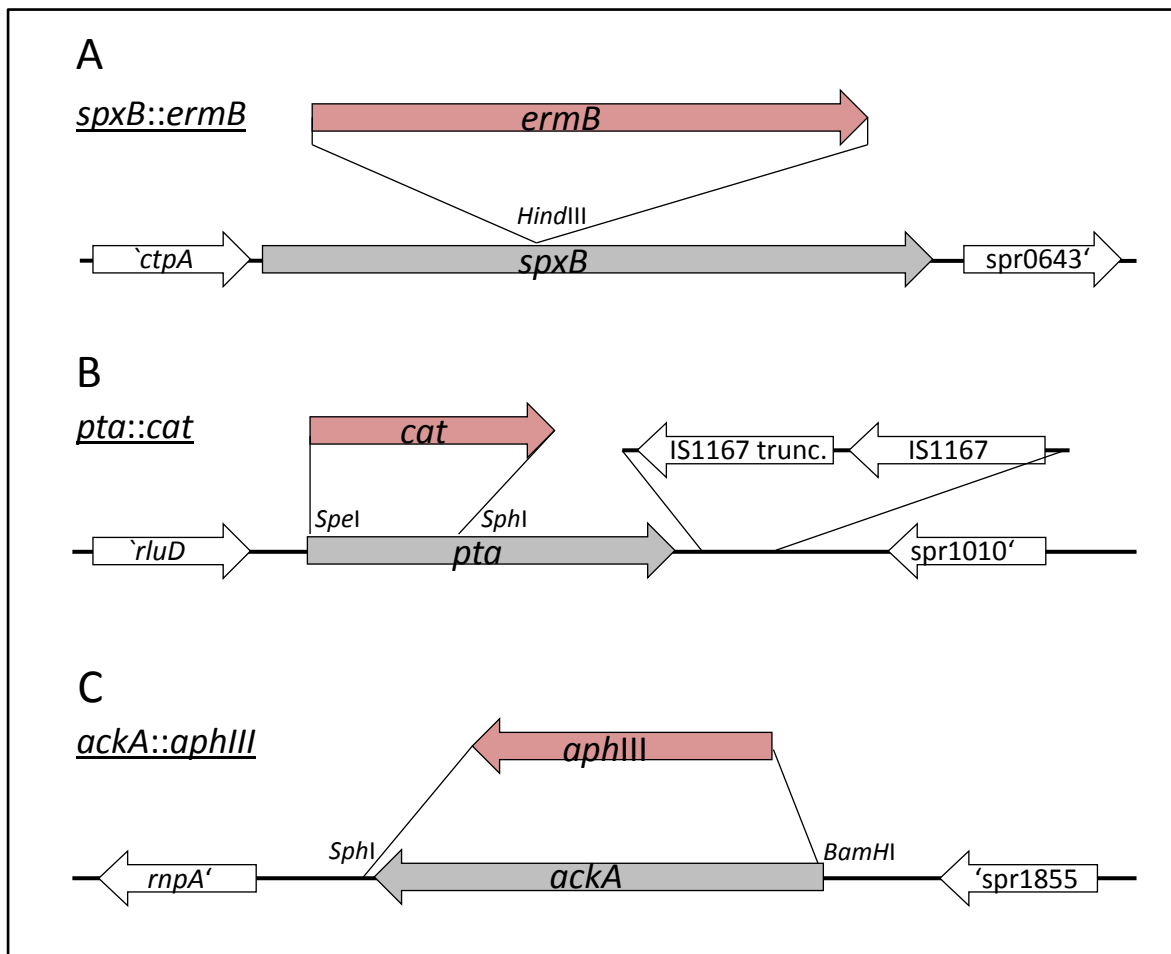


Abb. 3.3: Genetische Organisation und genomische Region der Deletionskonstrukte zur Acetylphosphatsynthese: *spxB::ermB* (A), *pta::cat* (B), *ackA::aphIII* (C). Die Gene, die deletiert wurden, sind in grau, die flankierenden in weiß und die Resistenzkassetten in rot gezeigt. Die Restriktionsschnittstellen, über die die Resistenzkassetten eingefügt wurden, sind jeweils angegeben.

Zur Deletion des Gens *ciaH* in den *S. pneumoniae*-Derivaten wurde die Region, die das Konstrukt *ciaH::aad9* enthält, aus chromosomaler DNA des Stammes *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* (Halfmann *et al.*, 2011) mit den Primern *ciaHup_ff* und *ciaHdown_rr* (Tab. 3.8) amplifiziert und unter aeroben Bedingungen transformiert. Die Selektion erfolgte auf Spectinomycin. Die Überprüfung der Integration des *ciaH*-Deletionskonstrukts ins Genom von *S. pneumoniae* wurde mit den gleichen Primern, die zur Amplifikation verwendet wurden, überprüft.

4. Ergebnisse

4.1 Die *ciaH*-Allele klinischer Isolate von *S. pneumoniae*

Das Zwei-Komponenten System CiaRH wurde unter Laborbedingungen als erste Nicht-PBP-Resistenzdeterminante in spontanresistenten Mutanten von *S. pneumoniae* R6 gegen das β -Lactamantibiotikum Cefotaxim entdeckt (Guenzi *et al.*, 1994). In einer Studie zum besseren Verständnis über die Entstehung der β -Lactamresistenz von Pneumokokken, die man in klinischen Isolaten beobachtete, wurde der β -lactamsensitive Laborstamm *S. pneumoniae* R6 unter Laborbedingungen in mehreren unabhängigen Experimenten sukzessiv gesteigerten Cefotaxim- und Piperacillinkonzentrationen ausgesetzt. Es wurden mehrere Mutantenfamilien mit verringerter Suszeptibilität gegen β -Lactame isoliert (Laible & Hakenbeck, 1987), die neben den bereits aus klinischen Isolaten bekannten Veränderungen in den *pbp*-Genen, auch Veränderungen in dem Gen für die Sensorkinase CiaH enthielten (Laible & Hakenbeck, 1987; Zähler *et al.*, 2002) (zur Übersicht Abb. 2.3). Diese Veränderungen traten unabhängig voneinander in allen mit Cefotaxim selektionierten Mutantenfamilien sowie in einer mit Piperacillin selektionierten Mutantenfamilie auf (Müller, 2011; Zähler *et al.*, 2002). Das *cia*-System stellte somit eine Resistenzdeterminante gegen β -Lactame unter Laborbedingungen dar. Aufgrund des häufigen Auftretens von *ciaH*-Mutationen in Labormutanten war es erstaunlich, dass diese bisher nur durch Selektionsdruck unter Laborbedingungen beobachtet wurden. In den bis 2009 veröffentlichten Genomsequenzen von *S. pneumoniae*-Stämmen, darunter auch multiresistente klinische Pneumokokken-Isolate, wurden keine Änderungen in *ciaRH* beschrieben (Croucher *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2009; Hoskins *et al.*, 2001; Lanie *et al.*, 2007; Tettelin *et al.*, 2001). In einer Veröffentlichung von 2010 wurde zum ersten Mal eine Mutation in *ciaH* in dem klinischen Isolat *S. pneumoniae* Tupelo beschrieben (Moscoso *et al.*, 2010). Hierbei handelt es sich um ein Vancomycin-tolerantes Isolat des Serotyp 14 von 1998 aus dem Liquor eines 10 Monate alten Mädchens mit Meningitis, bei dem sich nach Einstellen der Behandlung mit Vancomycin die Krankheit wieder verschlimmerte (McCullers *et al.*, 2000). Die Mutation in *ciaH* wird in Verbindung gebracht mit dem Phänotyp der Vancomycintoleranz (Moscoso *et al.*, 2010).

Dort führt die Punktmutation G592T in *ciaH* zur Änderung der Aminosäuresequenz an der Stelle 198 von Alanin zu Serin (A198S). Diese befindet sich in der zweiten Transmembrandomäne von CiaH. Das *ciaH*-Allel wurde als *ciaHTpVT* bezeichnet (Moscoso *et al.*, 2010).

Eine detaillierte Analyse dieser *ciaH*-Mutation, unabhängig vom genetischen Hintergrund des Tupeloisolats, erfolgt in diesem Kapitel. Es werden die durch sie vermittelte Aktivität auf CiaR und die in diesem Zusammenhang stehenden Phänotypen überprüft. Aufgrund der in den letzten Jahren

zunehmenden Anzahl an zugänglichen klinischen Pneumokokken-Genomen in der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information) schien eine Genomanalyse zur Identifizierung bisher nicht bekannter *ciaH*-Mutationen in klinischen Isolaten sinnvoll.

4.1.1 Identifizierung neuer *ciaH*-Allele in klinischen Pneumokokkenisolaten

Zur Identifizierung von Änderungen in *ciaH* Genen von klinischen Pneumokokken-Isolaten wurde eine BLAST-Analyse (Altschul *et al.*, 1990) in der Datenbank des NCBI durchgeführt. Aufgrund der hohen Anzahl an vollständig und unvollständig sequenzierten *S. pneumoniae*-Genomen wurde zunächst die Aminosäuresequenz von CiaH mit dem Programm blastp in der Datenbank nicht redundanter Proteinsequenzen (nr) von *S. pneumoniae* auf Unterschiede hin durchsucht. Als Referenz diente hierbei CiaH aus dem Genom von *S. pneumoniae* R6 (Hoskins *et al.*, 2001). Die BLAST-Analyse erfolgte unter Standardbedingungen. Die klinischen Stämme, bei denen Änderungen in den AS-Sequenzen in CiaH auftraten, wurden anschließend bzgl. ihrer Nukleotidsequenz auf Änderungen hin untersucht. Dies erfolgte mit dem Programm blastn (nucleotide collection (nr/nt)) in der Datenbank des NCBI unter Standardbedingungen.

Zusätzlich standen zwei weitere partielle Genomsequenzen klinischer Pneumokokkenisolate, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Hakenbeck sequenziert wurden, in der Datenbank des Nano Bio Centers (<http://nbc11.biologie.uni-kl.de>) zur Verfügung (Hakenbeck, unveröffentlicht). Hierbei handelt es sich um *S. pneumoniae* Hu15 und Hu17, zwei klinische Isolate aus Ungarn von 1991. Während Hu17 Resistenz gegen Penicillin aufweist, ist Hu15 penicillinsensitiv (Reichmann *et al.*, 1997). Beide Sequenzen besitzen allerdings aufgrund der zur Genomsequenzierung verwendeten 454 Sequenziermethode, die Schwächen bei der eindeutigen Erkennung von Homopolymerfragmenten aufweist, eine relativ große Anzahl an Sequenzfehlern (Wicker *et al.*, 2006). Daher wurden für die Blastanalyse die *ciaRH* Regionen beider Stämme nochmals sequenziert. Anschließend erfolgte der Sequenzvergleich mit *S. pneumoniae* R6 als Referenz. Die Sequenzen der Region um *ciaRH* von Hu15 und Hu17 stimmten mit denen eines in der Datenbank des NCBI vorhandenen klinischen Isolats, dem penicillinresistenten ungarischen Isolat ATCC 700673 (Hungary 19A-6), überein. Sie enthüllten eine Transition von G zu A an der Stelle 232, die einen Aminosäureaustausch von Asparagin zu Aspartat an Position 78 in CiaH verursacht (Tab. 4.1). Neben der Missense-Mutation an Stelle 232 existieren in den *ciaH*-Genen dieser drei Isolate fünf weitere stille Mutationen. In dem Isolat CDC1087-00 tritt neben zwei stillen Mutationen an der Stelle 556 eine Mutation von G zu A auf (*ciaH556*-Allel), die einen Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin an der Position 186 von CiaH verursacht. Des Weiteren besitzen zwei klinische Isolate das *ciaH1057*-Allel, das einen Austausch von Asparat zu

4. Ergebnisse

Asparagin an Position 353 bewirkt. Auch hier liegt in beiden Fällen das identische Allel inklusive der stillen Mutationen vor.

Tab. 4.1: *CiaH* Allele in klinischen *S. pneumoniae*-Isolaten

<i>ciaH</i> Allel	Änderung in Proteinsequenz	Änderungen in Nukleotidsequenz ¹	<i>S. pneumoniae</i> -Stamm ³	Referenz ²
<i>ciaH232</i>	N78D	C57T, <u>A232G</u> , G309A, C483A, T909C, G1173A	Hu15 (19A) Hu17 (19A) ATCC 700673 (19A)	Hakenbeck, unveröffentlicht Genbank ACA36974
<i>ciaH556</i>	V186I	<u>G556A</u> , G762T, G858A	CDC1087-00 (7F)	Genbank EDT91273
<i>ciaHTpVT</i>	A198S	C294T, <u>G592T</u>	Tupelo_VT (14)	(Moscoso <i>et al.</i> , 2010)
<i>ciaH1057</i>	D353N	G309A, T909C, <u>G1057A</u> , G1173A	SP9-BS68 (9V) SP195 (9A)	(Shen <i>et al.</i> , 2006) Genbank EDT92388

¹ Die Mutationen, die zu Austausch in der AS-Sequenz führen, sind unterstrichen.

² Die Referenz bezieht sich auf die *ciaH*-Sequenz, nicht auf den Stamm.

³ Der jeweilige Serotyp ist in Klammern angegeben.

Somit wurden in klinischen Pneumokokkenisolaten vier Varianten von CiaH identifiziert (Stand September 2010). Eine dieser Änderungen existiert in der extracytoplasmatischen Domäne (N78D). Zwei Änderungen (V186I, A198S) sind in der zweiten Transmembrandomäne von CiaH positioniert. Eine weitere Änderung (D353N) befindet sich in der im Cytoplasma lokalisierten CA-Domäne von CiaH (Abb. 4.1). Diese Mutationen von CiaH traten nicht in den auf Cefotaxim und Piperacillin selektionierten Labormutanten von *S. pneumoniae* R6 auf (Müller *et al.*, 2011; Zähler *et al.*, 2002). Es handelt sich hierbei um neue Allele.

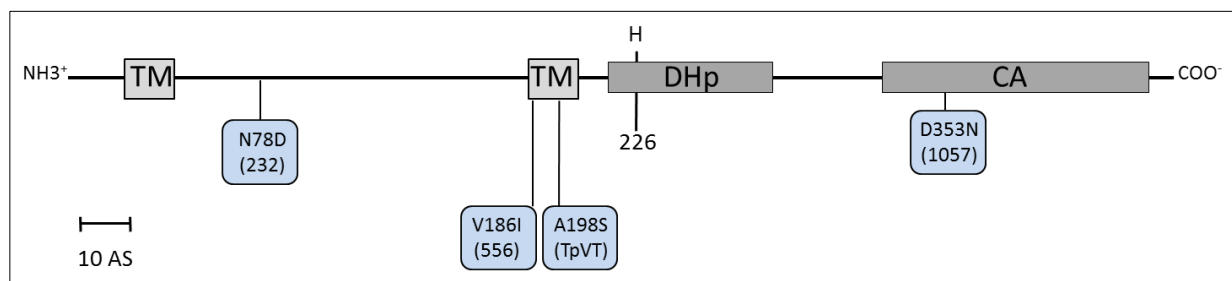


Abb. 4.1: Schematische Darstellung von CiaH mit den Positionen der Aminosäureänderungen in CiaH klinischer Pneumokokken Isolate. Die Änderungen in CiaH sind in blauen Boxen dargestellt, die korrespondierende Allel-Nummer ist in Klammern angegeben. Die Positionen der konservierten Domänen sind in Kästen gezeigt. Der funktionell wichtige Histidinrest ist gesondert markiert.

Die *ciaH*-Allele aus den Labormutanten vermitteln eine Hyperaktivierung des Response Regulators CiaR (Halfmann *et al.*, 2007b; Müller *et al.*, 2011). Sie führen zu einer 4- bis 26-fachen Erhöhung der

Promotoraktivität der CiaR-regulierten Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$. Phänotypisch bewirken sie eine moderate Zunahme der β -Lactamresistenz, eine deutliche Abnahme bzw. den Verlust der genetischen Kompetenz und ein verlangsamtes exponentielles Wachstum sowie eine spätere Autolyse im stationären Wachstum (Müller, 2011). Diese Untersuchungen wurden im identischen genetischen Hintergrund durchgeführt, indem das *ciaH*-Wildtyp-Allel in *S. pneumoniae* R6 durch die *ciaH*-Allele der Labormutanten in *S. pneumoniae* ersetzt wurde. Dadurch wurde gezeigt, dass die in den Labormutanten beobachteten Phänotypen bezüglich der β -Lactamresistenz, Kompetenz und dem Wachstum tatsächlich durch die Varianten in CiaH vermittelt werden (Müller *et al.*, 2011).

Welchen Einfluss die in klinischen Isolaten identifizierten *ciaH*-Allele in den jeweiligen Pneumokokken-Isolaten auf die β -Lactamresistenz, die Kompetenz und das Wachstum ausüben, ist nicht bekannt. Weiterhin existierten keine Daten über den Einfluss der *ciaH*-Allele auf die Aktivität von CiaR. Dies wird im Zuge dieser Arbeit untersucht. Für Pneumokokken ist bekannt, dass sie, unterstützt durch die Fähigkeit zur natürlichen Kompetenz, eine hohe genetische Diversität aufweisen (Hiller *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2006). Zur Durchführung einer vergleichenden Analyse der klinischen *ciaH*-Allele untereinander sowie mit den Laborallelen wurden die Untersuchungen analog zu jenen mit den *ciaH*-Allelen aus den Labormutanten durchgeführt.

Zunächst wurden die klinischen *ciaH*-Allele in den genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 eingebracht. Hierbei wurde das *ciaH*-Wildtyp-Allel durch das jeweilige klinische Allel unter Verwendung der Janus-Kassette (Sung *et al.*, 2001) ersetzt (zur Methode siehe Kapitel 3.18). Aufgrund dessen tragen die Derivate neben den Änderungen in *ciaH*, das Streptomycinresistenzvermittelnde *rpsL41*-Allel, da dies für den Austausch mittels Janus-Kassette benötigt wird. Die klinischen Isolate mit den Allelen *ciaH556* und *ciaH1057* standen nicht zu Verfügung. Daher wurden durch gerichtete Mutagenese lediglich die Nukleotide verändert, die die für den Aminosäureaustausch benötigte Missense-Mutation bewirken. Die stillen Mutationen in *ciaH* fehlen in den beiden konstruierten Stämmen (RKL245, RKL246) (vgl. Tab. 4.1).

4.1.2 Der Einfluss der klinischen *ciaH*-Allele auf die CiaR-abhängige Promotoraktivität

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die durch die klinischen *ciaH*-Allele verursachten Aminosäuresubstitutionen auf die Aktivität des Response Regulators CiaR ausüben. Die Sensorkinase CiaH reguliert die Aktivität des korrespondierenden Response Regulators CiaR. Über die Bestimmung der Promotoraktivität CiaR-regulierter Promotoren können somit Rückschlüsse auf die Aktivität der CiaH-Varianten gezogen werden.

Die Mehrzahl der CiaR-abhängigen Promotoren wird positiv reguliert (Halfmann *et al.*, 2007b). Die Promotoren von P_{htrA} und $P_{spr0931}$ eignen sich aufgrund ihrer starken Abhängigkeit von CiaR besonders gut zur Veranschaulichung der Aktivität von CiaR (Halfmann *et al.*, 2011).

Zur Untersuchung der Aktivität beider Promotoren wurden diese als Promotor-*lacZ*-Reporterfusion über das Plasmid pPP2 (Halfmann *et al.*, 2007b) in das Genom der jeweiligen R6-Derivate mit den klinischen *ciaH*-Allelen integriert. Da die Laborallele einen negativen Einfluss auf die Kompetenz von *S. pneumoniae* bewirken (Guenzi *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 2011), wurde zur Transformation der Reportergenkonstrukte in die Stämme mit klinischen *ciaH*-Allelen das Kompetenz-stimulierende Peptid CSP zugegeben, zur Stimulierung einer möglicherweise unterdrückten Kompetenz (Håvarstein *et al.*, 1995).

Aufgrund der bei der Arbeit mit den *ciaH*-Allelen aus den Labormutanten beobachteten genetischen Instabilität von *ciaRH* wurde nach der Transformation der pPP2-Reporterkonstrukte die Region um *ciaRH* sequenziert und bzgl. des Auftretens zusätzlicher Mutationen überprüft. Die Entstehung sekundärer Mutationen in *ciaRH* wurde in den Stämmen mit klinischen *ciaH*-Varianten jedoch nicht beobachtet.

Anschließend wurde nach dem Wachstum in C+Y-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,8 die β -Galaktosidaseaktivität in diesen Stämmen gemessen. Zur Kontrolle und zum Vergleich der CiaR-vermittelten Aktivität mit den Stämmen, die die Laborallele enthalten, wurde die Aktivität beider Promotoren zusätzlich in dem Stamm mit dem *ciaH_{wt}*-Allel und dem *ciaH306*-Allel bestimmt. Die Ergebnisse der β -Galaktosidaseassays sind in Tab. 4.2 und Abb. 4.2 dargestellt. Die Untersuchung der Aktivität der CiaR-abhängigen Promotoren ergab in allen Fällen eine Änderung der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die Allele *ciaH556* und *ciaH1057* führten zu einer leichten Erhöhung der Expression von P_{htrA} und $P_{spr0931}$, allerdings nur um etwa das 1,5-fache. Das *ciaH232*-Allel aus den ungarischen Isolaten führte hingegen zu einer leichten Abnahme der CiaR-abhängigen Promotoraktivität. Durch das *ciaHTpVT*-Allel wurde eine 3-fache Erhöhung der Aktivität von CiaR vermittelt. Der aktivierende Einfluss von *ciaHTpVT*, *ciaH556* und *ciaH1057* auf CiaR ist jedoch mehr oder weniger deutlich geringer als durch die Laborallele. Die beiden stärksten Allele der Labormutanten, *ciaH102* und *ciaH103*, vermitteln eine 24 bis 26-fache Erhöhung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität, während das schwächste Allel der Labormutanten *ciaH305* eine 4-fache Erhöhung vermittelt (Müller *et al.*, 2011). Die 10 bis 12-fache Erhöhung durch *ciaH306* (Müller *et al.*, 2011) wurde in diesen Experimenten bestätigt. Somit ist die Aktivierung von CiaR durch alle klinischen *ciaH*-Allele niedriger als durch die Allele aus den Labormutanten.

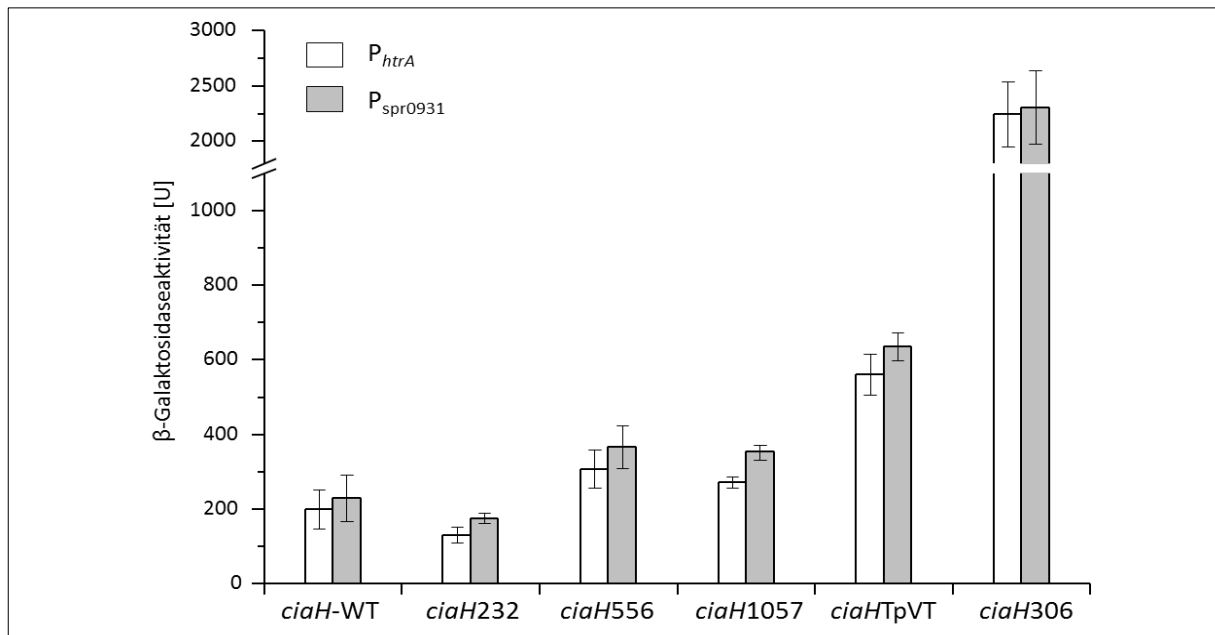


Abb. 4.2: Aktivität der CiaR-regulierten Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ in *S. pneumoniae* R6 und in Stämmen mit verschiedenen *ciaH*-Allelen. Gezeigt ist die β -Galaktosidaseaktivität des Wildtyps R6 (RKL43, RKL30) im Vergleich zu den Stämmen mit den klinischen *ciaH*-Allelen *ciaH232* (RKL248, RKL249), *ciaH556* (RKL254, RKL255), *ciaH1057* (RKL257, RKL258), *ciaHTpVT* (RKL251, RKL252) sowie *ciaH306*-Allel aus der Labormutante C306 (RKL188, RKL189). Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt; die Standardabweichungen sind angegeben. Die β -Galaktosidaseaktivität, die durch P_{htrA} vermittelt wird, ist in weißen Säulen, die durch $P_{spr0931}$ vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in grauen Balken dargestellt. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,8.

Einen Sonderfall unter den klinischen Allelen stellt zudem *ciaH232* dar, da hier die CiaR-abhängige Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp-Allel leicht reduziert ist. Eine Aktivitätsabnahme wurde auch mit den Laborallelen in einem Fall beobachtet. In der Mutantenfamilie C002 entstand im ersten Selektionsschritt das *ciaH102* Allel, welches eine etwa 26-fache Erhöhung der CiaR Aktivität vermittelt. Im zweiten Selektionsschritt entstand eine zusätzliche Mutation in *ciaH*, *ciaH202*, die lediglich zu einer 15-fachen Erhöhung der CiaR Aktivität führt und damit niedriger ist als die im vorangegangenen Selektionsschritt. Diese Mutation alleine, *ciaH202s*, vermittelt eine Reduktion der Promotoraktivität um etwa die Hälfte (vgl. Tab. 2.1). Allerdings handelt es sich bei *ciaH202s* um eine kompensatorische Mutation, die im Anschluss an die hyperaktivierende *ciaH102*-Mutation entstand (Müller, 2011). Dahingegen ist *ciaH232* eine Mutation, die vermutlich ohne eine vorangegangene hyperaktivierende *ciaH*-Mutation entstand.

In C+Y-Medium steigt die CiaR-Aktivität in Abwesenheit der Kinase um etwa die Hälfte an. Die Sensor kinase CiaH agiert unter diesen Bedingungen offensichtlich als Phosphatase (Halfmann *et al.*, 2011). Es ist daher denkbar, dass die klinischen Allele *ciaH556* und *ciaH1057* in C+Y-Medium die Phosphataseaktivität von CiaH inhibieren oder die Kinaseaktivität leicht aktivieren. Im Gegensatz

4. Ergebnisse

dazu inhibiert die Mutation in *ciaH232* die Kinaseaktivität von CiaH oder aktiviert deren Phosphataseaktivität. Welche der beiden Aktivitäten von CiaH betroffen ist, kann unter den Wachstumsbedingungen in C+Y-Medium allerdings nicht eindeutig geklärt werden. Die Mutation in *ciaHTpVT* stimuliert dagegen offensichtlich die Kinaseaktivität, da in C+Y-Medium die CiaR-abhängige Promotoraktivität bei Fehlen der Kinase nicht auf das Niveau ansteigt, wie in Anwesenheit von *ciaHTpVT*.

Tab. 4.2: Aktivität der CiaR-regulierten Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ in *S. pneumoniae* R6 und in Stämmen mit verschiedenen *ciaH*-Allelen.

Stamm	<i>ciaH</i> -Allel	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	<i>ciaH</i> -Allel / <i>ciaH</i> -wt
RKL43	<i>ciaH</i> -wt (R6)	P_{htrA}	202 \pm 53	
RKL30		$P_{spr0931}$	230 \pm 62	
RKL248	<i>ciaH232</i>	P_{htrA}	131 \pm 21	0,7
RKL249		$P_{spr0931}$	176 \pm 13	0,8
RKL254	<i>ciaH556</i>	P_{htrA}	308 \pm 51	1,6
RKL255		$P_{spr0931}$	367 \pm 57	1,6
RKL257	<i>ciaH1057</i>	P_{htrA}	272 \pm 16	1,4
RKL258		$P_{spr0931}$	353 \pm 20	1,5
RKL251	<i>ciaHTpVT</i>	P_{htrA}	562 \pm 55	2,8
RKL252		$P_{spr0931}$	637 \pm 37	2,8
RKL188	<i>ciaH306</i>	P_{htrA}	2245 \pm 294	11,2
RKL189		$P_{spr0931}$	2307 \pm 328	10,0

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8.

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben.

Die *ciaH*-Allele der Labormutanten beeinflussen unabhängig von ihrem genetischen Hintergrund und zusammenhängend mit ihrem aktivierenden Effekt auf CiaR die Resistenz gegen β -Lactamantibiotika, die Kompetenz sowie das Wachstum und das Lyseverhalten von *S. pneumoniae* (Müller, 2011). Im Folgenden wird der Effekt der klinischen *ciaH*-Allele auf diese Phänotypen untersucht.

4.1.3 Der Einfluss der klinischen *ciaH*-Allele auf die Suszeptibilität gegen β -Lactamantibiotika

Die *ciaH*-Allele in den Labormutanten wurden nach Selektion auf den β -Lactamantibiotika Cefotaxim und Piperacillin isoliert (Laible & Hakenbeck, 1987) und stellen daher Resistenzdeterminanten gegen β -Lactame dar. Derivate von *S. pneumoniae* R6 mit den jeweiligen Allelen ertragen höhere

Konzentrationen der β -Lactame Cefotaxim und Oxacillin als der R6 Wildtyp, wobei die Resistenz von der Aktivierungsstärke des CiaRH-Systems abhängt, die durch das jeweilige *ciaH*-Allel vermittelt wird (Müller *et al.*, 2011).

Auch die *ciaH*-Allele in den klinischen Isolaten sind offensichtlich durch die Behandlung mit Antibiotika selektioniert worden. Hier ist vorstellbar, dass im Gegensatz zu den Laborisolaten mehrere Antibiotika zur Entstehung von Änderungen in *ciaH* beitrugen. Beispielsweise wurde die durch den Tupelo Stamm ausgelöste Meningitis bei einem Kleinkind mit den β -Lactamen Cefotaxim und Ceftriaxon sowie dem Glykopeptid Vancomycin behandelt. Nach Absetzen der Antibiotika verschlimmerte sich die Krankheit wieder, so dass die Dosis dieser Antibiotika erhöht werden musste und zusätzlich Rifampicin zur Behandlung angewendet wurde. Die Isolierung des Stammes erfolgte nach dem Absetzen der ersten Antibiotikabehandlung (McCullers *et al.*, 2000). Es wurden Penicillinresistenz (MHK: 2 $\mu\text{g/ml}$) und Vancomycintoleranz (MHK: 0,5 $\mu\text{g/ml}$) sowie Cefotaximresistenz (MHK: 1 $\mu\text{g/ml}$) festgestellt (McCullers *et al.*, 2000; Moscoso *et al.*, 2010). Neben der beschriebenen Veränderung in den PBP2x in *S. pneumoniae* Tupelo könnte das veränderte *ciaH*, neben seiner beschriebenen Rolle auf die Vancomycintoleranz, auch am Resistenzphänotyp gegen β -Lactame beteiligt sein. Die ungarischen Isolate Hu15, Hu17 und ATCC 700663 besitzen das Allel *ciaH232*. Allerdings unterscheiden sie sich bzgl. ihrer β -Lactamresistenz. Während die MHK von Penicillin in Hu17 24 $\mu\text{g/ml}$ beträgt, zeigt das Isolat Hu15 Sensitivität gegen die β -Lactame Penicillin, Cefotaxim und Oxacillin (Reichmann *et al.*, 1997). Das Isolat ATCC 700663 ist wiederum penicillinresistent (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/28035>). Daten über die β -Lactamresistenz in den anderen Pneumokokken-Isolaten mit veränderten *ciaH* sind nicht vorhanden. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit der Einfluss der klinischen *ciaH*-Allele auf die Suszeptibilität gegen β -Lactame im R6-Hintergrund überprüft, und zwar unabhängig von weiteren möglichen Resistenzdeterminanten, die im genetischen Hintergrund der klinischen Isolate existieren könnten. Analog zu den Untersuchungen mit den Laborallelen wurden die β -Lactamantibiotika Cefotaxim und Oxacillin verwendet. Bei Cefotaxim handelt es sich um ein Cephalosporin der dritten Generation, Oxacillin ist ein Antibiotikum der Klasse der Isoxazolylpenicilline. Die Stämme wurden nach Wachstum in C+Y-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,3 auf Blutagarplatten getropft, die steigende Konzentrationen an beiden β -Lactamantibiotika enthielten.

Die Ergebnisse des Tropfentests sind in Abb. 4.3 dargestellt. Bei *S. pneumoniae* R6 *rpsL41* mit dem Wildtyp-Allel ist auf D-Blutagarplatten mit 0,02 $\mu\text{g/ml}$ Cefotaxim bzw. mit 0,07 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin noch Wachstum erkennbar. Der Stamm mit *ciaHTpVT*, das eine 3-fache Erhöhung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität bewirkt, wächst noch bei einer Cefotaximkonzentration von 0,025 $\mu\text{g/ml}$ und einer Oxacillinkonzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$.

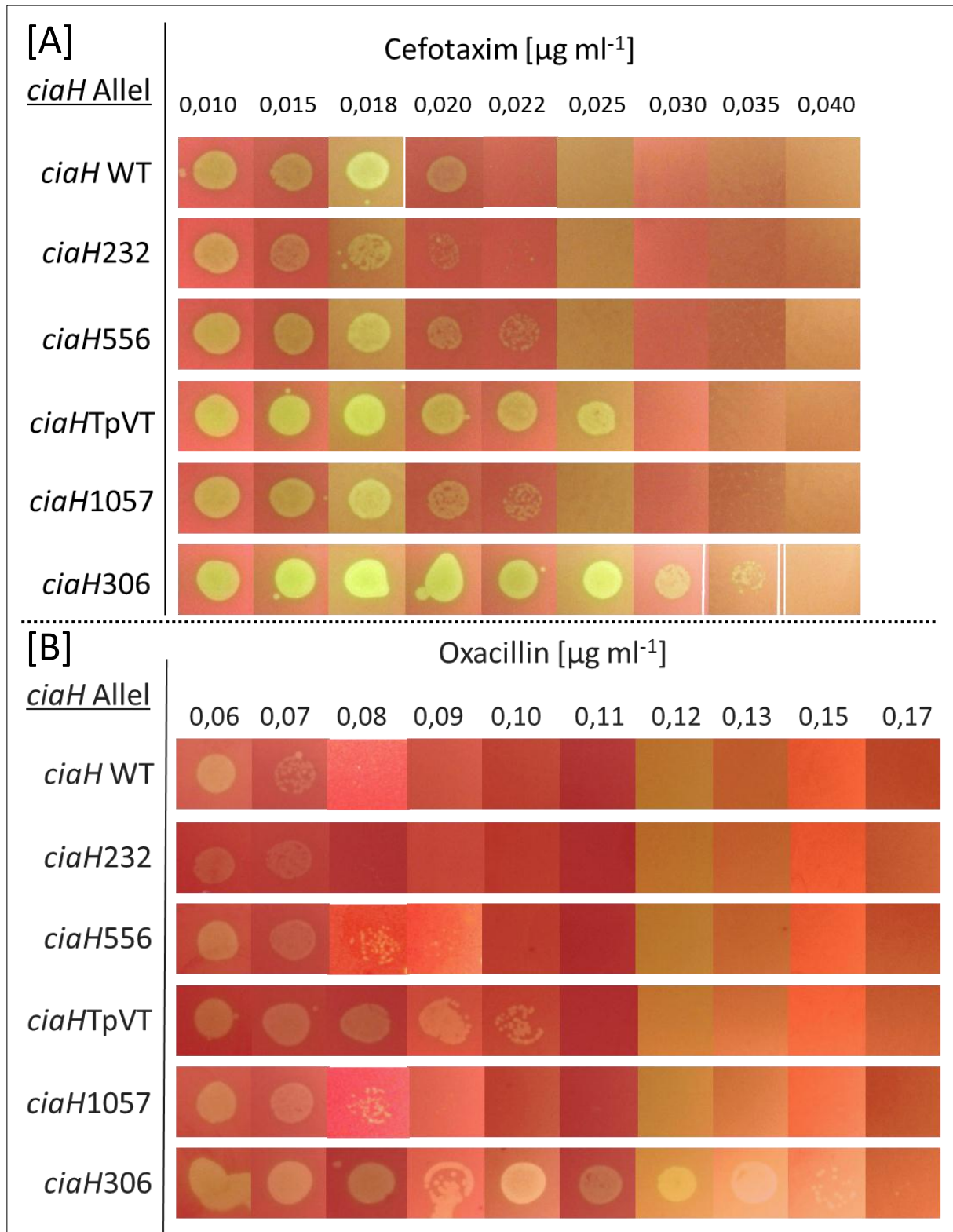


Abb. 4.3 Suszeptibilität von *S. pneumoniae* R6 *rpsL41* und seinen Derivaten mit klinischen *ciaH*-Allelen gegen die β -Lactamantibiotika Cefotaxim (A) und Oxacillin (B). Dargestellt ist das Wachstum auf Blutagarplatten mit ansteigenden Antibiotikakonzentrationen (von links nach rechts) für die Stämme mit veränderten *ciaH*-Allelen; von oben nach unten: RKL242 (= R6 *rpsL41*), RKL243, RKL245, RKL244, RKL246, RKL168. Das Bakterienwachstum zeigt sich als grünliche Verfärbung des Blutagars, verursacht durch die α -Hämolyse der Bakterien. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen bei 37°C in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 angezogen. Die Inkubation auf den Blutagarplatten erfolgte bei 37°C für 48 h. Gezeigt sind die Ergebnisse eines typischen Experiments.

Demnach vermittelt *ciaHTpVT* eine moderate Erhöhung der β -Lactamresistenz. Die Stämme mit den die CiaR-Aktivität um den Faktor 1,5 erhöhenden Allelen *ciaH556* und *ciaH1057* zeigen nahezu keine Änderung in der β -Lactamsuszeptibilität. Hier tritt jeweils leichtes Wachstum bei 0,022 $\mu\text{g/ml}$ Cefotaxim und 0,08 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin auf. Der Stamm mit dem *ciaH232*-Allel, das nicht zu einer Erhöhung der CiaR-Aktivität führt, zeigt keine Veränderung in der β -Lactamsuszeptibilität. Die β -Lactamsuszeptibilität des Stammes mit *ciaH306* stimmt mit denen früherer Beobachtungen überein (Müller, 2011; Zähler *et al.*, 2002). Von den klinischen *ciaH*-Allelen vermittelt lediglich *ciaHTpVT* eine signifikante Erhöhung der β -Lactamresistenz im R6-Hintergrund. Demnach muss zur Steigerung der β -Lactamresistenz im sensitiven Stamm R6 durch die *ciaH*-Allele die CiaR-abhängige Promotoraktivität um mindestens das 3-fache des Wildtyps erhöht werden. Diese Ergebnisse zeigen klar, dass die A198S Mutation in CiaH in *S. pneumoniae* Tupelo an dessen β -Lactamresistenz beteiligt ist. Hierbei handelt es sich um das erste Beispiel, in dem gezeigt wurde, dass eine Veränderung von *ciaH* in klinischen Pneumokokken-Isolaten unabhängig von anderen Genveränderungen zur Erhöhung der β -Lactamresistenz führt.

4.1.4 Der Einfluss der klinischen *ciaH*-Allele auf die Entwicklung der Kompetenz

Die genetische Kompetenz ist ein Mechanismus zum Austausch genetischen Materials und basiert auf der Aufnahme externer DNA und deren Integration in das Genom des Empfängers (Claverys *et al.*, 2006). Wie bereits bei der Entdeckung von *ciaRH* beobachtet wurde, hat die T230P Mutation in CiaH (*ciaH306*) einen negativen Einfluss auf die Kompetenz. In C+Y-Medium führte die durch *ciaH306* vermittelte Hyperaktivierung der CiaR-Aktivität in der Labormutante *S. pneumoniae* R6 C306 zum Verlust der genetischen Kompetenz (Guenzi *et al.*, 1994). Neuere Untersuchungen zeigten, dass neben *ciaH306* auch fast alle anderen Laborallele zum Verlust der natürlichen Transformierbarkeit führen, unabhängig von den übrigen Resistenzdeterminanten der Labormutanten. Lediglich in Anwesenheit des schwächsten aktivierenden Allels *ciaH305* wurden sehr wenige Transformanten erhalten. Die Transformationseffizienz lag hier im Vergleich zum Wildtyp drei Zehnerpotenzen niedriger. Bereits durch eine von *ciaH*-Allelen vermittelten 4-fachen Aktivierung von *ciaRH* nimmt die Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* drastisch ab (Müller *et al.*, 2011).

Die klinischen *ciaH*-Allele aktivieren das *cia*-System schwächer als die Laborallele. Das stärkste klinische Allel ist *ciaHTpVT* mit einer 3-fachen Aktivierung (Kapitel 4.1.2). Daher ist von Interesse inwiefern diese *ciaH*-Allele die Kompetenz beeinflussen.

4. Ergebnisse

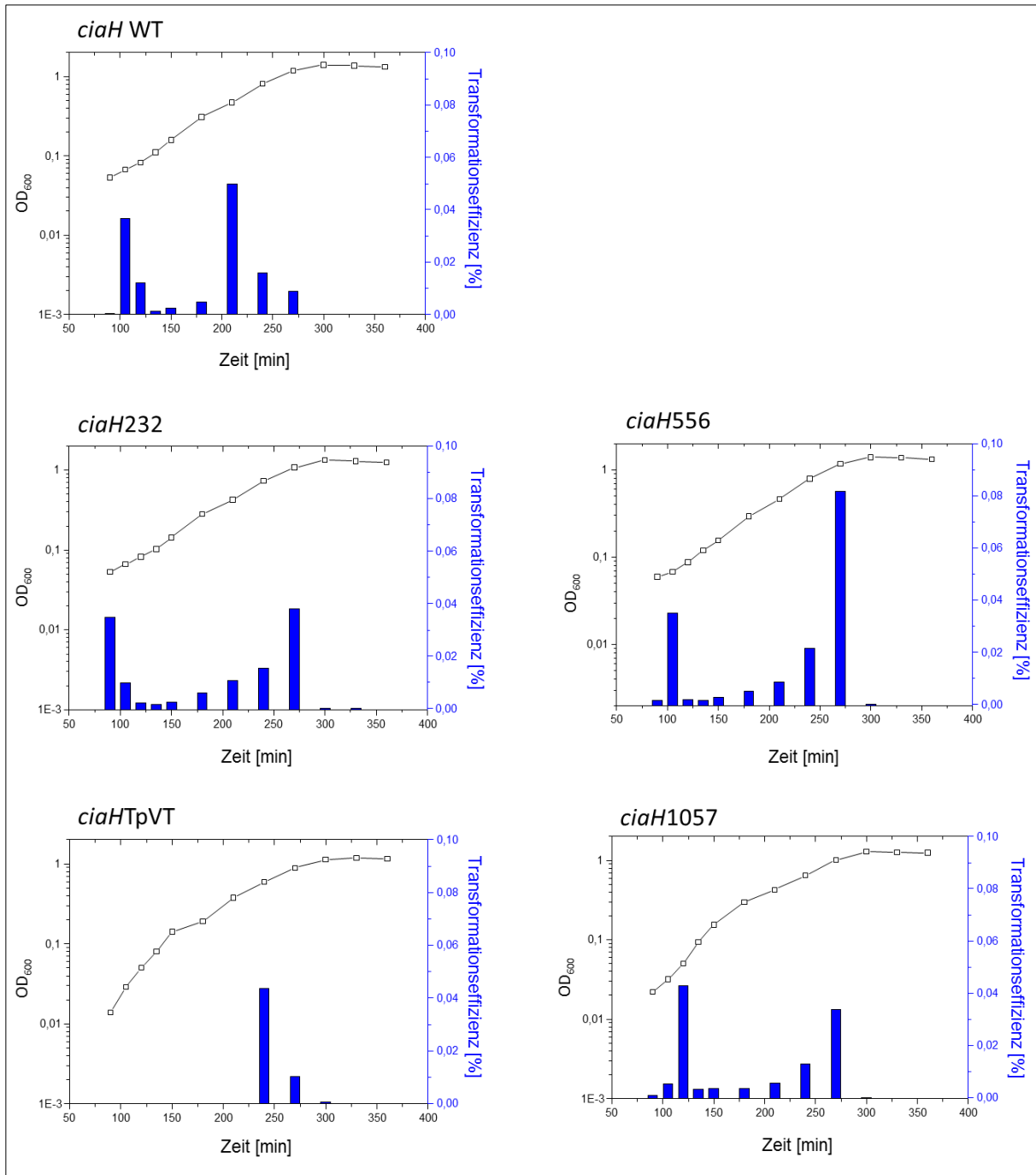


Abb. 4.4: Einfluss der klinischen *ciaH*-Allele auf die Kompetenzentwicklung in *S. pneumoniae* während des Wachstums in C+Y-Medium. Gezeigt ist der Kompetenzverlauf der Stämme RKL242 (R6 *rpsL41*), RKL243 (*ciaH232*), RKL245 (*ciaH556*), RKL244 (*ciaHTpVT*) und RKL246 (*ciaH1057*) in C+Y-Medium. Zum Starten des Experiments wurde eine Glycerinkultur aus C+Y-Medium mit pH 6,8 in C+Y-Medium 1%ig angeimpft. Nach dem Zeitpunkt des Animpfens ($t=0$) wurde zwischen den Zeitpunkten $t=90-150$ min im Abstand von 15 min und zwischen den Zeitpunkten $t=150-360$ min im Abstand von 30 min Proben entnommen und die Transformationseffizienz mit Hilfe des Transformationsmarkers RKL222 bestimmt. Die Transformationseffizienz (blaue Säulen) ist der prozentuale Anteil der rifampicinresistenten Kolonien gegen die Gesamtlebendkeimzahl. Das Wachstum wurde photometrisch bei einer OD von 600 nm bestimmt (Kurve). Die Transformationseffizienz wurde in mindestens zwei unabhängigen Versuchen getestet. Die Abbildung zeigt je ein repräsentatives Beispiel.

Die Untersuchung der Kompetenzentwicklung der *S. pneumoniae*-Derivate mit den klinischen *ciaH*-Allelen erfolgte während des Wachstums in C+Y-Medium. Da die Stämme mit den *ciaH*-Allelen mit Hilfe der Janus Kasette (Sung *et al.*, 2001) konstruiert wurden und das Streptomycinresistenz-verleihende *rpsL41*-Allel besitzen, konnte der standardmäßig verwendete Transformationsmarker, chromosomale DNA des Stammes RKL242 mit *rpsL41* (Halfmann *et al.*, 2011), nicht benutzt werden. Stattdessen wurde als Transformationsmarker chromosomale DNA des Stammes RKL222 verwendet. Dieser trägt eine Variante des Gens *rpoB* (*rpoB*_{C1456T}), die Rifampicin-Resistenz vermittelt. Die Transformationseffizienz liegt mit diesem Marker um einen Faktor 10 niedriger als mit dem Streptomycinresistenzmarker (Müller *et al.*, 2011).

Zur Beobachtung der Kompetenzentwicklung wurden nicht kompetente Vorkulturen der zu untersuchenden Stämme in C+Y-Medium mit einem pH-Wert von 6,8 hergestellt. Diese wurde in C+Y-Medium angezogen und die Transformationseffizienz zu verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums bestimmt (Abb. 4.4). Der Stamm mit dem Wildtyp *ciaH* zeigte die Ausbildung zweier Kompetenzmaxima zu Beginn des und im späten exponentiellen Wachstum.

Die Stämme mit den Allelen *ciaH232*, *ciaH556* und *ciaH1057* zeigen ähnliche Kompetenzmuster wie der Wildtyp mit zwei Kompetenzmaxima. Der Stamm mit *ciaHTpVT* hingegen unterscheidet sich dadurch, dass nur ein Kompetenzmaximum vorhanden ist. Zu Beginn des exponentiellen Wachstums traten keine Transformanten auf. R6 *ciaHTpVT* zeigte im Kompetenzpeak eine ähnlich hohe Transformationseffizienz wie die übrigen Stämme in ihrem zweiten Kompetenzmaximum.

Im Gegensatz zu den *ciaH*-Allelen der Labormutanten führten die klinischen *ciaH*-Allele nicht zum Verlust der Transformierbarkeit. Lediglich das dreifach aktivierende Tupelo-Allel unterdrückt die Transformierbarkeit zu Beginn des exponentiellen Wachstums; in der späten exponentiellen Wachstumsphase ist dieser Stamm jedoch natürlich kompetent.

Die vierfache Aktivierung des *cia*-Regulons durch das Laborallel *ciaH305* blockiert die Transformierbarkeit nahezu vollständig (Müller *et al.*, 2011). Demnach scheint es bzgl. der durch die *ciaH*-Allele vermittelten Aktivierung von CiaRH einen Schwellenwert zu geben, bei dessen Überschreitung die Kompetenz blockiert wird. Unter den angewandten Bedingungen liegt dieser offensichtlich zwischen einer 3 bis 4-fach erhöhten Aktivierung.

4.1.5 Der Einfluss der klinischen *ciaH*-Allele auf das Wachstum von *S. pneumoniae*

In früheren Studien mit *S. pneumoniae* R6 wurde festgestellt, dass das *cia*-System Einfluss auf das Wachstum nimmt und insbesondere vor Lyse schützt. Ein inaktiviertes *cia*-System führt in C+Y-Medium zur früheren Autolyse in der stationären Wachstumsphase (Halfmann *et al.*, 2007b; Mascher

et al., 2006a). Dagegen bewirkt die Hyperaktivierung durch im Labor selektionierte *ciaH*-Allele eine verzögerte Autolyse in der Stationärphase. Auch das exponentielle Wachstum ist verlangsamt. Allerdings ist der Einfluss auf das Wachstum und die Lyse abhängig vom Aktivierungsgrad. Lediglich die Anwesenheit stark aktivierender *ciaH*-Allele bewirkt eine verlängerte Generationszeit von *S. pneumoniae* und eine deutlich verzögerte Autolyse (Müller, 2011).

Die klinischen *ciaH*-Allele beeinflussen das Wachstum nicht. Weder in der exponentiellen Wachstumsphase, noch der Verlauf der Autolyse sind im Vergleich zur Anwesenheit von *ciaH*-wt betroffen. Der nicht vorhandene Einfluss auf das Wachstum ist nachvollziehbar, da die Aktivierung von *ciaRH* durch die klinischen Allele niedriger ist als durch alle Laborallele.

In den Stämmen mit stark aktivierenden Laborallelen (*ciaH102*, *ciaH103*, *ciaH202*, *ciaH306*) existiert neben der reduzierten Wachstumsrate auch eine genetische Instabilität. In solchen Kulturen traten regelmäßig Sekundärmutationen in *ciaR* und *ciaH* auf, Nonsense- und Missense-Mutationen in *ciaR* und *ciaH*, die zur Reduktion der CiaR-Aktivität führten, begleitet von der Wiederherstellung der Transformierbarkeit, Reduktion der β -Lactamresistenz und schnellerem Wachstum. Sekundärmutationen in Stämmen mit klinischen *ciaH*-Allelen wurden nicht beobachtet.

Der Grund für das Fehlen von klinischen Pneumokokken-Isolaten mit stark aktivierenden *ciaH*-Allelen könnte somit mit ihrer Instabilität und ihrer langsameren Wachstumsrate zusammenhängen. Dies könnte einen Nachteil im Wirt darstellen. Eine mäßige Aktivierung von CiaR könnte Pneumokokken jedoch zum Überleben einer Antibiotikabehandlung hilfreich sein (Müller *et al.*, 2011).

4.2 Die Aktivierung von CiaR

Die bisher vorgestellten Experimente zeigen, wie Mutationen in der Sensorkinase CiaH die Aktivität des Response Regulators CiaR beeinflussen. In den folgenden Kapiteln wird die Aktivität von CiaR genauer untersucht. In einem klassischen TCS wird der Response Regulator durch die korrespondierende Sensorkinase phosphoryliert. Die Inaktivierung der SK sollte dafür sorgen, dass der RR nicht mehr phosphoryliert wird und inaktiv ist. Das *cia*-Regulon ist jedoch auch aktiv, wenn die Sensorkinase CiaH genetisch inaktiviert ist (Halfmann *et al.*, 2011). Daher scheint das Phosphat zur Aktivierung von CiaR von anderen Quellen zu stammen. Da die Bindungsaffinität von CiaR an die DNA-Bindestelle *in vitro* durch Acetylphosphat erhöht wird (Halfmann *et al.*, 2011), ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass Acetylphosphat auch *in vivo* als Phosphodonor für CiaR agieren könnte. Zudem gibt es Beispiele, die eine Rolle von AcP als Phosphodonor für Response Regulatoren bekräftigen (Wolfe, 2010). Weiterhin existiert in *S. pneumoniae* R6 kein funktioneller Syntheseweg für Carbomoylphosphat (Hoskins *et al.*, 2001), welches neben AcP häufig als weiterer möglicher Kandidat eines Phosphodonors beschrieben wird (Lukat *et al.*, 1992; Wolfe, 2010). In den folgenden Experimenten wird daher der Einfluss von Acetylphosphat auf die CiaR Aktivität *in vivo* genauer untersucht.

Zur Überprüfung der AcP-abhängigen Aktivierung von CiaR sollte die zelluläre Acetylphosphatkonzentration variiert werden. Die Änderung der Menge an Acetylphosphat kann über drei Wege erfolgen. Zum einen kann die genetische Manipulation, indem die Gene, deren Produkte an der Acetylphosphatsynthese beteiligt sind, einzeln und in Kombination inaktiviert werden, zur Akkumulation oder Verringerung von Acetylphosphat führen. Des Weiteren kann durch Änderung der Zuckerquelle oder indem die Substratkonzentration deren Enzyme, die an der Synthese von AcP beteiligt sind, verändert wird, die Acetylphosphatmenge variiert werden (Wolfe, 2005). Diese drei Wege werden im Folgenden durchgeführt. Es wird die CiaR-Aktivität unter diesen Bedingungen untersucht und mit den gewöhnlich existierenden Bedingungen verglichen. Anschließend erfolgt die Messung der AcP-Mengen. Diese werden im Hinblick auf die jeweilige CiaR-Aktivität betrachtet, wodurch der Einfluss von AcP geklärt werden soll.

Um den Effekt von AcP auf die CiaR-Aktivität *in vivo* zu überprüfen, muss dies in einem Stamm mit inaktiver Sensorkinase erfolgen, damit der Einfluss von AcP unabhängig von CiaH bleibt. Allerdings ist bisher auch ungeklärt, inwieweit durch eine veränderte zelluläre AcP-Menge die CiaH-abhängige CiaR-Aktivierung beeinflusst wird. Daher werden die Experimente zur Untersuchung der Rolle von AcP in *S. pneumoniae*-Derivaten mit funktioneller und inaktiver *ciaH* durchgeführt.

4.2.1 Die CiaR-Aktivität und die Rolle des Syntheseweges von Acetylphosphat

In der ersten Versuchsreihe wird die zelluläre Acetylphosphatmenge durch genetische Manipulation verändert und darauffolgend die CiaR-Aktivität in diesen Stämmen untersucht. In *S. pneumoniae* wird Acetylphosphat als Zwischenprodukt des Pyruvatmetabolismus durch die drei Enzyme Pyruvatoxidase (*spxB*), Phosphotransacetylase (*pta*) und Acetatkinase (*ackA*) synthetisiert (Abb. 4.5), im Folgenden auch als SpxB-Pta-AckA-Weg und AcP-Syntheseweg bezeichnet.

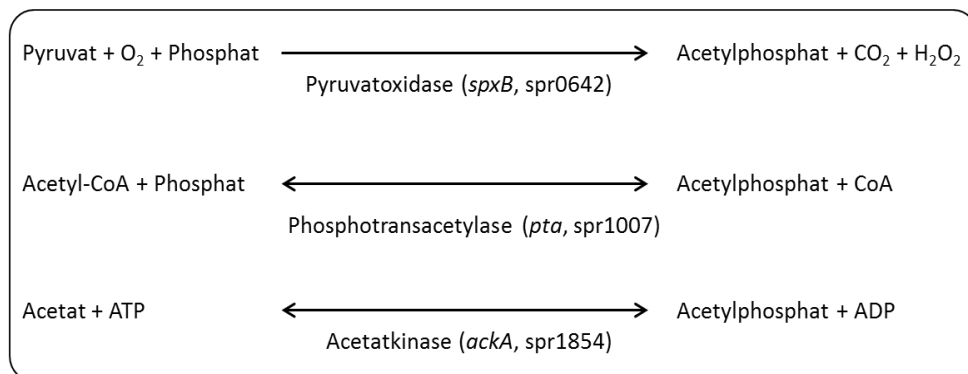


Abb. 4.5: Stoffwechselwege zur Synthese von Acetylphosphat in *S. pneumoniae* R6. Die Gene, deren Produkte Acetylphosphat synthetisieren, sind in Klammern angegeben (nach Carvalho *et al.*, 2011 und Ramos-Montanez *et al.*, 2010)

Die Pyruvatoxidase decarboxyliert Pyruvat und Phosphat in Anwesenheit von Sauerstoff irreversibel zu Acetylphosphat, CO₂ und H₂O₂, wohingegen Phosphotransacetylase und Acetatkinase im Prinzip reversible Reaktionen katalysieren. Die Phosphotransacetylase bildet AcP durch Umwandlung von Acetyl-CoA und Phosphat (P_i), wobei freies CoenzymA entsteht. Die Acetatkinase synthetisiert AcP durch Phosphorylierung von Acetat und unter Verbrauch eines Moleküls ATP.

Die Gene der drei Enzyme zur AcP-Synthese wurden einzeln und in Kombination inaktiviert. Die Konstrukte zur Inaktivierung von *spxB*, *pta* und *ackA* waren bereits aus vorangegangenen Arbeiten verfügbar. Das Deletionskonstrukt *spxB::ermB* wurde durch Insertion des Erythromycinresistenz verleihenden Gens *ermB* über eine *HindIII* Restriktionsschnittstelle in *spxB* konstruiert (Bättig & Mühlemann, 2008). Das Deletionskonstrukt von *pta* wurde durch Einbringen des Chloramphenicolresistenz vermittelnden Gens *cat* dargestellt, das Konstrukt zur Inaktivierung von *ackA* durch Insertion des Kanamycinresistenz verleihenden Gens *aphIII* (Günzler, 2010) (zur Übersicht siehe Kapitel 3.19). Im Folgenden wird nun zunächst auf die jeweiligen Inaktivierungen im genetischen Hintergrund des *ciaRH*-Wildtyps eingegangen. Es erfolgt die Charakterisierung und die Bestimmung der CiaR-Aktivität

4.2.1.1 Darstellung und Charakterisierung von Mutanten des SpxB-Pta-AckA-Wegs

Die Inaktivierung von *spxB* führte zu morphologischen Veränderungen. Zum einen waren die Kokken mikroskopisch betrachtet im Vergleich zu den Wildtypzellen leicht vergrößert (Abb. 4.6).

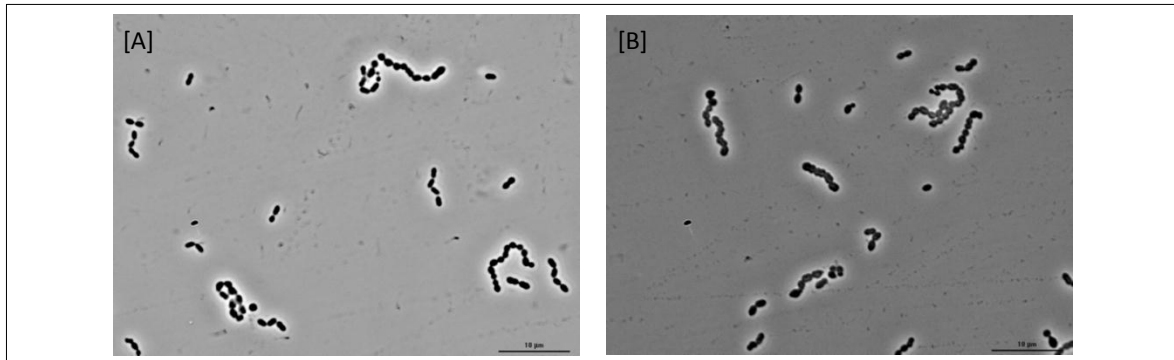


Abb. 4.6: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von *S. pneumoniae* R6 [A] und *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB* [B]. Gezeigt sind Zellen einer exponentiell wachsenden Flüssigkultur in C+Y-Medium in 100-facher Vergrößerung. Der Maßstab ist jeweils rechts unten dargestellt.

Des Weiteren waren Kolonien mit *spxB*-Deletion auf Blutagar größer und sahen robuster aus. Diese Beobachtung ist nicht ganz neu. Bereits von Belanger *et al.* (2004) wurde beschrieben, dass Kolonien von *S. pneumoniae* R6 mit einer *spxB*-Deletion morphologisch so verändert sind, dass sie dessen Vorläufer *S. pneumoniae* D39 ähneln. Es existieren unterschiedliche Varianten des *spxB*-Allels in verschiedenen Pneumokokken-Stämmen (Ramos-Montanez *et al.*, 2008), wobei *S. pneumoniae* D39 ein *spxB*-Allel besitzt, dessen Produkt in etwa 4-mal weniger H_2O_2 produziert als das Produkt des *spxB*-Allels in *S. pneumoniae* R6 (Belanger *et al.*, 2004). Da Pneumokokken keine Katalase besitzen, ist nachvollziehbar, dass R6-Kolonien kleiner sind als D39-Kolonien. Weiterhin ähnelten R6-Kolonien, die das *spxB*-Allel von D39 anstelle des eigenen Allels besaßen, auf Blutagar R6-Kolonien mit deletiertem *spxB* und D39-Wildtyp Kolonien (Belanger *et al.*, 2004).

Die Inaktivierung von *pta* hatte geringfügige morphologische Änderungen zur Folge. Kolonien von *S. pneumoniae* R6 *pta::cat* waren auf D-Blutagar etwas kleiner als diejenigen des Wildtyps. Diese Beobachtung wurde auch bereits für die *pta*-Deletionsmutante in *S. pneumoniae* D39 beschrieben (Ramos-Montanez *et al.*, 2010).

Die Inaktivierung des für die Acetatkinase kodierenden Gens *ackA* führte auf D-Blutagar zur Entstehung heterogener Kolonietypen, wobei drei Formen auftraten. Es entstanden viele winzige, kaum sichtbare Kolonien sowie wenige Kolonien zweier nahezu normalgroßer Formen, die sich in ihrer Größe wiederum leicht unterschieden. In einem weiteren Durchgang traten nur die winzigen Kolonien auf. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in früheren Versuchen, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hakenbeck durchgeführt wurden, gemacht (R. Brückner, persönliche Mitteilung). Wie

mittels PCR bestätigt wurde, fand in allen Fällen die Integration des *ackA*-Deletionskonstruktes statt. Das Auftreten könnte auf die Entstehung zusätzlicher Mutationen in vereinzelt Transformanten zurückzuführen sein, die die Vergrößerung der Kolonien bewirken. Die in der Mehrzahl auftretenden winzigen Kolonien scheinen unter diesen Bedingungen einen Wachstumsdefekt zu haben. Dieser könnte auf das durch die Pyruvatoxidase produzierte H_2O_2 zurückzuführen sein. Ein weiterer Hinweis, dass SpxB dabei eine Rolle spielt, kommt aus Beobachtungen mit Experimenten von *S. pneumoniae* D39 (Ramos-Montanez *et al.*, 2010). Dort wurden im Rahmen einer *ackA*-Deletion Suppressormutationen in *spxB* beobachtet, die zur Inaktivierung von *spxB* oder zur Verringerung der SpxB-Aktivität führten.

Da die Pyruvatoxidase für die Umwandlung von Pyruvat in Acetylphosphat Sauerstoff benötigt, sollte durch Verringerung der O_2 -Konzentration eine niedrigere Enzymaktivität von SpxB stattfinden. Durch die Inkubation der Transformanten in einer anaeroben Atmosphäre sollte es möglich sein, das Wachstum der Kolonien der *ackA*-Deletionsmutante auf D-Blutagar zu verbessern. Daher erfolgte nach Transformation des *ackA*-Deletionskonstruktes in *S. pneumoniae* R6 die Inkubation der Transformanten in einer anaeroben Atmosphäre mit einer CO_2 -Konzentration von 8-10% und einer O_2 -Konzentration von 5-7%. Tatsächlich traten Kolonien auf, die deutlich sichtbar und von gewöhnlicher Größe waren. Die entstandenen Kolonien waren weitestgehend homogen, lediglich sehr vereinzelt traten wiederum vergrößerte Kolonien auf, die denen einer R6-Kolonie mit inaktivierter Pyruvatoxidase ähnelten. Nach Überstreichen einzelner Kolonien und Inkubation in anaerober Atmosphäre traten auch in dem Bakterienrasen vereinzelt größere Kolonien auf. Die vergrößerten Kolonien blieben nach dem Überstreichen homogen. Demnach ist die Inaktivierung von *ackA* in *S. pneumoniae* R6 prinzipiell möglich. Jedoch trat beim Wachstum auf Blutagar eine geringe Inhomogenität der Kolonien auf. Die gleiche Beobachtung wurde für das R6-Derivat mit der Doppelinaktivierung von *pta* und *ackA* gemacht. Hier erfolgte die Inaktivierung von *ackA* im Anschluss an die Inaktivierung des Gens der Phosphotransacetylase.

Zur Herstellung der Doppelmutante *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB ackA::aphIII* erfolgte die Deletion von *ackA* im Anschluss an die Inaktivierung der Pyruvatoxidase. Nach dieser Reihenfolge wurde verfahren, da wie zuvor beschrieben eine geringe Inhomogenität der *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII* Kolonien auftreten kann. Die Inaktivierung von *spxB* vor der Deletion von *ackA* schien daher sinnvoll. In Experimenten nach dieser Reihenfolge wurden auf Festmedium sogar einheitliche Kolonien erhalten, die morphologisch denen einer *spxB*-Deletion ähnelten. Nach großflächigem Überstreichen einzelner Kolonien blieben diese ebenfalls homogen. Demnach entstehen homogene Kolonien in einem Stamm einer *ackA*-Deletion, wenn *spxB* deletiert ist. Umgekehrt deutet dies daraufhin, dass eine funktionelle Pyruvatoxidase die leichte Inhomogenität der Kolonien von *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII* verursacht. Eine ähnliche Beobachtung wurde in *S. pneumoniae* D39 gemacht. Dort

führte die Einzelinaktivierung des Gens der Acetatkinase unter anderem zur Bildung von Suppressormutanten mit Nonsense-Mutationen in *spxB* die ebenfalls homogen blieben (Ramos-Montanez *et al.*, 2010).

Die Darstellung der Derivate von *S. pneumoniae* R6 mit Doppeldeletionen in *spxB* und *pta* sowie der Dreifachdeletion von *spxB*, *pta* und *ackA* war unauffällig. Die Kolonien waren homogen und ähnelten im Wachstum auf Blutagar morphologisch denen von *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB*.

Neben den morphologischen Veränderungen in diesen Mutanten traten auch Änderungen im Wachstumsverhalten im C+Y-Medium auf (Abb. 4.7, Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Wachstumsgeschwindigkeit von Derivaten des Pyruvatmetabolismus

Stamm	Mutationen im AcP-Syntheseweg			Generationszeit [min]
R6		wt		37
RKL95	<i>spxB::ermB</i>			39
RKL380		<i>pta::cat</i>		58
RKL379			<i>ackA::aphIII</i>	40
RKL394	<i>spxB::ermB</i>		<i>ackA::aphIII</i>	63
RKL399	<i>spxB::ermB</i>	<i>pta::cat</i>		55
RKL416		<i>pta::cat</i>	<i>ackA::aphIII</i>	44
RKL369	<i>spxB::ermB</i>	<i>pta::cat</i>	<i>ackA::aphIII</i>	53

Die Stämme wurden bei 37°C in C+Y-Medium inkubiert.

Die Generationszeiten wurden rechnerisch aus den Wachstumskurven von Abb. 4.7 ermittelt.

Derivate mit einer *spxB*-Deletion erreichten bei einer etwas geringeren Wachstumsdichte als der R6-Wildtyp die stationäre Wachstumsphase. Das Inaktivieren von *spxB* scheint somit Auswirkungen auf die Zelldichte zu haben. Derivate mit einer *pta*-Deletion zeigten in der stationären Phase eine frühere Lyse. Die Phosphotransacetylase beeinflusst offensichtlich das Lyseverhalten von *S. pneumoniae* R6 im C+Y-Medium.

Auch das exponentielle Wachstum einiger Stämme war verändert. So besitzen insbesondere die Stämme *S. pneumoniae* R6 *pta::cat*, *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB ackA::aphIII* und das R6-Derivat mit der Dreifachdeletion in *spxB*, *pta* und *ackA* eine längere Generationszeit.

Durch genetische Modifikationen des SpxB-Pta-AckA-Wegs erfolgt ein drastischer Eingriff in den zentralen Metabolismus von *S. pneumoniae*. Acetyl-CoA ist nicht nur Vorläufer von Acetylphosphat, sondern weiterer wichtiger Stoffwechselwege wie die Fettsäure-, Zellwand- und AS-Synthese (Wolfe, 2005). Die Rückgewinnung von CoenzymA und die ATP-Synthese sind ebenfalls betroffen. Letztere ist aufgrund des Fehlens eines TCA-Zyklus in *S. pneumoniae* besonders wichtig zur Energiegewinnung. In *E. coli* beispielsweise ist die Umwandlung von Acetyl-CoA in Acetat entscheidend für den Rückgewinn von CoA. Hohe Mengen von Acetyl-CoA inhibieren die Pyruvatkinase und die Pyruvatdehydrogenase, was sich auf das Wachstum auswirkt (McCleary & Stock, 1994). Durch die Inaktivierung von *pta*

4. Ergebnisse

erfolgt der Rückgewinn von CoA lediglich während der Umwandlung zu Ethanol durch die Alkoholdehydrogenase und während der Fettsäuresynthese (Carvalho *et al.*, 2011). Das veränderte Wachstumsverhalten von AcP-Derivaten ist daher nicht überraschend.

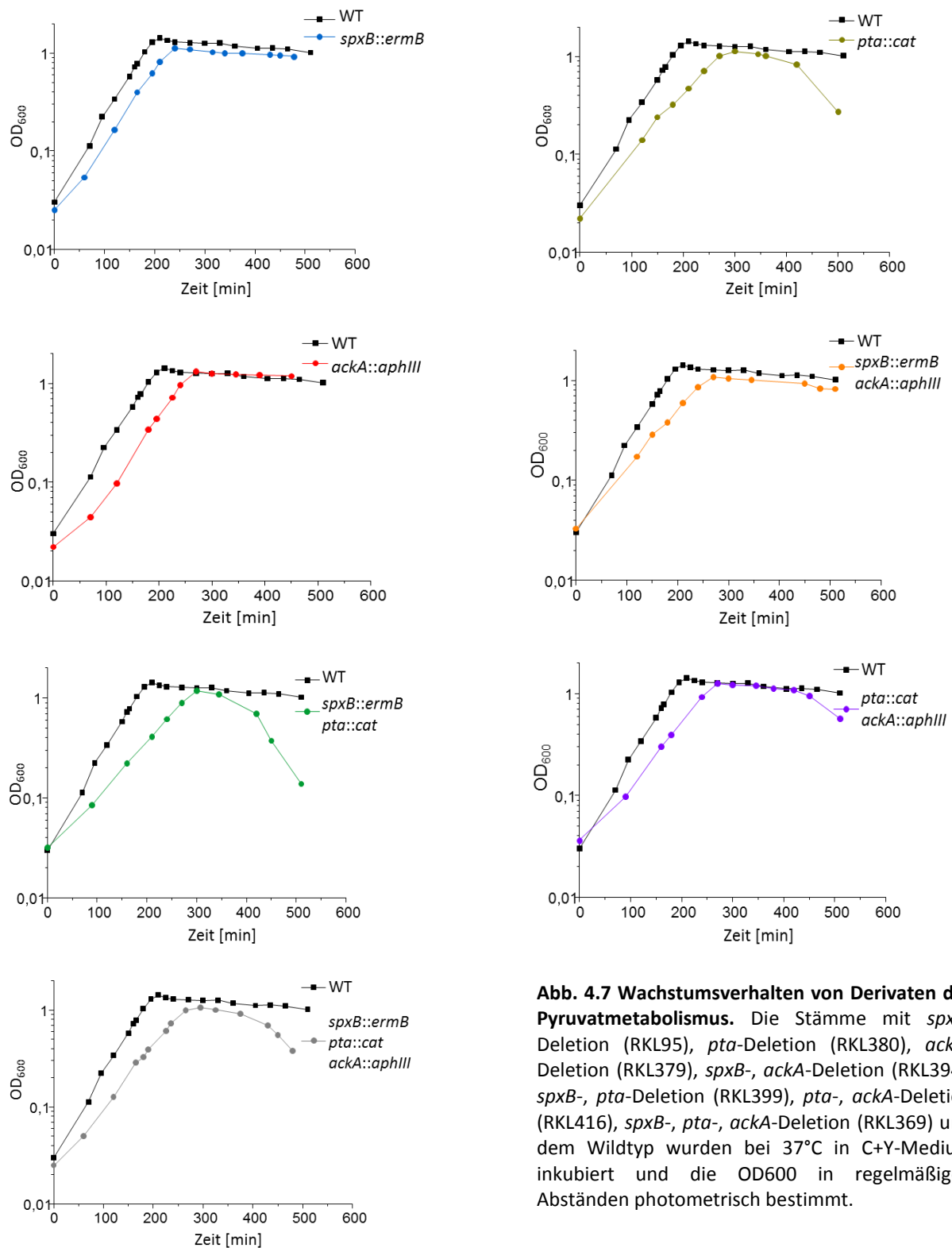


Abb. 4.7 Wachstumsverhalten von Derivaten des Pyruvatmetabolismus. Die Stämme mit *spxB*-Deletion (RKL95), *pta*-Deletion (RKL380), *ackA*-Deletion (RKL379), *spxB*-, *ackA*-Deletion (RKL394), *spxB*-, *pta*-Deletion (RKL399), *pta*-, *ackA*-Deletion (RKL416), *spxB*-, *pta*-, *ackA*-Deletion (RKL369) und dem Wildtyp wurden bei 37°C in C+Y-Medium inkubiert und die OD₆₀₀ in regelmäßigen Abständen photometrisch bestimmt.

4.2.1.2 Der Effekt des SpxB-Pta-AckA-Wegs auf die CiaH-abhängige CiaR-Aktivität

Die Derivate von *S. pneumoniae* R6 mit genetischen Manipulationen im Syntheseweg von Acetylphosphat wurden anschließend bzgl. ihrer CiaR-Aktivität hin untersucht. Dazu wurden die CiaR-regulierten Promotoren P_{htxA} , $P_{spr0931}$ und P_{ccnA} und der Kontrollpromotor P_{vegM} als Promotor-*lacZ*-Reporterfusionen über das Plasmid pPP2 (Halfmann *et al.*, 2007a) in das Genom der jeweiligen Stämme eingebracht und die Promotoraktivitäten über die Menge an exprimierter β -Galaktosidase durch β -Galaktosidaseassays bestimmt. Zur Darstellung der Reporterkonstrukte von *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII* und R6 *pta::cat ackA::aphIII* erfolgte aufgrund der vereinzelt Inhomogenität der Kolonien eines *ackA*-Deletionsstammes die Deletion von *ackA* im jeweils letzten Schritt der Stammkonstruktion.

Die Promotoraktivitäten der jeweiligen SpxB-Pta-AckA-Mutantenkombinationen sind im Vergleich zum R6-Wildtyp in Abb 4.8 und Tab. 4.4 dargestellt. Es fällt auf, dass diese sich in allen Deletionsderivaten im Vergleich zum Wildtyp nur marginal unterscheiden. Betrachtet man die durchschnittliche Änderung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität (Tab. 4.4), so fällt auf, dass diese in allen Mutantenkombinationen im Vergleich zum Wildtyp leicht ansteigt, den Faktor 1,5 im Mittel jedoch nicht übersteigt. Die höchste Abweichung zur Aktivität des SpxB-Pta-AckA-Wildtyps existiert in Stämmen mit Doppeldeletion von *spxB* und *pta*. Hier erreicht die CiaR-Aktivität fast das 1,5-fache des Wildtyps. Die Doppeldeletionen von *spxB* und *ackA* und von *pta* und *ackA* sowie die Einzeldelation von *pta* bewirken eine Erhöhung um den Faktor 1,3. Nahezu unverändert ist die CiaR-Aktivität im Stamm mit der Einzeldelation von *spxB* sowie mit der kompletten Inaktivierung des AcP-Syntheseweges. Eine Ausnahme findet sich in *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII*. Hier beträgt die durchschnittliche Promotoraktivität in etwa 90% des Wildtyps.

Wie im vorigen Kapitel beschrieben trat bei den R6-Derivaten mit der Einzeldelation von *ackA* und der Doppeldeletion von *pta* und *ackA* nach deren Wachstum auf Blutagar eine geringfügige Inhomogenität der Kolonien auf, da vereinzelt größere Kolonien entstanden. Daher wurden diese Reporterstämme nach den Aktivitätsmessungen, also nach dem Wachstum in C+Y-Medium erneut auf diese Inhomogenität hin überprüft. Zunächst wurden dazu diese Kulturen nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase auf Einzelkolonien auf Blutagar ausplattiert und in anaerober Atmosphäre inkubiert. Die Analyse der Größe der Einzelkolonien zeigte ein ähnliches Bild wie bereits bei der Darstellung von *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII*. Es traten Kolonien mit zwei unterschiedlichen Morphologien auf. Die Mehrzahl der Kolonien war normalgroß und entsprach der Kolonieform der Ausgangskultur. Die größeren Kolonien traten in einem geringen Prozentsatz auf, der im Mittel 8% an Gesamtkolonien entsprach. Die größeren Kolonien könnten eine veränderte CiaR-Aktivität aufweisen.

4. Ergebnisse

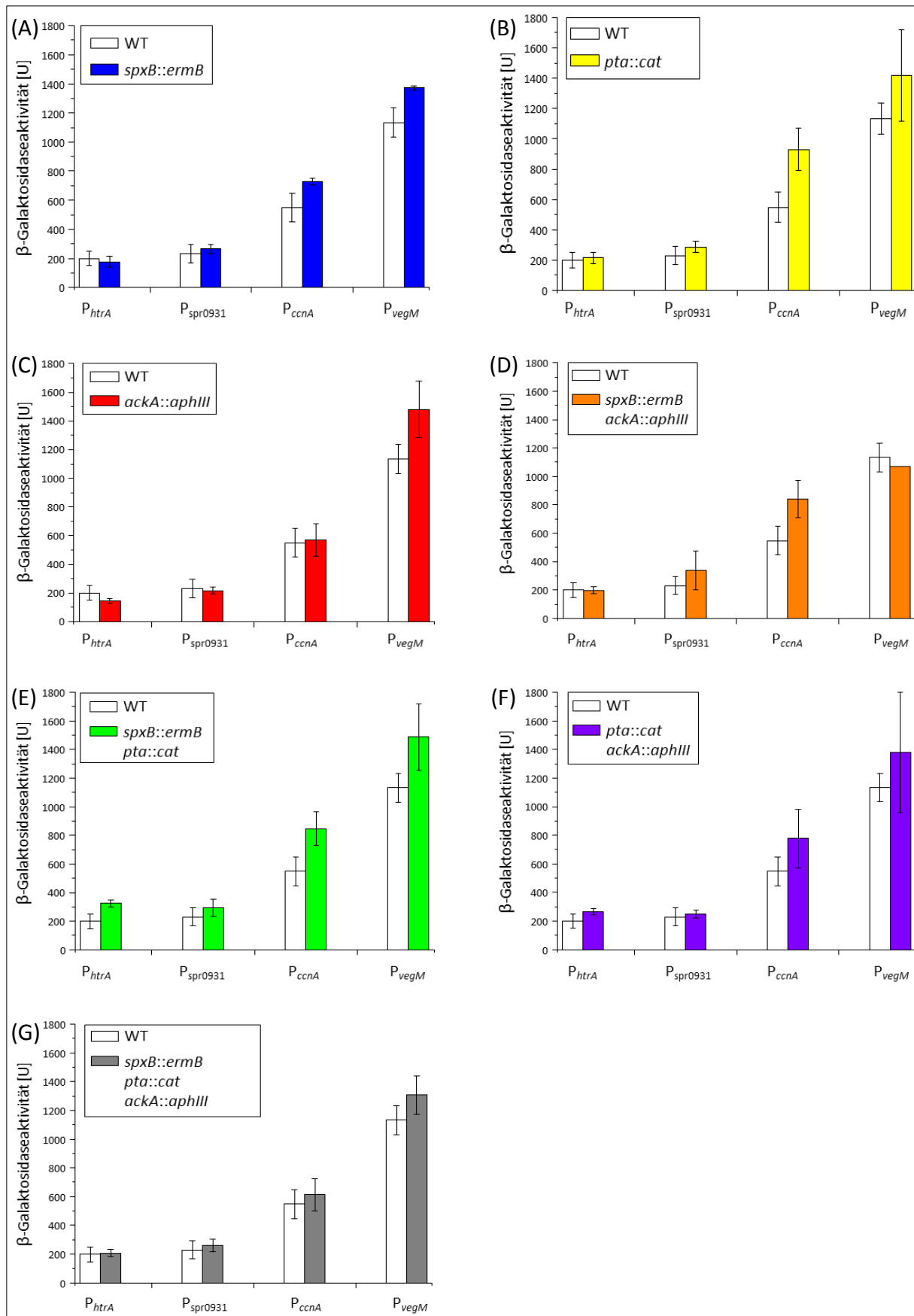


Abb. 4.8: CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 und dessen Derivate mit verändertem Pyruvatmetabolismus. Gezeigt ist der Vergleich der durch die CiaR-regulierten Promotoren P_{htrA} , $P_{spr0931}$, P_{ccnA} und durch den konstitutiv exprimierten Promotor P_{vegM} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 mit *S.*

4. Ergebnisse

S. pneumoniae R6 *spxB::ermB* (A), *S. pneumoniae* R6 *pta::cat* (B), *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII* (C) *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB ackA::aphIII* (D) *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB pta::cat* (E), *S. pneumoniae* R6 *pta::cat ackA::aphIII* (F) und *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII* (G). Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt (vgl. Tab. 4.8), die Standardabweichungen sind angegeben. Das Wachstum der Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8.

Tab. 4.4: CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 und dessen Derivate mit verändertem Pyruvatmetabolismus.

Stamm	Relevante Merkmale	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	AcP-Mutante / Wildtyp
RKL43		P _{htrA}	202 \pm 53 (14)	
RKL30		P _{spr0931}	230 \pm 62 (9)	
RKL20		P _{ccnA}	549 \pm 100 (4)	
RKL45		P _{vegM}	1134 \pm 101 (3)	
RKL98	<i>spxB</i> ⁻	P _{htrA}	177 \pm 37 (2)	0,87
RKL501		P _{spr0931}	264 \pm 31 (2)	1,15
RKL366		P _{ccnA}	729 \pm 21 (2)	1,33
RKL99		P _{vegM}	1372 \pm 13 (2)	1,21
				} $\emptyset=1,12$
RKL386	<i>pta</i> ⁻	P _{htrA}	216 \pm 37 (3)	1,07
RKL387		P _{spr0931}	286 \pm 36 (3)	1,24
RKL388		P _{ccnA}	931 \pm 139 (3)	1,7
RKL389		P _{vegM}	1419 \pm 301 (2)	1,25
				} $\emptyset=1,34$
RKL381	<i>ackA</i> ⁻	P _{htrA}	145 \pm 18 (2)	0,72
RKL382		P _{spr0931}	216 \pm 25(2)	0,94
RKL383		P _{ccnA}	570 \pm 113(3)	1,04
RKL384		P _{vegM}	1481 \pm 196 (2)	1,31
				} $\emptyset=0,9$
RKL406	<i>spxB</i> ⁻ <i>pta</i> ⁻	P _{htrA}	326 \pm 25 (4)	1,61
RKL407		P _{spr0931}	295 \pm 61 (4)	1,28
RKL408		P _{ccnA}	848 \pm 116(2)	1,54
RKL409		P _{vegM}	1488 \pm 232 (2)	1,31
				} $\emptyset=1,48$
RKL395	<i>spxB</i> ⁻ <i>ackA</i> ⁻	P _{htrA}	199 \pm 24 (2)	0,99
RKL396		P _{spr0931}	339 \pm 139 (2)	1,47
RKL397		P _{ccnA}	840 \pm 130 (2)	1,53
RKL398		P _{vegM}	1068 \pm 1 (2)	0,94
				} $\emptyset=1,33$
RKL417	<i>pta</i> ⁻ <i>ackA</i> ⁻	P _{htrA}	265 \pm 21 (2)	1,31
RKL418		P _{spr0931}	252 \pm 28 (2)	1,10
RKL419		P _{ccnA}	777 \pm 203 (2)	1,42
RKL420		P _{vegM}	1378 \pm 421 (2)	1,22
				} $\emptyset=1,28$
RKL370	<i>spxB</i> ⁻ <i>pta</i> ⁻ <i>ackA</i> ⁻	P _{htrA}	208 \pm 24 (3)	1,03
RKL377		P _{spr0931}	259 \pm 43 (4)	1,13
RKL371		P _{ccnA}	614 \pm 114 (2)	1,12
RKL372		P _{vegM}	1308 \pm 134 (2)	1,15
				} $\emptyset=1,09$

Gezeigt ist die durch die Promotoren P_{htrA}, P_{spr0931}, P_{ccnA}, P_{vegM} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8.

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben

Daher wurde in einem weiteren Experiment überprüft, ob die Koloniegröße einen Einfluss auf die *cia*-abhängige Promotoraktivität hat. Dazu wurden von *lacZ*-Reporterstämmen von *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII* mit den Promotoren P_{htrA} , $P_{spr0931}$ und P_{ccnA} nach Anzucht in C+Y-Medium jeweils drei Einzelkolonien beider Koloniegrößen und des jeweiligen Reporterkonstruktes isoliert. In diesen Einzelkolonien wurde die *cia*-abhängige Promotoraktivität untersucht und miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass in den größeren Kolonien die Promotoraktivität leicht erhöht ist. Sie entspricht in etwa dem 1,5-fachen der Aktivität der gewöhnlichen Kultur von *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII* (P_{htrA} : 1,5x, $P_{spr0931}$: 1,6x, P_{ccnA} : 1,4x). Die Größenveränderung hat also direkt oder indirekt auch einen geringen Einfluss auf die CiaR-Aktivität. Inwieweit diese Aktivitätsänderung die Aktivität der Gesamtkultur beeinflusst, lässt sich nicht abschließend klären.

Allerdings treten die Kolonien mit veränderter Größe nur in derart geringem Prozentsatz auf und die CiaR-Aktivität in den veränderten Kolonien ist im Vergleich zu jener in der Gesamtkultur lediglich leicht erhöht. Daher ist diese Beobachtung für die Betrachtung des Effekts von AcP für die CiaH-abhängige CiaR-Aktivität nicht essentiell. Die Daten für die Reporterkonstrukte von *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII* und *S. pneumoniae* R6 *pta::cat ackA::aphIII* können daher als zuverlässig betrachtet werden.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die genetischen Veränderungen im AcP-Syntheseweg in Anwesenheit der Sensorkinase CiaH keinen großen Effekt auf die Aktivität von CiaR haben. In den meisten Mutantenkombinationen kommt es zu einer leichten Aktivitätserhöhung. Sollten die genetischen Veränderungen des AcP-Syntheseweges tatsächlich zu zellulären Mengenänderungen führen, wirken sich diese in Anwesenheit von CiaH nicht großartig auf die CiaR-Aktivität aus. Hierbei würde durch CiaH ein konstantes Aktivitätsniveau von CiaR aufrechterhalten werden. Dies zeigt erneut die Bifunktionalität von CiaH.

4.2.2 Der Einfluss des SpxB-Pta-AckA-Weges auf die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität

Bifunktionelle Sensorkinasen sind in der Lage, die Einflüsse von Acetylphosphat auf ihre korrespondierenden Response Regulatoren durch veränderte Kinase- oder Phosphataseaktivitäten zu kompensieren. In Anwesenheit von CiaH haben genetische Änderungen im AcP-Syntheseweg keine deutliche Änderung der CiaR-Aktivität zur Folge. Dies sind Hinweise darauf, dass dies auch für das TCS CiaRH gilt.

Um den Einfluss von Acetylphosphat auf die CiaR-Aktivität *in vivo* überprüfen zu können, müssen die Untersuchungen zu den CiaR-abhängigen Promotoraktivitäten in Stämmen mit inaktiverter CiaH durchgeführt werden, so dass CiaH als Phosphatquelle für CiaR wegfällt und die Aktivität von CiaR unabhängig von CiaH untersucht werden kann. Daher sollten die Deletionskonstrukte von *spxB*, *pta* und *ackA* in den genetischen Hintergrund von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* eingebracht werden, und zwar einzeln und in Kombination, analog zu jenen im Wildtyphintergrund.

4.2.2.1. Darstellung und Charakterisierung von Derivaten des SpxB-Pta-AckA-Weges in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*

Die Deletion von *spxB* in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* führte zu Kolonien, die auf Blutagar morphologisch den *spxB*-Mutanten des *ciaRH*-wt-Hintergrunds ähneln. Auch bezüglich des Wachstums in C+Y-Medium traten keine Unterschiede zu *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB* auf. Kolonien von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 pta::cat* waren von nahezu gleicher Größe wie *S. pneumoniae* R6 *pta::cat*. Dieser Stamm zeigte ein leicht verzögertes, exponentielles Wachstum und eine verzögerte Autolyse als das Derivat mit derselben Deletion im *ciaRH*-wt-Hintergrund. Kolonien mit der Doppeldeletion von *spxB* und *pta* im genetischen Hintergrund der *ciaH*-Deletion ähnelten morphologisch dem *spxB*-Derivat und im Wachstumsverhalten dem *pta*-Derivat. Die Darstellung eines Stammes mit gleichzeitiger Inaktivierung von *ciaH* und *ackA* führte zu einer Überraschung. Hierbei erfolgte die Transformation des *ackA*-Deletionskonstrukt in den Stamm mit inaktiverter CiaH. Die Transformanten wurden analog zu den Experimenten im *ciaRH*-wt-Hintergrund unter anaeroben Bedingungen auf Kanamycin-enthaltendem Blutagar inkubiert. Es traten in der Vielzahl winzige, kaum sichtbare Kolonien auf. Vereinzelt traten größere und schleimige Kolonien auf. Diese leichte Heterogenität der Kolonien wurde bereits bei der Darstellung von *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII* beobachtet. Eine Vermehrung einzelner, winziger Kolonien durch großflächiges Überimpfen auf frischen Blutagar war jedoch nicht möglich. Keine der überstrichenen winzigen Kolonie zeigte ein Wachstum. Wurden mehrere der winzigen Kolonien gleichzeitig großflächig

überimpft, trat nach der Inkubation eine Verfärbung des Blutagars auf, die die Zelllyse dieser Kolonien anzeigt. Da im ersten Schritt der Stammherstellung Kanamycin-resistente Kolonien auftraten, findet die Integration des *ackA*-Deletionskonstruktes offensichtlich statt. Die Kolonien sind jedoch nicht lebensfähig, was durch die sehr geringe Koloniegröße angedeutet wird und durch das ausbleibende Wachstum nach dem Überimpfen auf frischen Blutagar bestätigt wird. Es wurde vermutet, dass die Zelllyse durch eine schädliche Menge an von der Pyruvatoxidase gebildetem H_2O_2 hervorgerufen werden könnte. Daher sollte durch Zugabe von 5000 U/ml Katalase in den Blutagar versucht werden normalgroße Kolonien zu erhalten und die Zelllyse nach dem Überstreichen zu verhindern. Diese Katalase-Konzentration entsprach der Menge, die in Experimenten mit *S. pneumoniae* D39 die H_2O_2 -Konzentration auf ein nicht messbares Niveau senkte (Bättig & Mühlemann, 2008). Allerdings lysierten die Kolonien hierbei ebenfalls. Der Zelltod von *S. pneumoniae* mit Doppeldeletion von *ciaH* und *ackA* scheint daher unabhängig von der Menge an produziertem H_2O_2 zu sein. Diese Beobachtung wurde auch beim Versuch der Inaktivierung von *ackA* im R6-Derivat mit Deletion von *ciaH* und *pta* gemacht.

Die Darstellung der Mutantenkombination aus *spxB*-, *ackA*- und *ciaH*-Deletion war wiederum möglich. Bezüglich der Koloniemorphologie und des Wachstumsverhaltens entsprach dieser Stamm seinem Analogen mit *ciaRH*-wt. Der Stamm mit der kompletten Deletion des AcP-Syntheseweges im genetischen Hintergrund der *ciaH*-Deletion glich morphologisch dem Derivat im Hintergrund des Wildtyps. Wie sein Derivat mit *ciaRH*-wt zeigte er verlangsamtes, exponentielles Wachstum und erreichte, wie es für die Derivate mit einer *spxB*-Deletion typisch ist, die stationäre Phase bei einer OD_{600} von in etwa 1.

Ingesamt sind damit zwei Mutantenkombinationen im Hintergrund der *ciaH*-Deletion nicht verfügbar und fehlen damit für die Aktivitätsuntersuchungen von CiaR.

4.2.2.2 Die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität in Mutanten des SpxB-Pta-AckA-Weges

Die Untersuchung der Aktivität von CiaR in Derivaten von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* mit den jeweiligen Gendeletionen im Acetylphosphat-Syntheseweg erfolgte über die Bestimmung der Promotoraktivität der CiaR-regulierten Promotoren P_{htrA} , $P_{spr0931}$ und P_{ccnA} . Dazu wurden diese als Promotor-*lacZ*-Reporterfusionen über das Plasmid pPP2 (Halfmann *et al.*, 2007a) in das Genom der jeweiligen Stämme eingebracht. Diese Promotoren stehen stellvertretend für das gesamte *cia*-Regulon, da ihre Aktivität stark von einem funktionellen Response Regulator CiaR abhängt (Halfmann *et al.*, 2007b). Die Promotoraktivität wurde über die Menge an exprimierter β -Galaktosidase durch β -Galaktosidaseassays bestimmt. Zur Kontrolle wurde zusätzlich die Aktivität des nicht regulierten, konstitutiv exprimierten Promotors P_{vegM} bestimmt (Halfmann *et al.*, 2007a).

Die Ergebnisse der β -Galaktosidaseassays sind in Tab. 4.5 und Abb. 4.9 dargestellt. Gezeigt ist jeweils der Vergleich der Promotoraktivitäten in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* mit dem jeweiligen Derivat mit Modifikationen im AcP-Syntheseweg. Zusätzlich sind in Tab. 4.5 die durchschnittlichen Änderungen der CiaR-Aktivitäten des jeweiligen Derivats im Vergleich zum Stamm mit intaktem AcP-Syntheseweg als Mittel der drei Aktivitäten der CiaR-abhängigen Promotoren P_{htrA} , $P_{spr0931}$ und P_{ccnA} angegeben.

Im Gegensatz zu den CiaR-abhängigen Promotoraktivitäten im genetischen Hintergrund von *ciaRH*-wt, traten in Abwesenheit von CiaH tatsächlich Unterschiede der CiaR-Aktivität in den jeweiligen Stämmen auf. Die Inaktivierung von *spxB* führte zur Abnahme der Promotoraktivität von $P_{spr0931}$ und P_{ccnA} auf die Hälfte, wobei sie bei P_{htrA} auf 70% abnimmt (Abb.4.9.A). Insgesamt beträgt die CiaR-Aktivität hier 60%. Durch die gleichzeitige Inaktivierung von CiaH und der Pyruvatoxidase konnte somit zum ersten Mal eine deutliche Aktivitätsabnahme von CiaR beobachtet werden, wenn der AcP-Syntheseweg genetisch modifiziert wird. Dies stellt den ersten Hinweis auf die Rolle von Acetylphosphat *in vivo* dar. Wie in der Einleitung beschrieben ist die Pyruvatoxidase in Pneumokokken für den Großteil der AcP-Produktion verantwortlich. Die Aktivitätsabnahme von CiaR ist demnach dadurch erklärbar, dass weniger zelluläres AcP als Phosphodonor zur Verfügung steht. Auf der Genetik dieses R6-Derivates basierend wird Acetylphosphat jedoch weiterhin durch Pta und AckA gebildet und offensichtlich von CiaR genutzt.

In dem R6-Derivat mit Inaktivierung von *ciaH*, *spxB* und *pta* nimmt die CiaR-Aktivität sogar auf insgesamt 38% von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* ab (Abb. 4.9.D). Durch die zusätzliche Deletion von *pta* kann Pyruvat weder über *spxB*, noch über den Acetyl-CoA-Weg in Acetylphosphat umgewandelt werden. Die vermutlich weitere Abnahme der AcP-Menge in diesem Derivat führt daher auch zur geringeren CiaR-Aktivität. Durch die komplette Deletion des AcP-Syntheseweges nimmt die CiaR-Aktivität sogar auf durchschnittlich 14% ab (Abb. 4.9.E). Genetisch gesehen wird in diesem Derivat

4. Ergebnisse

kein Acetylphosphat synthetisiert. Dies zeigt sich auch eindeutig in der niedrigen CiaR-abhängigen Promotoraktivität.

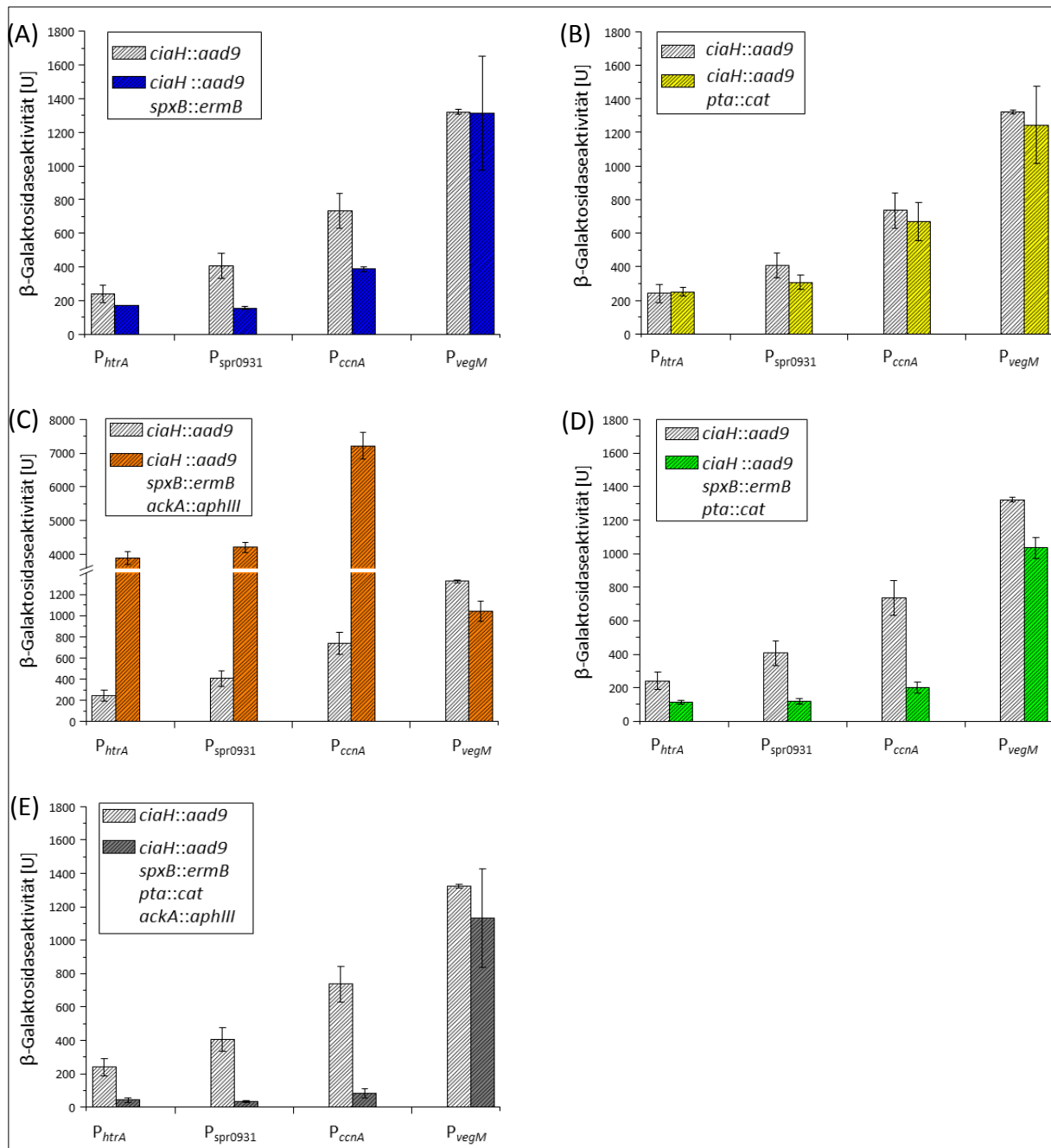


Abb. 4.9: CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* und dessen Derivate mit verändertem Pyruvatmetabolismus. Gezeigt ist der Vergleich der durch die *cia* regulierten Promotoren P_{htrA} , $P_{spr0931}$, P_{ccnA} und durch den konstitutiv exprimierten Promotor P_{vegM} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* mit *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* Δ *spxB* (A), *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* Δ *pta* (B), *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* Δ *spxB* Δ *ackA* (C) *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* Δ *spxB* Δ *pta* (D) und *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* Δ *spxB* Δ *pta* Δ *ackA* (E). Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt (vgl. Tab. 4.5), die Standardabweichungen sind angegeben. Das Wachstum der Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,8.

Tab. 4.5: CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* und dessen Derivate mit verändertem Pyruvatmetabolismus.

Stamm	Relevante Merkmale	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	<i>ciaH</i> ⁻ , AcP-Mutante / <i>ciaH</i> ⁻ , AcP-Wildtyp
RKL86	<i>ciaH</i> ⁻	<i>P_{htrA}</i>	240 \pm 52 (4)	
RKL81		<i>P_{spr0931}</i>	303 \pm 65 (7)	
RKL74		<i>P_{ccnA}</i>	736 \pm 105 (3)	
RKL87		<i>P_{vegM}</i>	1322 \pm 12 (2)	
RKL102	<i>ciaH</i> ⁻ <i>spxB</i> ⁻	<i>P_{htrA}</i>	172 \pm 1 (2)	0,72
RKL502		<i>P_{spr0931}</i>	157 \pm 8(2)	0,52
RKL367		<i>P_{ccnA}</i>	387 \pm 12 (2)	0,53
RKL368		<i>P_{vegM}</i>	1314 \pm 339 (2)	0,99
				$\emptyset = 0,59$
RKL390	<i>ciaH</i> ⁻ <i>pta</i> ⁻	<i>P_{htrA}</i>	251 \pm 28 (2)	1,05
RKL391		<i>P_{spr0931}</i>	308 \pm 43 (2)	1,01
RKL392		<i>P_{ccnA}</i>	671 \pm 113 (2)	0,91
RKL393		<i>P_{vegM}</i>	1244 \pm 229 (2)	0,94
				$\emptyset = 0,99$
RKL412	<i>ciaH</i> ⁻ <i>spxB</i> ⁻ <i>pta</i> ⁻	<i>P_{htrA}</i>	112 \pm 10 (6)	0,47
RKL413		<i>P_{spr0931}</i>	118 \pm 15 (5)	0,39
RKL414		<i>P_{ccnA}</i>	199 \pm 35 (3)	0,27
RKL415		<i>P_{vegM}</i>	1035 \pm 63 (4)	0,78
				$\emptyset = 0,38$
RKL402	<i>ciaH</i> ⁻ <i>spxB</i> ⁻ <i>ackA</i> ⁻	<i>P_{htrA}</i>	3893 \pm 189 (2)	16,2
RKL403		<i>P_{spr0931}</i>	4210 \pm 153 (3)	13,9
RKL404		<i>P_{ccnA}</i>	7211 \pm 393 (3)	9,8
RKL405		<i>P_{vegM}</i>	1043 \pm 97 (3)	0,79
				$\emptyset = 13,3$
RKL374	<i>ciaH</i> ⁻ <i>spxB</i> ⁻ <i>ackA</i> ⁻ <i>pta</i> ⁻	<i>P_{htrA}</i>	44 \pm 13 (4)	0,18
RKL378		<i>P_{spr0931}</i>	33 \pm 6 (4)	0,11
RKL375		<i>P_{ccnA}</i>	85 \pm 28 (3)	0,12
RKL376		<i>P_{vegM}</i>	1131 \pm 296 (2)	0,86
				$\emptyset = 0,14$

Gezeigt ist die durch die Promotoren *P_{htrA}*, *P_{spr0931}*, *P_{ccnA}*, *P_{vegM}* vermittelte β -Galaktosidaseaktivität.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8.

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

Die durchschnittliche Änderung der Promotoraktivität im Vergleich zu R6 Δ *ciaH* ist jeweils als Mittel der CiaR-regulierten Promotoren angegeben.

Während die Inaktivierung von *pta* zusammen mit *spxB* in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* die CiaR-Aktivität im Vergleich zum Stamm mit einzelner *spxB*-Deletion zusätzlich herabsetzt, führt die einzelne *pta*-Deletion im Hintergrund der *ciaH*-Deletion nicht zu einer Änderung der CiaR-Aktivität (Abb. 4.9.B). Die Aktivität von *P_{ccnA}* entspricht zwar dem 0,9-fachen, jedoch zeigen *P_{htrA}* und *P_{spr0931}* keine Aktivitätsänderung im Vergleich zum *ciaH*-Deletionsderivat. Die Inaktivierung der Phosphotransacetylase wirkt sich demnach nur dann negativ auf die CiaR-Aktivität aus, wenn sie zusammen mit *SpxB* in der Zelle fehlt.

Eine Überraschung zeigte sich im Stamm mit Inaktivierung von *ciaH*, *spxB* und *ackA*. Hier nimmt die CiaR-regulierte Promotoraktivität um das 10- bis 16-fache zu. Eine solch hohe Aktivität wird sonst durch die *ciaH*-Allele *ciaH306* und *ciaH202* vermittelt (Müller *et al.*, 2011). Hierbei handelt es sich um zwei Laborallele, die im Vergleich zu den übrigen Allelen eine mittelstarke Aktivitätserhöhung von CiaR bewirken. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch ohne *ciaH*-Allele bzw. unabhängig von CiaH durch genetische Modifikation des AcP-Syntheseweges eine solch starke Aktivitätserhöhung von CiaR ausgelöst werden kann.

Somit kam es in drei von fünf verfügbaren Derivaten zur Aktivitätsabnahme, in einem Derivat zur Zunahme und in einem Derivat blieb die CiaR-Aktivität unverändert. Diese *in vivo* Experimente unterstützen die Vermutung, dass Acetylphosphat als Phosphatquelle für CiaR agieren kann, wenn die korrespondierende Sensor kinase CiaH fehlt. Ist CiaH funktionell, führen Gendelektionen des AcP-Weges und damit vermutlich verursachte Schwankungen im AcP-Spiegel nicht zu einer effektiven Aktivitätsänderung von CiaR. Allerdings wird hierbei ein weiterer Aspekt zur Steuerung der CiaR-Aktivität deutlich, nämlich die Rolle von CiaH. Durch die genetischen Modifikationen wurden Bedingungen erzeugt, in denen CiaH entweder mit Erhöhung der Kinaseaktivität oder durch verstärkte Phosphataseaktivität den Aktivierungsstatus von CiaR auf einem konstanten Niveau hält (vgl. Abb. 4.8). Durch Inaktivierung des kompletten AcP-Syntheseweges kommt es beispielsweise zum Aktivitätsabfall, wenn CiaH fehlt, jedoch nicht in ihrer Anwesenheit. CiaH reagiert in diesem Fall mit verstärkter Kinaseaktivität. Umgekehrt steigt in Abwesenheit von CiaH durch die gemeinsame Deletion von *spxB* und *ackA* die Aktivität enorm an. Ist CiaH funktionell, agiert sie unter diesen Bedingungen als starke Phosphatase. Diese Daten bestätigen erneut eindeutig die Bifunktionalität von CiaH.

4.2.3 Die Rolle des SpxB-Pta-AckA-Weges in Abhängigkeit der Wachstumsphase

Die Aktivität der CiaR-abhängigen Promotoren wurde in dieser Arbeit bisher nur zu einem Zeitpunkt betrachtet. Die Aktivitätsunterschiede im genetischen Hintergrund der *ciaH*-Deletion waren zu diesem Zeitpunkt klar erkennbar. Allerdings zeigen diese Experimente nicht die Aktivität der verwendeten R6-Derivate während des gesamten Wachstums auf. Bekanntlich ändert sich die Expression CiaR-abhängiger Gene in Abhängigkeit der Wachstumsphase (Halfmann *et al.*, 2011). In *S. pneumoniae* R6 kommt es während des Wachstums in C+Y-Medium beim Erreichen der stationären Phase zur Aktivitätserhöhung. In Abwesenheit von CiaH ist sie während des exponentiellen Wachstums höher als im Wildtyp, jedoch bleibt der Aktivitätsanstieg nach Erreichen der stationären Wachstumsphase aus. Daher wurden die Promotoraktivitäten in allen SpxB-Pta-AckA-Derivaten zu mehreren Zeitpunkten des Wachstums in C+Y-Medium untersucht, jeweils im genetischen Hintergrund von *ciaRH*-wt und der *ciaH*-Deletion. Hierbei wurde die erste Messung bei einer OD_{600} von 0,4 durchgeführt. Die zweite Messung erfolgte bei OD_{600} von 0,8. Die beiden nächsten Messungen erfolgten im Abstand von 30 min, die letzte Messung im Abstand von 45 min. Exemplarisch und zur besseren Übersicht sind hier die Aktivitäten von P_{htrA} dargestellt. Die beiden anderen CiaR-regulierten Promotoren $P_{spr0931}$ und P_{ccnA} verhielten sich tendenziell wie P_{htrA} . Die Daten können dem Anhang entnommen werden. Die Ergebnisse der β -Galaktosidaseaktivitäten sind in Abb. 4.10 und Abb. 4.11 dargestellt.

In Anwesenheit von CiaH verhalten sich die Promotoraktivitäten in allen SpxB-Pta-AckA-Mutanten während des Wachstums ähnlich. Die Aktivitätsstärken unterscheiden sich nahezu nicht vom Wildtyp. Wie bereits in Kapitel 4.2.1.2 beschrieben, schwanken die Promotoraktivitäten bei einer OD_{600} von 0,8 (entspricht hier Messpunkt 2) um das Niveau des R6-Wildtyps. Dies trifft auch auf die übrigen Messpunkte zu. Auch der Aktivitätsanstieg beim Erreichen der stationären Wachstumsphase tritt in allen Stämmen auf. Vereinzelt sind jedoch kleine Unterschiede erkennbar. So bleibt überraschend im Stamm mit der *spxB*-Deletion die Induktion der Aktivität von P_{htrA} beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase aus, so dass in der stationären Phase P_{htrA} lediglich $\frac{2}{3}$ seiner Aktivität besitzt. Allerdings stellt dies eher einen Sonderfall dar, da die Expressionszunahmen bei den Promotoren $P_{spr0931}$ und P_{ccnA} wiederum auftreten. Diese Promotoren verhalten sich jedoch beim ersten Messpunkt zu P_{htrA} unterschiedlich. Hier tritt eine erhöhte Expression um den Faktor 1,5 bzw. 2 auf.

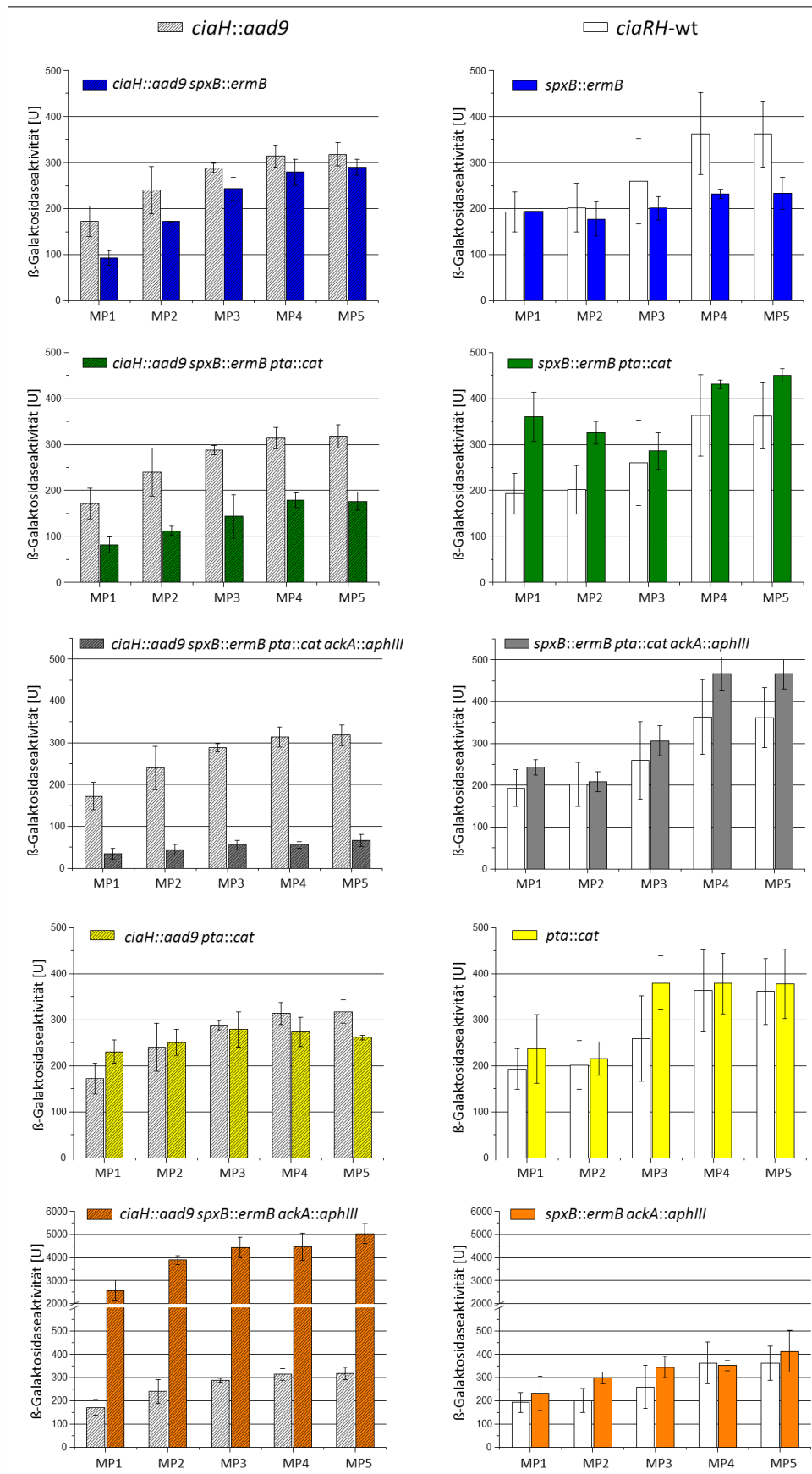


Abb. 4.10: CiaR-Aktivität in Abhängigkeit der Wachstumsphase von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* und Derivaten mit modifiziertem Pyruvatmetabolismus. Auf der linken Seite befinden sich die Promotoraktivitäten im genetischen Hintergrund der *ciaH*-Deletion, rechts im Hintergrund von *ciaRH*-wt.

Fortsetzung Abb. 4.10: Es ist jeweils der Vergleich der Stämme mit intaktem SpxB-Pta-AckA-Weg und der jeweilige Mutante dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte der β -Galaktosidaseaktivitäten von P_{htrA} aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Das Wachstum der Stämme erfolgte in C+Y-Medium. Die erste Messung wurde bei einer OD600 von 0,4 durchgeführt (MP1), die zweite Messung bei einer OD600 von 0,8 (MP2). Die dritte (MP3) und vierte Messung (MP4) erfolgten 30 min nach MP2 bzw. MP3. Die letzte Messung (MP5) erfolgte 45 min nach MP4. Die Zahlenwerte können dem Anhang entnommen werden.

Dies ist ein Phänomen, welches auch in anderen AcP-Mutanten vereinzelt vorkommt, wie im Stamm mit der Doppeldeletion von *spxB* und *pta* sowie im Stamm mit der Doppeldeletion von *pta* und *ackA*. Hier ist die Expression des *cia*-Systems bereits während des exponentiellen Wachstums auf hohem Niveau, nimmt gegen Ende des exponentiellen Wachstums leicht ab und steigt beim Übergang zum stationären Wachstum wiederum an. In diesen Fällen ist daher der Expressionsanstieg beim Übergang in das stationäre Wachstum weniger stark ausgeprägt.

Insgesamt gesehen hält CiaH trotz genetischen Manipulationen an der Acetylphosphatsynthese die Expression des *cia*-Systems während des gesamten Wachstums aufrecht und auf konstantem Niveau, so dass keine starken Abweichungen zu den Wildtypbedingungen vorkommen.

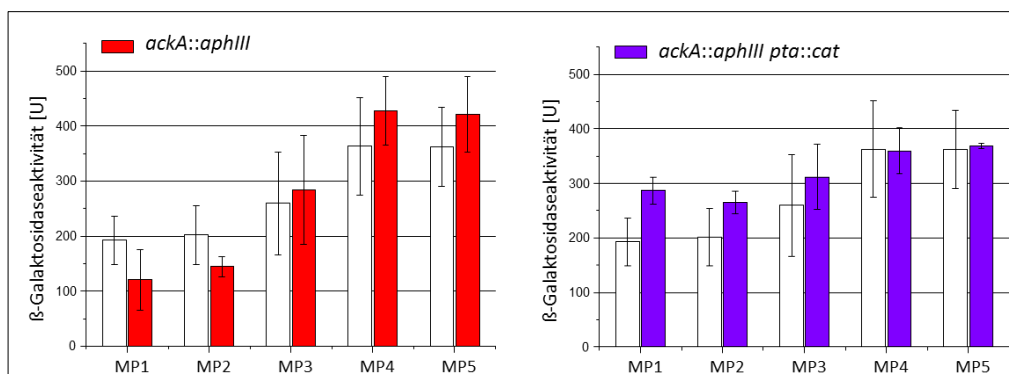


Abb. 4.11: CiaR-Aktivität in Abhängigkeit der Wachstumsphase in *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII* und *S. pneumoniae* R6 *pta::cat ackA::aphIII*. Gezeigt sind die Mittelwerte der β -Galaktosidaseaktivitäten von P_{htrA} aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Es ist jeweils der Vergleich der Stämme mit intaktem SpxB-Pta-AckA-Weg und der jeweilige Mutante dargestellt. Das Wachstum der Stämme erfolgte in C+Y-Medium. Die erste Messung wurde bei einer OD600 von 0,4 durchgeführt (MP1), die zweite Messung bei einer OD600 von 0,8 (MP2). Die dritte (MP3) und vierte Messung (MP4) erfolgten 30 min nach MP2 bzw. MP3. Die letzte Messung (MP5) erfolgte 45 min nach MP4. Die Zahlenwerte können dem Anhang entnommen werden.

In Abwesenheit von CiaH treten die zuvor beschriebenen Expressionsunterschiede auf, wenn der SpxB-Pta-AckA-Weg genetisch modifiziert wird. Diese Änderungen treten stets während des gesamten Wachstums auf (Abb. 4.10.A). In Abhängigkeit von der Wachstumsphase differenzieren

sich jedoch die Expressionsunterschiede in einigen Mutanten. In der *spxB*-Deletionsmutante fällt auf, dass die Expression von P_{htrA} im exponentiellen Wachstum im Vergleich zum *spxB*⁺-Stamm niedriger ist als im stationären Wachstum. So fällt die Aktivität bei OD_{600} von 0,4 auf etwa die Hälfte ab, beträgt während der stationären Wachstumsphase allerdings 85-90% und erreicht damit fast die Aktivität des Stammes mit intakter SpxB und inaktivierter CiaH. Die Promotoren $P_{spr0931}$ und P_{ccnA} erreichen bei einer OD_{600} von 0,4 nur 1/3 der Aktivität der *ciaH*-Deletion und in der stationären Wachstumsphase lediglich 2/3 der Aktivität von *ciaH*-Deletion. Hier sind die Aktivitätsunterschiede zum Stamm mit intakter Pyruvatoxidase in der stationären Phase noch deutlicher als bei P_{htrA} . Die Promotoren verhalten jedoch tendenziell gleich. Allerdings wirkt sich die *spxB*-Deletion in der exponentiellen Phase deutlich negativer auf die CiaR-Aktivität aus als im stationären Wachstum. Durch die Deletion von *pta* treten bei einer OD_{600} von 0,8 keine Expressionsunterschiede auf, allerdings ist während des Wachstums ein veränderter Aktivitätsverlauf zu erkennen. So ist bei OD_{600} von 0,4 die Aktivität zum Stamm mit intakter Pta im genetischen Hintergrund der *ciaH*-Deletion leicht erhöht. Im stationären Wachstum fällt sie auf 85% ab. Auffallend ist hierbei, dass während des Wachstums beider Stämme die Aktivitätsunterschiede zum *ciaH*-Deletionsstamm umgekehrt zueinander verlaufen. Während es durch die *spxB*-Deletion mit zunehmender Wachstumsdichte zur Zunahme kommt, kommt es durch die *pta*-Deletion zur stetigen Abnahme. Durch die Doppeldeletion von *spxB* und *pta* heben sich die in den Einzeldelationen beobachteten Aktivitätsunterschiede über das Wachstum hinweg gegenseitig auf. Die Aktivitätsunterschiede zwischen dem Stamm mit intaktem SpxB-Pta-AckA-Weg und dem Stamm mit Deletionen von *spxB* und *pta* bleiben während des gesamten Wachstums nahezu auf konstantem Niveau. Dies trifft auch auf den Stamm mit komplett inaktiviertem AcP-Syntheseweg zu. Zudem ist im Stamm mit der Deletion von *spxB* und *ackA* eine konstant bleibende Expressionsanstieg des *cia*-Systems über das gesamte Wachstum sichtbar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Abwesenheit von CiaH die unterschiedlichen CiaR-Aktivitäten in den SpxB-Pta-AckA-Mutanten bis auf geringe Abweichungen wachstumsphasenunabhängig sind, so dass sich an den Daten von OD_{600} von 0,8 orientiert werden kann.

4.2.4 Die Rolle von Acetylphosphat

Durch genetische Modifikationen des AcP-Syntheseweges werden Änderungen in der CiaH-unabhängigen CiaR-Aktivität hervorgerufen. Ob diese Expressionsänderungen tatsächlich auf veränderte Mengen von Acetylphosphat zurückzuführen sind und ob diese mit den Expressionsdaten übereinstimmen, wird im Folgenden überprüft. Dazu wurden in den jeweiligen Mutanten mit genetischen Veränderungen des SpxB-Pta-AckA-Weges und dem R6-Wildtyp die Mengen an in den Zellen gebildetem Acetylphosphat bestimmt und miteinander verglichen.

Die Bestimmung der zellulären AcP-Mengen erfolgte durch eine indirekte Methode, in der das in den Zellen gebildete Acetylphosphat, nach vorangegangenem Entfernen des zellulären ATPs durch Aktivkohlebehandlung, in einer enzymatischen Acetatkinasereaktion wiederum in ATP umgewandelt wurde. Die ATP-Menge wurde über Biolumineszenzmessung ermittelt und gab somit die Menge an intrazellulärem Acetylphosphat an, die auf die Gesamtmenge an Protein bezogen wurde (siehe Kapitel 3.16).

Zunächst wurde jedoch die Überprüfung der Rolle des *ciaRH*-Systems auf die Acetylphosphatproduktion in *S. pneumoniae* R6 durchgeführt. Dies erfolgte, da der AcP-Syntheseweg sowohl im genetischen Hintergrund des *ciaRH*-Wildtyps und der *ciaH*-Deletion modifiziert wurde. Es sollte geklärt werden, ob Veränderungen an *ciaRH* selbst zur Synthese verschiedener AcP-Mengen führt. Sollte dies nicht der Fall sein, so können die AcP-Messungen der jeweiligen SpxB-Pta-AckA-Mutanten unabhängig vom genetischen Hintergrund des *ciaRH*-Systems betrachtet werden. Zur Untersuchung der Rolle des *cia*-Systems wurde in vier Stämmen mit unterschiedlicher Genetik von *ciaR* und *ciaH* die AcP-Menge bestimmt. Die Mengenbestimmung erfolgte im R6-Wildtyp und in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*, da die AcP-Mutanten in beiden genetischen Hintergründen dargestellt und dort die CiaR-Aktivität bestimmt wurden. Des Weiteren wurde mit *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* ein Stamm mit inaktiven *cia*-System und mit *S. pneumoniae* R6 *ciaH306* ein Stamm mit hyperaktivem *cia*-System verwendet, so dass auch die Rolle der Expression des *cia*-Systems überprüft werden kann. Die Ergebnisse dieser Acetylphosphatbestimmungen sind in Abb. 4.12 und Tab. 4.6 dargestellt.

Es fällt auf, dass es zur Abnahme der AcP-Menge auf 75% bzw. 84% der Konzentration im *ciaRH*-Wildtyp kommt, wenn *ciaH* oder *ciaR* deletiert sind. Zudem ist eine marginale Zunahme der AcP-Menge im Stamm mit hyperaktivem *cia*-System erkennbar. Aufgrund der hohen Standardabweichungen können diese Unterschiede jedoch nicht als signifikant angenommen werden. Zudem wurden solch geringe Differenzen in verschiedenen, unabhängigen Experimenten allein mit dem *S. pneumoniae* R6-Wildtyp erhalten. Aufgrund der hohen Instabilität von

Acetylphosphat können solche Schwankungen in unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten durchaus vorkommen. Des Weiteren wird deutlich, dass die Expressionsstärke des *cia*-Systems trotz des leichten Anstiegs der AcP-Konzentration in *S. pneumoniae* R6 *ciaH306* keine Auswirkungen auf die AcP-Produktion hat. Denn in *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9*, in dem keine *cia*-Expression stattfindet, und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* mit im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöhter *cia*-Expression (Halfmann *et al.*, 2011) sind die AcP-Mengen auf gleichem Niveau. Aufgrund dessen sind die AcP-Mengen, die in den Mutanten des SpxB-Pta-AckA-Synthesewegs existieren, unabhängig vom genetischen Hintergrund des *cia*-Systems miteinander vergleichbar. Daher wurden die Acetylphosphatbestimmungen in den R6-Derivaten mit modifiziertem AcP-Syntheseweg lediglich im genetischen Hintergrund des *ciaRH*-Wildtyps durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.13 und Tabelle 4.7 dargestellt.

Tab. 4.6: Der Einfluss von CiaRH auf die Acetylphosphatproduktion

<i>S. pneumoniae</i> R6-Derivat	Acetylphosphatkonz. [$\mu\text{mol} / \text{mg Protein}$] \pm Standardabweichung	<i>ciaRH</i> -Mutante / <i>ciaRH</i> -wt
R6 (<i>ciaRH</i> -wt)	232 \pm 77 (7)	
R6 <i>ciaH::aad9</i>	176 \pm 82 (3)	0,76
R6 <i>ciaR::aad9</i>	195 \pm 56 (3)	0,84
R6 <i>ciaH306</i> (RKL168)	358 \pm 104 (3)	1,54

Gezeigt sind die Acetylphosphatmengen in *S. pneumoniae* R6 und Derivaten mit verändertem CiaRH-System. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4. Die Mengen an AcP wurden in $\mu\text{mol} / \text{mg}$ Gesamtprotein von Zellen einer 10 ml Kultur bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

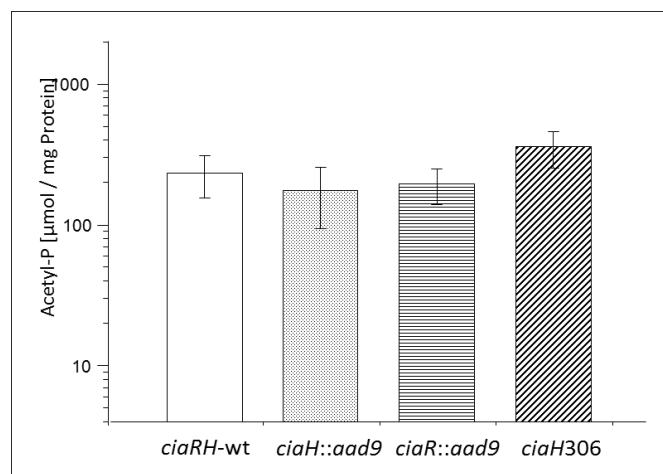


Abb. 4.12: Acetylphosphatmengen in *S. pneumoniae* R6 und Derivaten mit verändertem *ciaRH*-System. Gezeigt sind die AcP-Mengen von *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9*, *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH306* nach Wachstum in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4. Das Wachstum erfolgte in einer 10 ml Kultur. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Acetylphosphatmenge ist definiert als $\mu\text{mol} / \text{mg}$ Gesamtprotein.

Tab. 4.7: Die Auswirkungen genetischer Manipulationen im Pyruvatmetabolismus auf die Acetylphosphatproduktion

Stamm		Acetylphosphatkonz. [$\mu\text{mol} / \text{mg Protein}$] \pm Standardabweichung	Mutante / Wildtyp
R6 (<i>spxB-pta-ackA-wt</i>)		232 \pm 77 (7)	
R6 <i>spxB::ermB</i>	(RKL95)	8,6 \pm 2 (3)	0,037
R6 <i>pta::cat</i>	(RKL380)	301 \pm 206 (4)	1,3
R6 <i>ackA::aphIII</i>	(RKL379)	1774 \pm 126 (3)	7,7
R6 <i>spxB::ermB pta::cat</i>	(RKL399)	7 \pm 2 (3)	0,030
R6 <i>spxB::ermB ackA::aphIII</i>	(RKL394)	125 \pm 17 (3)	0,54
R6 <i>pta::cat ackA::aphIII</i>	(RKL416)	1423 \pm 458 (3)	6,1
R6 <i>spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII</i>	(RKL369)	5,8 \pm 1 (4)	0,025

Gezeigt sind Acetylphosphatmengen in *S. pneumoniae* R6 und Derivaten des SpxB-Pta-AckA-Syntheseweges. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,4. Die Mengen an AcP wurden in $\mu\text{mol} / \text{mg}$ Gesamtprotein von Zellen einer 10 ml Kultur bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

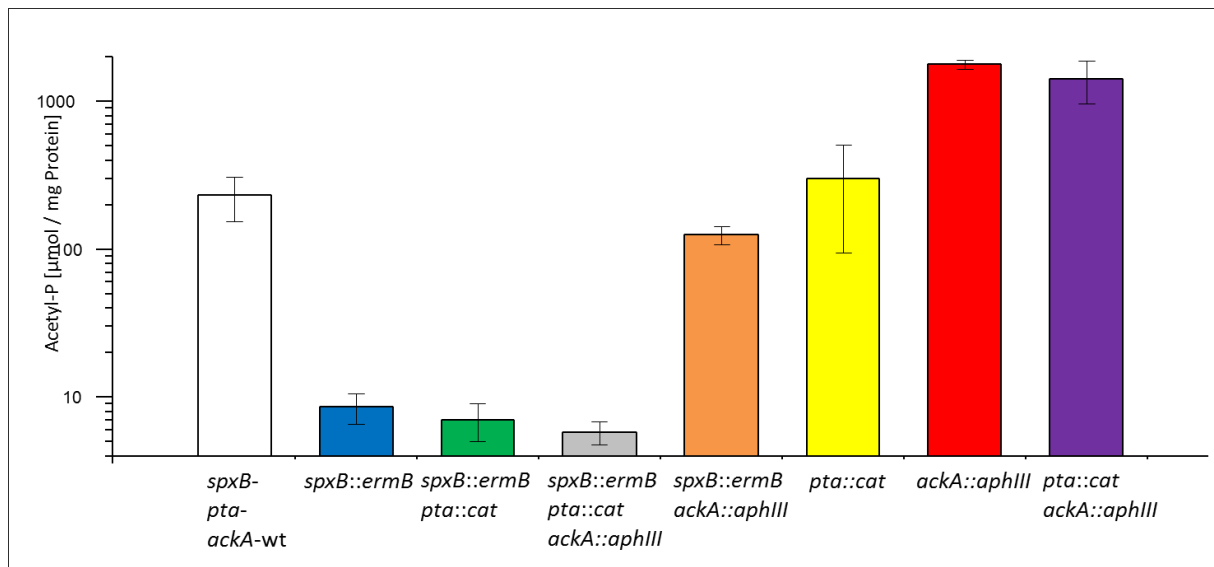


Abb. 4.13: Die Auswirkungen genetischer Manipulationen im Pyruvatmetabolismus auf die Acetylphosphatproduktion. Gezeigt sind die AcP-Mengen des R6-Wildtyps, R6 *spxB::ermB* (RKL95), R6 *spxB::ermB pta::cat* (RKL399), *spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII* (RKL369), R6 *spxB::ermB ackA::aphIII* (RKL394), R6 *pta::cat* (RKL380), R6 *ackA::aphIII* (RKL379) und R6 *pta::cat ackA::aphIII* (RKL416) (v.l.n.r.). Die Acetylphosphatmenge ist definiert als $\mu\text{mol} / \text{mg}$ Gesamtprotein. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,4. Die Mengen an AcP wurden in $\mu\text{mol} / \text{mg}$ Gesamtprotein von Zellen einer 10 ml Kultur bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

In drei der sieben dargestellten Mutanten-Kombinationen ist die AcP-Menge drastisch verringert (Abb. 4.13, Tab. 4.7). Hierbei handelt es sich um drei Mutanten, in denen die Pyruvatoxidase inaktiviert ist. Bereits die Deletion von *spxB* alleine führt zu einem drastischen Abfall der zellulären AcP-Menge auf etwa 4 % des Wildtyps. Die Deletion von *spxB* und *pta* verringert die AcP-Menge auf etwa 3% der des Wildtyps, die komplette Inaktivierung des SpxB-Pta-AckA-Weges führt zu einer AcP-

Menge von lediglich 2,5 %. Allerdings sind die Unterschiede zwischen den drei Derivaten nicht signifikant ($p \geq 0,2$). Die Pyruvatoxidase produziert offensichtlich den Hauptanteil an Acetylphosphat in *S. pneumoniae* R6. Im Stamm mit der Doppeldeletion von *spxB* und *ackA* kommt es ebenfalls zur Verringerung der AcP-Menge. Diese beträgt hier in etwa die Hälfte der Menge des Wildtyps und fällt damit viel weniger drastisch aus als in den drei erstgenannten Stämmen. In zwei Fällen ist die zelluläre AcP-Menge im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In den Stämmen *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII* und R6 *pta::cat ackA::aphIII* liegt die 6- bis 8-fache Menge an Acetylphosphat vor. Die Einzeldelation von *pta* wirkt sich nahezu nicht auf die AcP-Produktion aus. In diesem Stamm war zwar eine leichte Zunahme der AcP-Menge erkennbar, dennoch liegt diese, auch aufgrund der hohen Standardabweichung, im Bereich der Mengen des R6-Wildtyps und wird daher als unverändert angesehen.

Insgesamt gesehen sind die Auswirkungen einer *pta*-Deletion je nach genetischem Hintergrund verschieden. Die *pta*-Einzeldelation bewirkt keine Veränderung der AcP-Menge. Im Stamm mit der Doppeldeletion von *pta* und *spxB* sowie dem Stamm mit der Doppeldeletion von *pta* und *ackA* sind die AcP-Mengen von denen des jeweiligen Vorläuferstammes mit intakter Pta, *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB* bzw. *S. pneumoniae ackA::aphIII*, auch nur minimal verändert. Wird *pta* jedoch im genetischen Hintergrund der Doppeldeletion von *spxB* und *ackA* deletiert, kommt es zur drastischen Reduktion der AcP-Konzentration. Offensichtlich trägt Pta nur dann effizient zur Acetylphosphatsynthese bei, wenn SpxB und AckA nicht funktionell sind. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Pta eine Gleichgewichtsreaktion katalysiert und in diesem Stamm aufgrund der fehlenden Pyruvatoxidase das einzige AcP-produzierende Enzym ist. In den meisten genetischen Hintergründen hat die *pta*-Deletion jedoch keine Auswirkung auf die AcP-Menge.

Die Inaktivierung der Acetatkinase führt mit einer Ausnahme in jedem genetischen Hintergrund zur Akkumulation von Acetylphosphat. In *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB ackA::aphIII* kommt es im Vergleich zum Stamm mit der *spxB*-Einzeldelation zur Akkumulation von Acetylphosphat. In *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB* beträgt die AcP-Menge etwa 7% jener im Stamm mit Doppeldeletion von *spxB* und *ackA*. Im Stamm, der die Doppeldeletion von *pta* und *ackA* besitzt, ist die Inaktivierung von AckA für die Akkumulation von AcP verantwortlich. Denn eine ähnlich hohe Konzentration liegt auch in *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII* vor. Damit es durch die Inaktivierung von *ackA* zur Akkumulation von AcP kommt, muss dazu allerdings entweder SpxB oder Pta funktionell sein. Denn im Derivat mit der Doppeldeletion von *spxB* und *pta* bewirkt die anschließende Inaktivierung von *ackA* keine Zunahme von AcP. Hier fehlen beide Enzyme, die im Pyruvatmetabolismus das in der Glykolyse entstehende Pyruvat in Acetylphosphat umwandeln. Des Weiteren scheint die in klassischem C+Y-Medium vorhandene Menge an 12,5 mmol/l Acetat nicht auszureichen um die Reaktion der

Acetatkinase in Richtung des Acetylphosphats zu verschieben. Demnach handelt es sich bei AckA eher um eine ATP-bildende Acetatsynthase.

Die AcP-Konzentration, die im Derivat mit Doppeldeletion von *spxB* und *ackA* vorliegt, ist auch durch die beidseitigen Effekte der einzelnen *spxB*- und *ackA*-Deletion erklärbar. In diesem Stamm beträgt die AcP-Menge etwa 7% des Stammes mit der Einzeldelation von *ackA*. Dies zeigt die durch die *spxB*-Deletion verursachte Reduktion von zellulärem Acetylphosphat. Weiterhin akkumuliert Acetylphosphat im Vergleich zum Stamm mit *spxB*-Einzeldelation, denn hier beträgt die AcP-Menge 7% des Stammes der *spxB*-, *ackA*-Doppeldeletion. Für *S. pneumoniae* R6 kann daher festgelegt werden, dass die Inaktivierung der Acetatkinase zum Akkumulieren, die Inaktivierung der Pyruvatoxidase zur Reduktion von Acetylphosphat führt.

Die CiaH-unabhängige Expression des *cia*-Systems lässt sich durch verschiedene, genetische Deletionen des SpxB-Pta-AckA-Weges ändern. In den Stämmen mit diesen Deletionen werden je nach Kombinationen der Gendeletionen stark variierende Mengen zelluläres Acetylphosphat gebildet. Durch den Vergleich der CiaR-Aktivitäten mit der AcP-Konzentration im jeweiligen AcP-Derivat können Rückschlüsse auf die Rolle von Acetylphosphat als Phosphodonor gezogen werden.

In den drei Derivaten, in denen die AcP-Menge drastisch reduziert ist, ist die CiaR-Aktivität verringert. Im Gegensatz zu den AcP-Mengen, die in allen drei Stämmen auf nahezu dem gleichniedrigen Niveau liegen, existieren jedoch Unterschiede in den CiaR-Aktivitäten. Hier erfolgt die Reduktion der Expression stufenweise (Abb. 4.9). So wurde beispielsweise durch die *spxB*-Deletion die AcP-Menge auf 4% reduziert. Jedoch beträgt die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität noch 60% von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*. Auch im *ciaH*-Deletionsderivat mit komplett inaktiviertem AcP-Syntheseweg nimmt die CiaR-Aktivität nicht exakt auf das niedrige Niveau der AcP-Menge ab. Dennoch ist die Tendenz eindeutig, dass durch die starke Verringerung der AcP-Menge eine Abnahme der CiaH-unabhängigen CiaR-Aktivität stattfindet. Im Stamm mit *pta*-Deletion ist die AcP-Menge im Vergleich zum Stamm mit aktiver Pta unverändert. Zudem hat sie bei fehlender CiaH keine Auswirkung auf die CiaR-Aktivität. Beide Daten korrelieren miteinander. Eine Überraschung zeigte sich bei der Doppeldeletion von *spxB* und *ackA*. Obwohl die AcP-Menge auf die Hälfte derer des Wildtyps abnimmt, kommt es zu einer drastischen Zunahme der CiaH-unabhängigen *cia*-Expression. Dies stellt den einzigen Fall dar, in dem die Änderung der AcP-Konzentration nicht mit der veränderten CiaR-Aktivität korreliert. Zu den AcP-Bestimmungen in den Stämmen mit *ackA*-Einzeldelation und *pta*-, *ackA*-Doppeldeletion waren aufgrund nicht gelungener Darstellung der Stämme im genetischen Hintergrund der *ciaH*-Deletion keine Aktivitätsmessungen durchführbar. Auffallend ist, dass es sich um die Derivate handelt, in denen es zur Akkumulation von Acetylphosphat kommt.

4. Ergebnisse

Insgesamt gesehen ist somit ein direkter Effekt von Acetylphosphat auf CiaR sichtbar. Nimmt die AcP-Menge drastisch ab, so hat dies negative Auswirkungen auf die CiaH-abhängige CiaR-Aktivität. Die extreme Aktivitätszunahme von CiaR im Stamm mit den Deletionen von *ciaH*, *spxB* und *ackA* können nicht abschließend geklärt werden. Jedenfalls werden sie nicht durch Acetylphosphat alleine verursacht. Trotz dieser Tatsache deuten die Ergebnisse stark daraufhin, dass Acetylphosphat als Phosphodonor für CiaR *in vivo* agiert, wenn CiaH fehlt.

4.2.5 Versuche zur Doppeldeletion von *ciaH* und *ackA* in *S. pneumoniae* R6

Aufgrund der nicht gelungenen Darstellung von *ciaH*-Derivaten, in denen es zur Akkumulation von Acetylphosphat kommt, konnte mit den bisherigen Experimenten nur der Effekt der Reduktion zellulären Acetylphosphats auf die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität beobachtet werden. Um die Rolle von Acetylphosphat eingehender untersuchen zu können, wäre die Verfügbarkeit solcher Stämme sehr wichtig, da somit der Effekt einer erhöhten AcP-Konzentration auf die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität überprüft werden könnte. Daher wurde sich detaillierter mit der Kombination der Doppeldeletion von *ackA* und *ciaH* befasst. Wie in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben wurde, konnten keine Hinweise auf eine Rolle der durch die Pyruvatoxidase produzierten Menge an H₂O₂ für den Zelltod erhaltener Transformanten von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 ackA::aphIII* identifiziert werden. Eine weitere Ursache könnte von Acetylphosphat herrühren. Da Acetylphosphat als Phosphodonor für CiaR agieren kann, ist in diesem genetischen Hintergrund eine äußerst starke Hyperaktivierung von CiaR vorstellbar, die aufgrund einer funktionellen Pyruvatoxidase sogar die starke Aktivierung im Stamm mit Deletionen von *ciaH*, *spxB* und *ackA* übersteigen sollte (vgl. Abb. 4.9). Die synthetische Lethalität von Kolonien eines Stammes mit *ciaH*- und *ackA*-Deletion könnte daher auf CiaR zurückzuführen sein und im Stress eines zu stark exprimierten *cia*-Regulons liegen. So könnte die starke Expression eines oder mehrerer Genprodukte des Regulons ein solches Problem darstellen, das zum Zelltod führt. Die Inaktivierung von *ackA* im genetischen Hintergrund einer *ciaR*-Deletion war möglich und zeigte ein ähnliches Bild wie im *ciaRH*-wt-Hintergrund. Daher könnte es möglich sein, durch das Inaktivieren eines oder mehrerer Gene des *cia*-Regulons in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* einen Stamm herzustellen, in dem die anschließende *ackA*-Deletion stabil ist. Innerhalb des *cia*-Regulons existieren zwei Gengruppen, die an der Ausbildung einiger Phänotypen beteiligt sind, die durch das *cia*-System verursacht werden. Hierbei handelt es sich um die Gengruppe der kleinen nicht kodierenden *cia*-regulierten RNAs (csRNA1-5) und das für die Serinprotease HtrA kodierende Gen *htrA*. Daher wurden diese als erste Kandidaten für die Ursache der Lyse von Kolonien mit *ciaH*- und *ackA*-Deletion angesehen.

Aufgrund dessen wurde ein Stamm mit Deletionen der Gene *ccnA-E* und des Sensorkinase-Gens *ciaH* konstruiert (RKL502). Dazu wurde in den Stamm RKL229, in dem die Gene der csRNAs durch Anwendung der Cheshire-Kassette (Weng *et al.*, 2009) Resistenzmarker-frei deletiert wurden, das *ciaH*-Deletionskonstrukt eingebracht. Anschließend erfolgte die Transformation des *ackA*-Deletionskonstruktes. Nach der Inkubation der Transformanten in anaerober Atmosphäre trat keine Verbesserung des Koloniebildes auf Blutagar auf. Daher ist die Überexpression der csRNAs offenbar nicht die Ursache für die Lyse von Kolonien des Stammes *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 ackA::aphIII*.

Nach der Transformation des *ackA*-Deletionskonstruktes in einen Stamm mit *ciaH*- und *htrA*-Deletion traten nach Inkubation der Transformanten in anaerober Atmosphäre auf Blutagar homogene Kolonien auf, die nach Überstreichen auf frischen Blutagar sowie in C+Y-Medium wuchsen. Somit war es im genetischen Hintergrund der *htrA*-Deletion möglich, die Kombination von *ciaH*- und *ackA*-Inaktivierung herzustellen und lebensfähige R6-Derivate zu erhalten. Dadurch war es möglich, die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität unter Bedingungen akkumulierender AcP-Mengen zu überprüfen. Zur Untersuchung dessen wurden die CiaR-regulierten Promotoren P_{htrA} , $P_{spr0931}$ und P_{ccnA} , sowie der nicht regulierte, konstitutiv exprimierte Promotor P_{vegM} als Promotor-*lacZ*-Reporterfusionen über das Plasmid pPP2 (Halfmann *et al.*, 2007a) in das Genom des Stammes mit *ciaH*-, *htrA*-Doppeldelation eingebracht und anschließend *ackA* inaktiviert. Die Promotoraktivität wurde über die Menge an exprimierter β -Galaktosidase durch β -Galaktosidaseassays bestimmt. Die Ergebnisse der β -Galaktosidaseassays sind in Abb. 4.15 und Tab 4.8 dargestellt. Zum Vergleich ist zusätzlich die CiaR-Aktivität im Stamm mit *ciaH*-Deletion und im Stamm mit *ciaH*-, *spxB*-, und *ackA*-Deletion dargestellt.

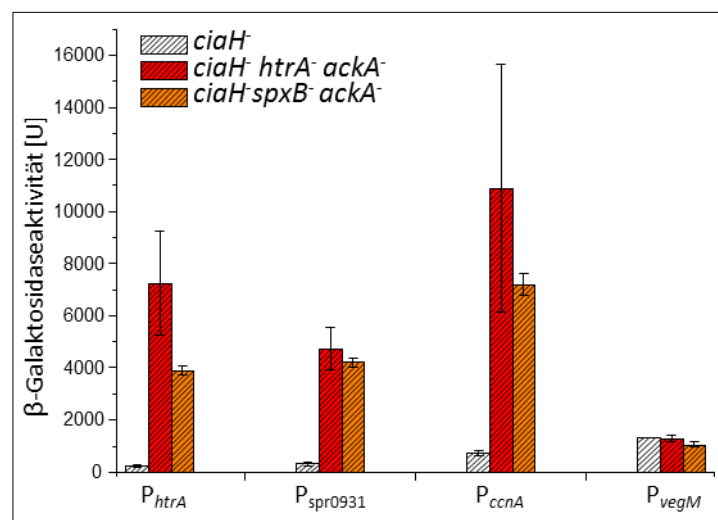


Abb. 4.15: CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 htrA::lox72 ackA::aphIII* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB ackA::aphIII*. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Das Wachstum der Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,8.

Die *cia*-abhängige Promotoraktivität steigt massiv an. Die Promotoren $P_{spr0931}$ und P_{ccnA} weisen einen ca. 15-fachen Aktivitätsanstieg auf, P_{htrA} zeigt sogar eine 30-fache Steigerung auf. Im Durchschnitt ist die CiaR-Aktivität um das 20-fache erhöht. Dies übersteigt sogar jene im Stamm mit *ciaH*-, *spxB*- und *ackA*-Deletion und ist den Erwartungen entsprechend. Es zeigt wiederum, dass Acetylphosphat von

4. Ergebnisse

CiaR als Phosphodonor verwendet wird. Allerdings weisen die β -Galaktosidaseaktivitäten extrem hohe Standardabweichungen auf, was ein Hinweis auf eine Instabilität des Stammes sein könnte.

Tab. 4.8: CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 htrA::lox72 ackA::aphIII* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB ackA::aphIII*

Stamm	Relevante Merkmale	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	Mutante / <i>spxB-pta-ackA-wt</i>
RKL86	<i>ciaH</i>	P_{htrA}	240 \pm 52 (4)	
RKL81		$P_{spr0931}$	303 \pm 65 (7)	
RKL74		P_{ccnA}	736 \pm 105 (3)	
RKL87		P_{vegM}	1322 \pm 12 (2)	
RKL427	<i>ciaH</i> ⁻ <i>htrA</i> ⁻ <i>ackA</i> ⁻	P_{htrA}	7245 \pm 1984 (3)	30,2
RKL428		$P_{spr0931}$	4720 \pm 818 (3)	15,6
RKL429		P_{ccnA}	10895 \pm 4743 (3)	14,8
RKL430		P_{vegM}	1292 \pm 107 (3)	1,0
				} $\bar{\varnothing} = 20,2$
RKL402	<i>ciaH</i> ⁻ <i>spxB</i> ⁻ <i>ackA</i> ⁻	P_{htrA}	3893 \pm 189 (2)	16,2
RKL403		$P_{spr0931}$	4210 \pm 153 (3)	13,9
RKL404		P_{ccnA}	7211 \pm 393 (3)	9,8
RKL405		P_{vegM}	1043 \pm 97 (3)	0,79
				} $\bar{\varnothing} = 13,3$

Gezeigt sind die durch die Promotoren P_{htrA} , $P_{spr0931}$, P_{ccnA} , P_{vegM} vermittelte β -Galaktosidaseaktivitäten. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben

Daher wurde in einem weiteren Experiment, analog zu den Untersuchungen mit *S. pneumoniae* R6 *ackA::aphIII*, nach der Durchführung des β -Galaktosidaseassays die in C+Y-Medium kultivierten Reporterstämme mit *ciaH*⁻, *htrA*⁻, *ackA*-Deletionen auf Einzelkolonien auf Blutagar plattiert und in anaerober Atmosphäre inkubiert. Es traten Kolonien mit zwei verschiedenen Morphologien auf; größere Kolonien, die einem Stamm mit *spxB*-Deletion ähnelten, und normalgroße Kolonien, die dem Wildtyp glichen. Diese lagen im Mittel im Verhältnis 4:1 auf den größeren Kolonien vor.

Des Weiteren wurde exemplarisch in jeweils zwei Kolonien beider Größen die CiaR-Aktivität untersucht. So wurde in den normalgroßen Kolonien keinerlei CiaR-abhängige Promotoraktivität gemessen. Die CiaR-Aktivitäten in den größeren Kolonien waren zwar im Vergleich zum Wildtyp noch erhöht, lagen jedoch niedriger als jene im Stamm mit *ciaH*⁻, *spxB*⁻, *ackA*-Deletionen. Dieses Ergebnis deutet auf die Entstehung von Suppressormutationen und auf eine komplette Instabilität dieses Stammes hin. Da die Kolonienmorphologie der großen Kolonien denen eines Stammes mit inaktiviertem *spxB* ähnelten und zudem Suppressormutationen in *spxB* und dessen Regulatorgen *spxR* in D39-Stämmen mit inaktivierter Acetatkinase auftauchen können (Ramos-Montanez *et al.*, 2010), waren dies Hinweise auf Veränderungen in diesen beiden Genen. Da die Aktivität des *cia*-

Regulons im Vergleich zum Vorläuferstamm abnimmt, sind auch Mutationen in *ciaR* denkbar, die die Struktur und Funktion von CiaR beeinflussen. Da in den normalgroßen Kolonien die *cia*-Promotoren keinerlei Aktivität mehr aufwiesen, könnten dort Mutationen in *ciaR* aufgetreten sein, die eine Funktionsuntüchtigkeit des Proteins bewirken. Daher wurden die DNA-Sequenzen von *spxB* und dessen Regulatorgen *spxR* sowie von *ciaR* in diesen Kolonien sequenziert. Die Überprüfung der DNA-Sequenzen zeigte in den normalgroßen Kolonien Mutationen in *ciaR*. So trat in einer Kolonie in Codon 165 eine Transition von C zu T auf, die eine Nonsense Mutation in CiaR verursacht, wodurch ein verkürztes CiaR ohne DNA-Bindestelle entsteht. Des Weiteren trat in der anderen Kolonie eine *in frame*-Deletion der Codons 50 bis 54 auf, so dass der Sequenzabschnitt im Bereich um den für die CiaR-Phosphorylierung essentiellen Aspartatrest (Asp51) fehlt. Daher ist nachvollziehbar, dass keine *cia*-abhängige Promotoraktivität stattfindet. Funktionell essentielle Regionen von CiaR fehlen. Veränderungen in *spxB* sowie *spxR* traten nicht auf, was eine plausible Erklärung für normalgroße Koloniemorphologie ist. In beiden größeren Kolonien hingegen blieb *ciaR* unverändert. Hier traten stattdessen genetische Veränderungen in *spxB* auf. Es kam in einem Fall in Codon 447 zu einer Transition von G zu A, was eine Missense-Mutation von Cystein zu Tyrosin bewirkte, sowie im anderen Fall zu einer Transversion von G zu T in Codon 90, so dass eine Missense Mutation von Aspartat zu Tyrosin entstand. Diese Veränderungen von *spxB* in *S. pneumoniae* wurden bisher nicht von Ramos-Montanez *et al.* (2010) beschrieben, jedoch handelt es sich hier vermutlich um Mutationen, die zur Reduktion der SpxB-Aktivität führen. Somit bewirkt die Deletion von *htrA* zwar, dass ein Stamm mit *ciaH*- und *ackA*-Deletion auf Blutagar lebensfähig ist. Allerdings treten unerwünschte Ereignisse während des Wachstums in C+Y-Medium auf, die zur Instabilität führen.

4.2.6 Der Einfluss der C-Quelle auf die CiaR-Aktivität

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung des Einflusses von Acetylphosphat auf die Aktivität von Response Regulatoren kann durch Aktivitätsuntersuchungen in Medien mit unterschiedlichen C-Quellen erfolgen. Nach Studien mit *E. coli* zu Folge ändert sich die zellulär gebildete Acetylphosphatmenge dramatisch in Abhängigkeit von der C-Quelle des Wachstumsmediums. Durch Variieren der Zuckerquelle in einem definierten Medium unter phosphatlimitierenden Bedingungen wurden sehr niedrige AcP-Mengen unter Wachstum mit Glycerin, Fructose und Fumarat (<40-50 μM), moderate Mengen mit Glucose (300 μM) sowie hohe Mengen mit Pyruvat und Glucoronat (1,2-1,5 mM) beobachtet (McCleary *et al.*, 1993; McCleary & Stock, 1994). Allerdings ist die Beziehung zwischen der AcP-Menge und der verwendeten C-Quelle offenbar sehr komplex. Eine Beziehung zum Redoxstatus des Zuckers konnte beispielweise nicht gezogen werden (Keating *et al.*, 2008). Auffällig war allerdings in diesen Studien, dass unter diesen Bedingungen die Mengen an exkretiertem Acetat mit denen des Acetylphosphats korrelierten. Daher wurde angenommen, dass beide Substanzen über die Acetatkinasereaktion im chemischen Gleichgewicht stehen (McCleary & Stock, 1994). Diese Beobachtung stellt einen guten Ansatzpunkt dar. Pneumokokken sind in der Lage in Abhängigkeit von der C-Quelle zwischen homo- und heterofermentativem Metabolismus umzuschalten (Carvalho *et al.*, 2011; Yesilkaya *et al.*, 2009). So wird im Wachstum mit Glucose als C-Quelle Lactat als Hauptendprodukt des homofermentativen Stoffwechsels gebildet. Mit Galactose als C-Quelle verschiebt sich der Stoffwechsel in Richtung heterofermentativ, wodurch die Endprodukte Lactat, Format, Acetat und Ethanol entstehen (Carvalho *et al.*, 2011). Da durch Galactose mehr Acetat gebildet wird, könnte auch mehr Acetylphosphat als Zwischenprodukt entstehen, da beide Mengen nach Untersuchungen in *E. coli* im Gleichgewicht stehen. Durch Variieren der Zuckerquelle sollte das Gleichgewicht zwischen homo- und heterofermentativem Metabolismus verschiebbar sein, wodurch unterschiedliche Mengen des Endproduktes Acetat und des Zwischenproduktes Acetylphosphat gebildet werden.

Daher wurden modifizierte C+Y-Medien mit verschiedenen C-Quellen hergestellt werden und die Aktivität *cia*-abhängiger Promotoren sowohl im R6 Wildtyp als auch im Stamm mit inaktiverter Sensorkinase CiaH untersucht werden.

Das klassische C+Y-Medium enthält die Zucker Glucose in einer Konzentration von 0,16% und Saccharose in einer Konzentration von 0,02%. Beide sind in der Komponente Supplement enthalten (Tab. 3.13). Das Supplement wurde so verändert, dass nur eine Zuckerquelle enthalten war. Dabei wurde die jeweilige Menge Glucose durch andere Zucker und die zu vernachlässigende Menge an Saccharose durch $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ersetzt (Kapitel 3.4.2). Als Zuckerquellen wurden Glucose, Lactose und Galactose verwendet, die jeweiligen C+Y-Medien wurden als C+Y-Glucose (C+Y_{Glc}), C+Y-Lactose

4. Ergebnisse

(C+Y_{Lac}) und C+Y-Galactose (C+Y_{Gal}) bezeichnet. Das Wachstum von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* in C+Y_{Glc} und C+Y_{Lac} unterschied sich nicht von dem im klassischen C+Y-Medium. In C+Y_{Gal} war die Generationszeit jedoch verlängert aufgrund des langsameren Katabolismus von Galactose (Carvalho *et al.*, 2011).

Zur Untersuchung der CiaR Aktivität in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* wurden die Reporterstämme mit den *cia*-abhängigen Promotoren P_{htrA} und P_{spr0931} verwendet, die als *lacZ*-Fusionen über pPP2 in deren Genom integriert sind (Halfmann *et al.*, 2007b; Halfmann *et al.*, 2011). Die Promotoraktivitäten in *S. pneumoniae* R6 sind in Tab. 4.9, in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* in Tab 4.10 gezeigt. Aus beiden Tabellen ist ersichtlich, dass bereits zwischen klassischem C+Y-Medium und C+Y_{Glc}-Medium unterschiedliche Promotoraktivitäten auftreten. Dass diese auf die fehlende Saccharose zurückzuführen sind, ist nicht auszuschließen. Wahrscheinlicher liegt die Ursache jedoch in Fluktuationen der Zusammensetzung des recht komplexen C+Y-Mediums.

Tab. 4.9: Der Einfluss der C-Quelle auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6

Stamm	C-Quelle	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β-Galaktosidaseaktivität (U) ± Standardabweichung	C+Y _{Standard/Lac/Gal} / C+Y _{Glc}
RKL43	Glucose & Saccharose	P _{htrA}	202 ± 53 (14)	0,82
RKL30		P _{spr0931}	230 ± 62 (9)	0,74
RKL43	Glucose	P _{htrA}	246 ± 62 (2)	
RKL30		P _{spr0931}	309 ± 40 (3)	
RKL43	Lactose	P _{htrA}	202 ± 62 (4)	0,82
RKL30		P _{spr0931}	351 ± 42 (3)	1,16
RKL4	Galactose	P _{htrA}	369 ± 44 (3)	1,5
RKL30		P _{spr0931}	474 ± 91 (3)	1,53

Gezeigt sind die durch P_{htrA} und P_{spr0931} vermittelten β-Galaktosidaseaktivität in C+Y-Medien mit verschiedenen C-Quellen. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in den jeweiligen C+Y-Medien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8. Die β-Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben. Die Daten bei OD₆₀₀ von 0,4 können dem Anhang entnommen werden.

Da die Komponenten, mit denen die modifizierten C+Y-Medien hergestellt wurden, aus gleichen Chargen stammen und zudem die Rolle einzelner C-Quellen miteinander verglichen wird, ist es sinnvoller die Daten von C+Y_{Glc}-Medium mit denen von C+Y_{Lac}- und C+Y_{Gal}-Medium zu vergleichen und die Daten mit dem klassischen C+Y-Medium in diesem Experiment zu vernachlässigen. Abb 4.16 zeigt den Vergleich der Promotoraktivitäten von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* in den jeweiligen modifizierten C+Y-Medien.

Tab. 4.10: Der Einfluss der C-Quelle auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*

Stamm	C-Quelle	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	C+Y _{Standard/Lac/Gal} / C+Y _{Glc}
RKL86	Glucose &	P_{htrA}	240 \pm 52 (4)	0,70
RKL81	Saccharose	$P_{spr0931}$	303 \pm 65 (7)	0,71
RKL86	Glucose	P_{htrA}	342 \pm 78 (3)	
RKL81		$P_{spr0931}$	423 \pm 77 (2)	
RKL86	Lactose	P_{htrA}	216 \pm 47 (3)	0,63
RKL81		$P_{spr0931}$	240 \pm 55 (3)	0,57
RKL86	Galactose	P_{htrA}	878 \pm 112 (3)	2,57
RKL81		$P_{spr0931}$	641 \pm 23 (2)	1,48

Gezeigt sind die durch P_{htrA} und $P_{spr0931}$ vermittelten β -Galaktosidaseaktivität in C+Y-Medien mit verschiedenen C-Quellen. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in den jeweiligen C+Y-Medien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben. Die Daten bei OD₆₀₀ von 0,4 können dem Anhang entnommen werden.

In Anwesenheit von CiaH zeigt sich ein leicht positiver Effekt von Galactose auf die *ciaRH* Aktivität. Es ist ein geringer Anstieg um das 1,5-fache im Vergleich zu C+Y_{Glc} erkennbar (P_{htrA} $p=0,16$; $P_{spr0931}$ $p=0,07$). Ein deutlicher Unterschied zwischen C+Y_{Glc} und C+Y_{Lac} besteht im R6 Wildtyp nicht (P_{htrA} $p=0,84$; $P_{spr0931}$ $p=0,28$).

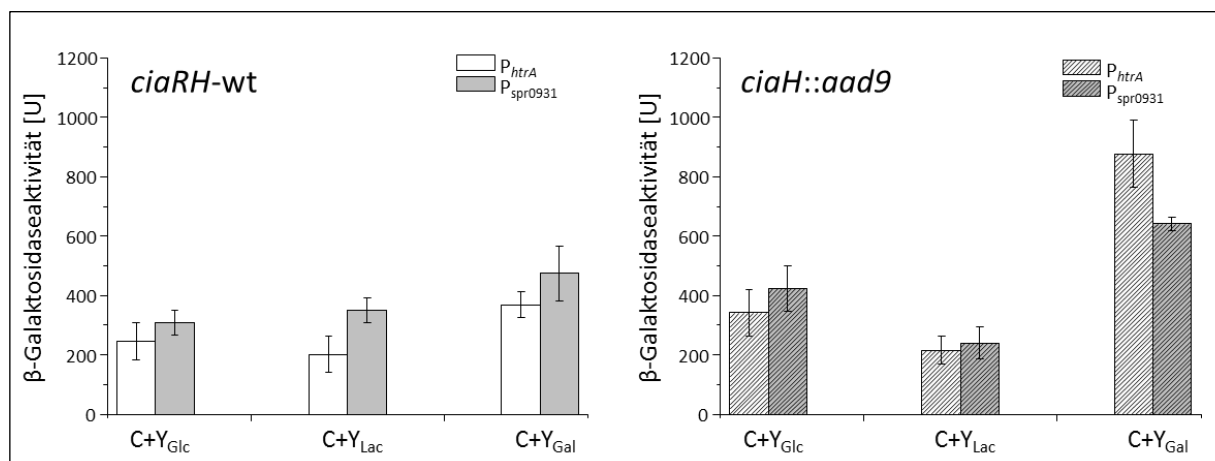


Abb. 4.16: Die Auswirkungen der C-Quelle auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*. Gezeigt ist der Vergleich der Promotoraktivitäten von P_{htrA} und $P_{spr0931}$ im R6-Wildtyps und im Stamm mit inaktivierter CiaH nach Wachstum in C+Y-Medium mit verschiedenen C-Quellen; v.l.n.r.: C+Y_{Glucose}, C+Y_{Lactose}, C+Y_{Galactose}. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Das Wachstum der Stämme erfolgte im jeweiligen modifizierten C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8.

In *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* nimmt die CiaR-Aktivität mit Lactose im Medium leicht ab (P_{htrA} $p=0,08$; $P_{spr0931}$ $p=0,12$), mit Galactose im Medium um einen Faktor von 1,5 bis 2,5 zu (P_{htrA} $p=0,002$; $P_{spr0931}$ $p=0,12$). Der Vergleich der Promotoraktivitäten im *ciaRH*-Wildtyp mit denen der *ciaH*-Deletion in den jeweiligen Medien (Tab. 4.11) zeigt, dass die bereits bekannte Aktivitätssteigerung im klassischen C+Y-Medium (Halfmann *et al.*, 2011) auch in C+Y_{Glc}-Medium auftritt, wenn *ciaH* inaktiviert ist. In C+Y_{Lac} dagegen nimmt die Aktivität in Abwesenheit von *ciaH* leicht ab. In C+Y_{Gal} ist dieser Faktor mit P_{htrA} im Vergleich zu C+Y_{Glc} leicht erhöht (3,3x), jedoch nicht beim Promotor $P_{spr0931}$ (1,4x). Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 liegt dieser Faktor für beide Promotoren ebenfalls unter 2 (Anhang).

Tab. 4.11: Änderung der CiaR-Aktivität von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* zu *S. pneumoniae* R6 in modifizierten C+Y-Medien

C+Y-Medium	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	<i>ciaH::aad9</i> / <i>ciaRH</i> wt
C+Y	P_{htrA}	1,19
	$P_{spr0931}$	1,32
C+Y _{Glc}	P_{htrA}	1,39
	$P_{spr0931}$	1,37
C+Y _{Lac}	P_{htrA}	1,07
	$P_{spr0931}$	0,68
C+Y _{Gal}	P_{htrA}	3,26
	$P_{spr0931}$	1,35

Die Werte wurden aus den Daten von Tab 4.9 und 4.10 ermittelt.

Überraschend war die Beobachtung, dass die Änderung der C-Quelle im C+Y-Medium nahezu nicht zu einer Änderung der AcP-Menge führte (Abb. 4.17, Tab. 4.11). In Anwesenheit von Galactose ist eine marginale Erhöhung von AcP zu sehen ($p=0,18$). Mit Lactose als C-Quelle bleibt das AcP-Niveau im Vergleich zu C+Y_{Glc} unverändert ($p=0,74$). Im Vergleich zu den beobachteten AcP-Änderungen, die in R6-Derivaten mit Manipulationen im SpxB-Pta-AckA Weg auftreten, ist die durch Galactose hervorgerufene Erhöhung sehr gering (vgl. Abb. 4.13). Somit scheint in Pneumokokken ein hohes Acetatniveau nicht gleichzeitig ein hohes Acetylphosphatniveau zu bedeuten, wie es in *E. coli* zu beobachten war (McCleary & Stock, 1994). Dieses Ergebnis bestätigt vielmehr die Vermutung, dass das chemische Gleichgewicht der Acetatkinasereaktion eher in Richtung Acetat liegt, so dass ATP zur Energiegewinnung erzeugt wird.

Tab. 4.11: Der Einfluss der C-Quelle auf die Acetylphosphatproduktion in *S. pneumoniae* R6

C+Y-Medium	Acetylphosphatkonzentration [$\mu\text{mol}/\text{mg Protein}$] \pm Standardabweichung	Verändertes C+Y / C+Y-Standard
C+Y	232 \pm 77 (7)	
C+Y-Glucose	236 \pm 16 (3)	1,01
C+Y-Lactose	224 \pm 54 (3)	0,97
C+Y-Galactose	338 \pm 110 (3)	1,45

Das Wachstum erfolgte in den jeweiligen C+Y-Medien bis zu einer OD_{600} von 0,4

Die Mengen an AcP wurden in $\mu\text{mol} / \text{mg}$ Gesamtprotein von Zellen einer 10 ml Kultur bestimmt.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt, die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

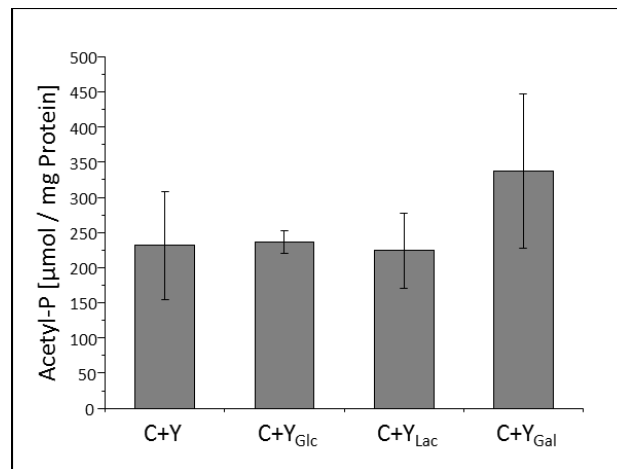


Abb. 4.17: Der Einfluss der C-Quelle auf die Acetylphosphatproduktion in *S. pneumoniae* R6. Gezeigt ist der Vergleich der AcP-Mengen nach Wachstum des R6-Wildtyps in C+Y-Medium mit verschiedenen C-Quellen; v.l.n.r.: C+Y (Standard), C+Y_{Glucose}, C+Y_{Lactose}, C+Y_{Galactose}. Die Acetylphosphatmenge ist definiert als $\mu\text{mol} / \text{mg}$ Gesamtprotein. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in einer 10 ml Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,4. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Dadurch kann ein Einfluss von Acetylphosphat auf die CiaR-Aktivität mit diesem Experiment nur ansatzweise gezeigt werden. Die Anwesenheit von Galactose wirkt sich offensichtlich geringfügig positiv, jedoch nicht signifikant auf die AcP-Produktion aus.

4.2.7 Der Einfluss von Acetat auf die CiaR Aktivität

Eine weitere in der Literatur dargestellte Möglichkeit zur Änderung der zellulären AcP-Konzentration zur Bestimmung des Einflusses auf die Aktivität von Response Regulatoren kann durch Variieren der Substratkonzentration, der an der AcP-Synthese beteiligten Enzyme, erfolgen. Es existieren in der Literatur Vermutungen, dass in *E. coli* durch Erhöhung der externen Acetatkonzentration die AcP-Menge erhöht werden kann, wenn Zuckerquellen vorhanden sind, die gegenüber Acetat bevorzugt werden (McCleary & Stock, 1994). Es existiert weiterhin eine Studie mit *Borrelia burgdorferi*, in der ein Einfluss auf die Aktivität des Response Regulators Rrp2 festgestellt wurde, indem die externe Acetatkonzentration erhöht wurde (Xu *et al.*, 2010). In *B. burgdorferi* entsteht AcP als Zwischenprodukt des AckA-Pta-Syntheseweg, der Acetat als Substrat zur Synthese von Acetyl-CoA benötigt. Erhöhung der Acetatkonzentration erhöhte die von Sensorkinasen unabhängige Aktivität des Response Regulators Rrp2. Es wurde vermutet, dass dies durch eine erhöhte AcP-Konzentration erfolgt. Die Bestimmung der AcP-Konzentration erfolgte in dieser Studie jedoch nicht (Xu *et al.*, 2010).

Aufgrund dessen wurden die CiaR-Aktivität und die AcP-Konzentration als Antwort auf veränderte Acetatkonzentration im Wachstumsmedium untersucht. Durch Variieren von Acetat, das in Pneumokokken das Substrat von AckA darstellt, in C+Y-Medium sollte sich den Vermutungen nach die zelluläre AcP-Menge ändern und dadurch die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität. Analog zu den vorigen Experimenten wird auch der Einfluss von Acetat in Anwesenheit von CiaH überprüft.

Das klassische C+Y-Medium enthält Natriumacetat in einer Konzentration von 12,5 mmol/l. Zur Untersuchung des Einflusses von Acetat wurde die Konzentration von Natriumacetat im C+Y-Medium verändert. Zum einen wurden C+Y-Medien mit doppelter und vierfacher Menge Natriumacetat sowie ein C+Y-Medium ohne Natriumacetat hergestellt. Als Kontrolle dienten C+Y-Medien mit 50 mmol/l Kaliumacetat und 50 mmol/l Natriumchlorid anstelle des Natriumacetats, um sicherzustellen, dass der zu beobachtende Effekt auf die *cia*-Expression tatsächlich durch Acetat und nicht durch Natrium erzeugt wird.

Zur Untersuchung der CiaR Aktivität in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* wurden deren Reporterstämme mit den *cia*-abhängigen Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ verwendet, die als *lacZ*-Fusionen über pPP2 in deren Genom integriert sind (Halfmann *et al.*, 2007b; Halfmann *et al.*, 2011). In Abwesenheit von CiaH ist ein Einfluss von Acetat auf die *cia*-abhängige Promotoraktivität deutlich erkennbar (Tab. 4.12, Abb. 4.18). Ohne Natriumacetat im C+Y-Medium fällt die Aktivität im Vergleich zum klassischen C+Y-Medium auf etwa 80 % ab, während sie bei doppelter und 4-facher Menge auf das 1,5-fache bzw. 4-fache ansteigt. Dieser Einfluss ist zudem auf Acetat zurückzuführen. Denn die CiaR Aktivität in C+Y-Medium mit 50 mmol/l Natriumchlorid anstelle von Natriumacetat entspricht

der in C+Y-Medium ohne Acetat und auch durch 50 mmol/l Kaliumacetat wird eine deutliche Aktivitätssteigerung verursacht. Dahingegen nimmt im Stamm mit *ciaRH*-WT die Aktivität nicht zu. Es ist vielmehr eine Tendenz zur Aktivitätsabnahme zu erkennen.

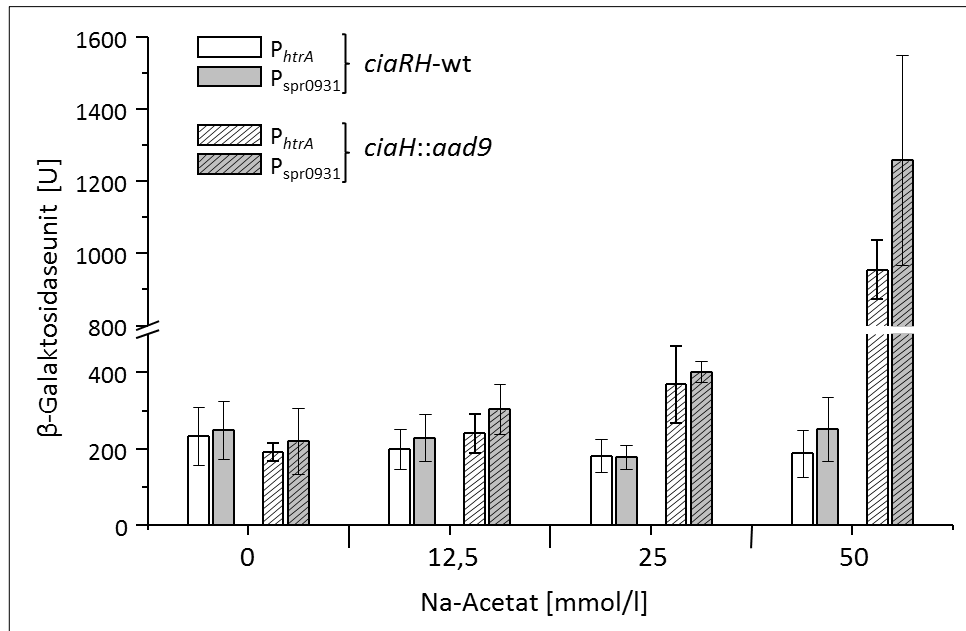


Abb. 4.18: Die Auswirkungen von Acetat auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*. Dargestellt ist der Vergleich der durch die Promotoren P_{htrA} und P_{spr0931} vermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten von *S. pneumoniae* R6 (RKL43) und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* in C+Y-Medien mit Natriumacetatkonzentrationen von 0 12,5 25 und 50 mmol/l. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Das Wachstum der Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8.

Weiterhin wird deutlich, dass in C+Y-Medium ohne Acetat die CiaR-Aktivität im *ciaRH*-Wildtyp etwas höher ist als im Stamm ohne CiaH (Abb. 4.18, Tab 4.13). Befindet sich jedoch Acetat im C+Y-Medium liegt die CiaR-Aktivität im Wildtyp unter der von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* und mit steigenden Acetatmengen wird der Abstand zwischen theoretisch möglicher CiaR-Aktivierung im *ciaH*-Deletionsstamm und tatsächlich stattfindender Aktivierung im *ciaRH*-Wildtyp immer größer. Somit gibt es auch Bedingungen im C+Y-Medium, in denen CiaH als schwache Kinase agiert, nämlich wenn Acetat fehlt. In Anwesenheit von Acetat agiert CiaH allerdings als Phosphatase. Die Stärke der Phosphataseaktivität ist dabei abhängig von der Höhe der Acetatkonzentration.

Tab. 4.12: Die Auswirkungen von Acetat auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*

Stamm	Acetat-konzentration [mmol/l]	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	Verändertes C+Y / Klassisches C+Y
RKL86	0	P_{htrA}	192 \pm 24 (3)	0,8
RKL81	0	$P_{spr0931}$	220 \pm 86 (3)	0,73
RKL86	12,5	P_{htrA}	240 \pm 52 (4)	
RKL81	12,5	$P_{spr0931}$	303 \pm 65 (7)	
RKL86	25	P_{htrA}	368 \pm 110 (3)	1,53
RKL81	25	$P_{spr0931}$	401 \pm 28 (2)	1,32
RKL86	50	P_{htrA}	955 \pm 81 (3)	3,98
RKL81	50	$P_{spr0931}$	1259 \pm 290 (4)	4,16
(RKL86	50 ¹	P_{htrA}	523 \pm 42 (3)	2,18
RKL81	50 ¹	$P_{spr0931}$	776 \pm 47 (4)	2,56
RKL86	0 ²	P_{htrA}	195 \pm 34 (3)	0,81
RKL81	0 ²	$P_{spr0931}$	235 \pm 10 (3)	0,78

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in den jeweiligen C+Y-Medien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben. Die Daten für den Zeitpunkt OD₆₀₀ von 0,4 können dem Anhang entnommen werden. ¹Anstelle von Na-Acetat wurden 50 mmol/l K-Acetat ins C+Y-Medium gegeben.

²Anstelle von Na-Acetat wurden 50 mmol/l NaCl ins C+Y-Medium gegeben.

Tab. 4.13: Die Auswirkungen von Acetat auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6

Stamm	Acetat-konzentration [mmol/l]	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	Verändertes C+Y / Klassisches C+Y
RKL43	0	P_{htrA}	233 \pm 76 (4)	1,15
RKL30	0	$P_{spr0931}$	249 \pm 76 (3)	1,08
RKL43	12,5	P_{htrA}	202 \pm 53 (14)	
RKL30	12,5	$P_{spr0931}$	230 \pm 62 (9)	
RKL43	25	P_{htrA}	182 \pm 43 (4)	0,90
RKL30	25	$P_{spr0931}$	179 \pm 31(3)	0,78
RKL43	50	P_{htrA}	188 \pm 62 (5)	0,93
RKL30	50	$P_{spr0931}$	252 \pm 84 (4)	1,10
RKL43	50 ¹	P_{htrA}	188 \pm 32 (3)	0,93
RKL30	50 ¹	$P_{spr0931}$	230 \pm 31(5)	1
RKL43	0 ²	P_{htrA}	251 \pm 53 (3)	1,24
RKL30	0 ²	$P_{spr0931}$	333 \pm 40 (3)	1,45

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in den jeweiligen C+Y-Medien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben. Die Daten für den Zeitpunkt OD₆₀₀ von 0,4 können dem Anhang entnommen werden. ¹Anstelle von Na-Acetat wurden 50 mmol/l K-Acetat ins C+Y-Medium gegeben.

²Anstelle von Na-Acetat wurden 50 mmol/l NaCl ins C+Y-Medium gegeben.

Hierbei werden also zwei Dinge deutlich. Durch Acetat wird die Phosphataseaktivität von CiaH stimuliert und die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität wird gesteigert. Im Wildtyp bleibt die *cia*-abhängige Promotoraktivität in C+Y-Medium nahezu konstant. Durch die Sensorkinase CiaH wird also der Acetateffekt auf CiaR unterdrückt.

In einem weiteren Experiment sollte der positive Einfluss von Acetat auf die CiaR Aktivität bestätigt werden. Wenn die durch Acetat verursachte Aktivitätssteigerung von CiaR durch erhöhte Mengen von Acetylphosphat bewirkt wird, sollte dies von der alleinigen Anwesenheit der Acetatkinase abhängen. Somit sollte dieser Effekt auch zu beobachten sein, wenn lediglich die Acetatkinase vorhanden ist und Pyruvatoxidase und Phosphotransacetylase inaktiviert sind. Da im klassischen C+Y-Medium 12,5 mmol/l Acetat vorhanden sind, könnte diese Menge bereits in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat* stimulierend auf die CiaR-Aktivität wirken. Durch Entfernen von Acetat im C+Y-Medium sollte die CiaR Aktivität auf das Niveau im Stamm ohne SpxB-Pta-AckA-Syntheseweg abfallen und durch Erhöhung der Acetatkonzentration sollte die CiaR-Aktivität wiederum ansteigen.

Umgekehrt wird erwartet, dass im Stamm mit kompletter Inaktivierung des AcP-Syntheseweges Acetat keinen Einfluss auf die CiaR-Aktivität nimmt, da hier die AcP-Konzentration auf konstantem Niveau vorliegen sollte.

Um dies zu überprüfen, wurden die *cia*-abhängigen Promotoraktivitäten in Reporterstämmen von *S. pneumoniae* R6 mit Deletionen in *ciaH*, *spxB* und *pta* mit denen von *S. pneumoniae* R6 mit Deletionen in *ciaH*, *spxB*, *pta* und *ackA* unter verschiedenen Acetatkonzentration im C+Y-Medium bestimmt (Abb. 4.19, Tab. 4.14, 4.15). In diesem Experiment wurde auf die Messung mit C+Y-Medium und 25 mmol/l Acetat verzichtet.

Ist im genetischen Hintergrund einer *ciaH*-Deletion lediglich die Acetatkinase als Komponente des SpxB-Pta-AckA-Syntheseweges funktionell, steigt die CiaR-Aktivität mit steigender Acetatkonzentration an. Ohne Acetat fällt die Aktivität auf 65 % im Vergleich zum klassischen C+Y-Medium ab, jedoch nicht auf das Niveau im Stamm mit inaktivem SpxB-Pta-AckA-Weg. Mit 50 mmol/l Acetat nimmt die CiaR-Aktivität um das 6- bis 10-fache zu und erreicht in etwa die Stärke wie in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* unter diesen Bedingungen.

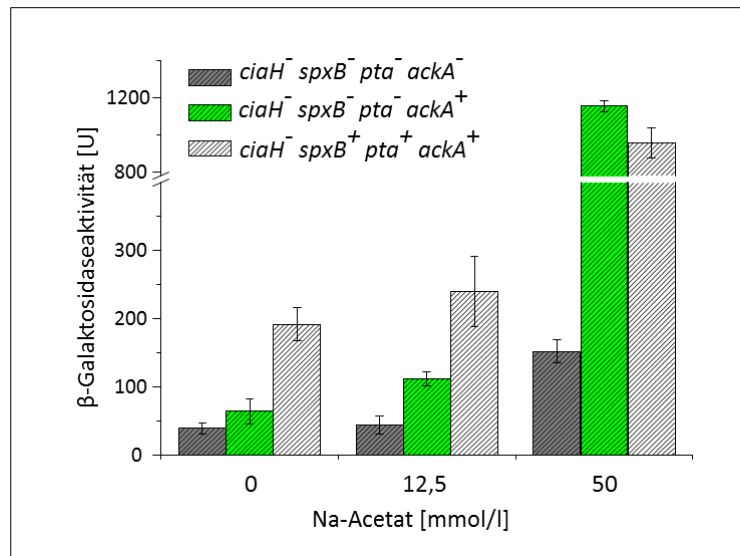


Abb. 4.19: Die Auswirkungen von Acetat und Modifikationen des Pyruvatmetabolismus auf die CiaR-Aktivität. Gezeigt ist die durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* (RKL86), *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat* (RKL412) und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII* (RKL374) unter verschiedenen Acetatkonzentrationen in C+Y-Medium. Dargestellt ist der Vergleich der β -Galaktosidaseaktivitäten beider Stämme nach Wachstum in C+Y-Medien mit den Na-Acetatkonzentrationen 0, 12,5 und 50 mmol/l. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Das Wachstum der Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,8.

Tab. 4.14: Die Auswirkungen von Acetat auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat*

Stamm	Acetatkonzentration [mmol/l]	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	Verändertes C+Y / C+Y Standard
RKL412	0	P_{htrA}	64 \pm 18 (3)	0,57
RKL413		$P_{spr0931}$	57 \pm 1 (3)	0,48
RKL412	12,5	P_{htrA}	112 \pm 10 (6)	
RKL413		$P_{spr0931}$	118 \pm 15 (5)	
RKL412	50	P_{htrA}	1156 \pm 29 (3)	10,3
RKL413		$P_{spr0931}$	673 \pm 315 (4)	5,7

Gezeigt sind die Durch die Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ vermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten von in C+Y-Medien mit verschiedenen Konzentrationen an Acetat.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in den jeweiligen C+Y-Medien bis zu einer OD_{600} von 0,8.

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

Die Daten für OD_{600} von 0,4 können dem Anhang entnommen werden.

Tab. 4.15: Die Auswirkungen von Acetat auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 sxB::ermB pta::cat ackA::aphIII*

Stamm	Acetatkonzentration [mmol/l]	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	Verändertes C+Y / C+Y Standard
RKL374	0	P_{htrA}	39 \pm 8 (3)	0,68
RKL378		$P_{spr0931}$	21 \pm 1 (2)	0,64
RKL374	12,5	P_{htrA}	44 \pm 13 (4)	
RKL378		$P_{spr0931}$	33 \pm 6 (4)	
RKL374	50	P_{htrA}	152 \pm 17 (2)	3,45
RKL378		$P_{spr0931}$	92 \pm 8 (2)	2,79

Gezeigt sind die Durch die Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ vermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten von in C+Y-Medien mit verschiedenen Konzentrationen an Acetat.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in den jeweiligen C+Y-Medien bis zu einer OD_{600} von 0,8.

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

Die Daten für OD_{600} von 0,4 können dem Anhang entnommen werden.

Jedoch zeigt sich, dass auch im Stamm mit deletiertem SpxB-Pta-AckA-Syntheseweg im genetischen Hintergrund der *ciaH*-Deletion Acetat einen positiven Einfluss auf die CiaR-Aktivität hat. Ohne Acetat im C+Y-Medium fällt im Vergleich zum klassischen C+Y-Medium die Promotoraktivität auch auf 66 % ab. Die Abnahme der Promotoraktivität ist also für beide Derivate gleich. Die vierfache Erhöhung der Acetatkonzentration bewirkt eine 2,8 bis 3,5-fache Steigerung der CiaR-Aktivität. Diese Steigerung ist zwar geringer als im Stamm mit intakter Acetatkinase, jedoch als signifikant anzusehen.

Es wurde vermutet, dass der Acetateffekt auf CiaR auf veränderte AcP-Mengen zurückzuführen ist, da durch die Steigerung der Acetatkonzentration sich das Gleichgewicht der Acetatkinasereaktion in Richtung des Acetylphosphats verschieben sollte und dieses dadurch akkumulieren sollte (Wolfe, 2005). Daher wurde die zelluläre AcP-Menge in *S. pneumoniae* R6, dem Stamm mit *sxB*- und *pta*-Deletion und dem Stamm mit komplett inaktivem AcP-Syntheseweg nach Wachstum in C+Y-Medium mit verschiedenen Acetatmengen bestimmt. Der Genetik nach, sollte im Wildtyp und im Stamm ohne *sxB* und *pta* die AcP-Menge zunehmen, jedoch nicht im Stamm deletiertem AcP-Syntheseweg. Dies trifft jedoch nicht zu, denn in allen drei Stämmen bleiben die AcP-Mengen trotz Variieren der Acetatkonzentration nahezu konstant ($p \geq 0,1$; Abb. 4.20, Tab 4.16). Lediglich die Unterschiede, die durch die genetischen Manipulationen verursacht werden, sind erkennbar (vgl. Abb. 4.13).

4. Ergebnisse

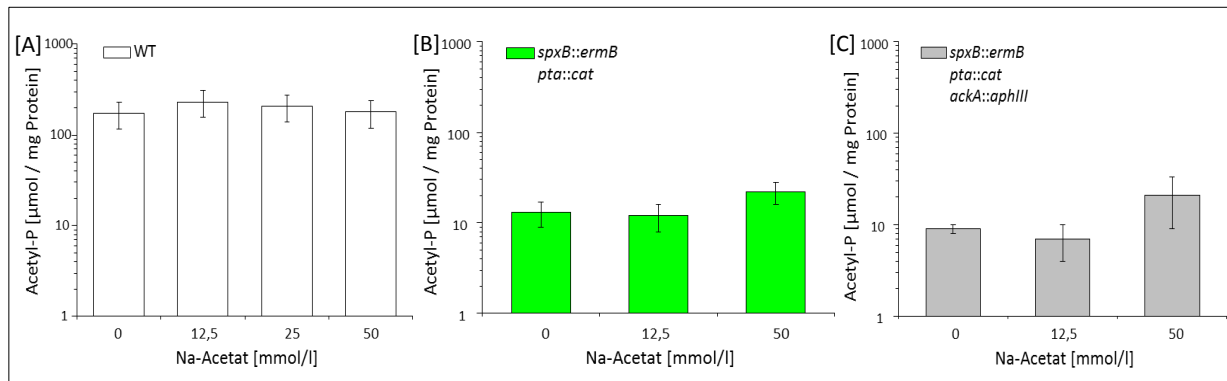


Abb. 4.20: Der Einfluss von Acetat in Kombination von genetisch modifiziertem Pyruvatmetabolismus auf die Acetylphosphatproduktion. Es sind die Acetylphosphatmengen in *S. pneumoniae* R6 [A], *S. pneumoniae* R6 *spxB::ermB pta::cat* [B] und *S. pneumoniae* *spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII* [C] in C+Y-Medium mit verschiedenen Acetatkonzentration (0, 12,5, 25 und 50 mmol/l) dargestellt. Die Acetylphosphatmenge ist definiert als $\mu\text{mol} / \text{mg}$ Gesamtprotein. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in einer 10 ml Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,4. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Dies bedeutet, dass die Acetatmenge keinen Einfluss auf die Acetylphosphatkonzentration nimmt. Die Umwandlung von Acetat in Acetylphosphat durch AckA findet unter diesen Bedingungen offenbar nicht statt. Dies bekräftigt wiederum die These, dass die Acetatkinase in Pneumokokken eher eine ATP-bildende Acetatsynthase ist.

Tab. 4.16: Der Einfluss von Acetat in Kombination von genetisch modifiziertem Pyruvatmetabolismus auf die Acetylphosphatproduktion

Acetatkonzentration [mmol/l] in C+Y-Medium	Acetylphosphatkonzentration [$\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein] \pm Standardabweichung		
	R6 - Wildtyp	R6 <i>spxB::ermB pta::cat</i>	R6 <i>spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII</i>
0	173 \pm 57 (3)	13 \pm 4	9 \pm 1
12,5	232 \pm 77 (7)	7 \pm 2	6 \pm 1
25	206 \pm 67 (3)	n.b.	n.b.
50	180 \pm 61 (2)	22 \pm 6	21 \pm 12

Das Wachstum erfolgte in den jeweiligen C+Y-Medien bis zu einer OD_{600} von 0,4

Die Mengen an AcP wurden in $\mu\text{mol} / \text{mg}$ Gesamtprotein von Zellen einer 10 ml Kultur bestimmt.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt, die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

n.b.: nicht bestimmt

Das Ergebnis der *cia*-abhängigen Promotoraktivitäten ist in Anbetracht gleichbleibender AcP-Mengen überraschend. Denn es zeigt, dass Acetat in Abwesenheit von CiaH positiv auf die CiaR-Aktivität wirkt und dieser Effekt unabhängig von der Acetylphosphatmenge ist. In Abwesenheit von CiaH muss daher ein weiterer Faktor die Phosphorylierung von CiaR unterstützen.

Des Weiteren ist überraschend, dass in C+Y-Medium mit 50 mmol/l Acetat die CiaR-regulierten Promotoraktivitäten in R6 mit *ciaH⁻ spxB⁻ pta⁻* die gleiche Expression erreichen wie in R6 mit *ciaH⁻ spxB⁺ pta⁺*, die AcP-Mengen in beiden Stämmen sich jedoch drastisch unterscheiden (Abb. 4.19). Somit ist in diesem Fall unter niedrigen AcP-Konzentrationen eine genauso starke CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität möglich wie unter normalhohen AcP-Konzentrationen.

Weiterhin sind die AcP-Konzentrationen im R6-Stamm mit *ciaH⁻ spxB⁻ pta⁻ ackA⁺* auf gleich niedrigem Niveau wie in R6 mit *ciaH⁻, spxB⁻ pta⁻ ackA⁻* und durch Acetat offenbar nicht steigerbar ($p \geq 0,1$). Die CiaR-Aktivität ist im Derivat mit *ciaH⁻, spxB⁻ pta⁻ ackA⁺* in Anwesenheit von 50 mmol/l Acetat jedoch um den Faktor 10 höher. Beide Stämme unterscheiden sich genetisch durch die Anwesenheit des Gens der Acetatkinase.

Neben CiaH und Acetylphosphat spielen demnach offensichtlich auch die Acetatkinase und Acetat eine bedeutende Rolle bei der Steuerung der CiaR-Aktivität. Zudem übt Acetat in Anwesenheit von CiaH einen negativen, in Abwesenheit von CiaH einen positiven Einfluss auf die CiaR-Aktivität aus.

4.2.8 Der Einfluss des Wachstumsmediums

Das *ciaRH*-System ist unter allen Wachstumsbedingungen stets aktiv (Halfmann *et al.*, 2011). Sogar in Abwesenheit von CiaH findet in allen Wachstumsmedien eine Expression des *cia*-Regulons statt. Allerdings ist die *cia*-Expression dabei abhängig vom Wachstumsmedium. Bei Fehlen von CiaH nimmt die *cia*-abhängige Promotoraktivität in dem bisher in dieser Arbeit verwendeten klassischen C+Y-Medium leicht zu, wohingegen sie beispielsweise in BHI-Medium deutlich abfällt. Allerdings befindet sich in BHI-Medium die Aktivität nicht auf dem Niveau des *ciaR*-Deletionsstammes, sondern es existiert eine Restaktivität, die im Vergleich zum *ciaRH*-Wildtyp durchschnittlich 13 % beträgt (Halfmann *et al.*, 2011). CiaR ist also auch in diesem Medium trotz Fehlen von CiaH aktiv, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß als in C+Y-Medium. CiaH agiert dabei in BHI-Medium als Kinase (Halfmann *et al.*, 2011).

Eine mögliche Ursache für die Verringerung der CiaH-unabhängigen CiaR-Aktivität in BHI-Medium könnte mit unterschiedlichen zellulären AcP-Mengen zusammenhängen, die in *S. pneumoniae* während des Wachstums in beiden Medien gebildet werden.

Die Bestandteile von BHI-Medium sind Dextrose, Peptide, NaCl und Na₂PO₄. Somit stellt BHI-Medium im Vergleich zum recht komplexen C+Y-Medium (Tab. 3.12, 3.13) eher ein Minimalmedium dar. Bekanntlich spiegelt die Menge an Acetylphosphat den zellulären Energiestatus dar und verknüpft den Energiestatus mit der Signaltransduktion von TCS (Wolfe, 2010). Daher ist es denkbar, dass *S. pneumoniae* in BHI-Medium weniger AcP bildet, was sich auf die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität auswirkt. Dies trifft tatsächlich zu (Tab. 4.17). Die AcP-Menge entspricht lediglich 35 % derer in C+Y-Medium. Somit steht CiaR in BHI-Medium offensichtlich weniger Acetylphosphat als in C+Y-Medium zur Autophosphorylierung zur Verfügung.

Wie zuvor gezeigt wurde, spielt Acetylphosphat in Abwesenheit von CiaH in C+Y-Medium eine entscheidende Rolle für die Aktivität von CiaR. In Derivaten, in denen die zelluläre AcP-Menge deutlich abnimmt, nimmt auch die CiaR-abhängige Promotoraktivität ab. Prinzipiell gesehen, wurden durch Inaktivieren des SpxB-Pta-AckA-Weges und der dadurch verursachten Verringerung der AcP-Konzentration ähnliche AcP-Bedingungen wie in BHI-Medium erzeugt. Allerdings ist die AcP-Menge in BHI-Medium nicht auf einem solch niedrigen Niveau wie beispielsweise im R6-Derivat mit kompletter Deletion des AcP-Syntheseweges. Die Promotoraktivitäten nehmen in BHI-Medium vom *ciaRH*-Wildtyp zur *ciaH*-Deletion jedoch um nahezu denselben Faktor ab (Halfmann *et al.*, 2011) wie vom Stamm mit *ciaH*-Deletion und intaktem AcP-Syntheseweg zum Stamm mit *ciaH*-Deletion und inaktiviertem AcP-Syntheseweg (Tab. 4.5). Somit korrelieren die AcP-Mengen nicht exakt mit der *cia*-Expression. Die geringere AcP-Menge in BHI-Medium ist sicher ein Faktor für die schwache *ciaRH*-Aktivität bei inaktiverter CiaH. Dennoch tragen sicherlich weitere Faktoren dazu bei. Ein solcher

Faktor könnte die Acetatmenge sein. Wie im vorigen Kapitel gezeigt wurde, hat Acetat in C+Y-Medium einen positiven Einfluss auf die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität, unabhängig von Acetylphosphat. In C+Y-Medium ohne Acetat ist in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* die Expression des *cia*-Regulons niedriger als im klassischen C+Y-Medium (Abb. 4.18), ohne dass sich die AcP-Menge ändert. Während in C+Y-Medium die Acetatmenge in einer Konzentration von 12,5 mmol/l enthalten ist, fehlt dieses in BHI-Medium. Es ist daher denkbar, dass durch Zugabe von Acetat ins BHI-Medium ebenfalls ein positiver Effekt auf die CiaR-Aktivität zu beobachten ist. Weiterhin wurde in C+Y-Medium beobachtet, dass durch Änderung der Acetatkonzentration im R6-Wildtyp, die *cia*-Expression nicht ansteigt. CiaH agiert dabei mit verstärkter Phosphataseaktivität (Abb. 4.18).

Daher wurde überprüft wie sich die *cia*-Aktivität in BHI-Medium mit Acetat verhält. Dazu wurde ein BHI-Medium mit Acetat in einer Endkonzentration von 50 mmol/l hergestellt. Diese entspricht der vierfachen Menge des klassischen C+Y-Medium. Sie wurde gewählt, da sie äquivalent zu den Experimenten in C+Y-Medium mit 50 mmol/l ist und dort ein deutlicher Effekt auf die *cia*-Aktivität erkennbar war. Zur Herstellung des BHI-Mediums mit 50 mmol/l Acetat, im Folgenden als BHI_{Acetat}-Medium bezeichnet, wurde 3M Natriumacetatlösung mit einem pH-Wert von 7,8 zugegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,8 eingestellt, da es Hinweise eines Einflusses des pH-Werts auf das *ciaRH*-System gibt (Kaysen, 2012) und dieser dem im klassischen C+Y-Medium entspricht.

Zusätzlich wurde die AcP-Menge in BHI_{Acetat}-Medium bestimmt, um zu überprüfen, wie sich die Acetatzugabe in BHI-Medium auf die AcP-Menge auswirkt (Tab. 4.21). Auch hier kommt es nicht zum Anstieg der AcP-Konzentration, sie bleibt unabhängig von der Acetatmenge konstant.

Tab. 4.17: Die Acetylphosphatsynthese in *S. pneumoniae* R6 in Abhängigkeit des Wachstumsmediums

Medium	Acetylphosphatkonzentration [$\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein] \pm Standardabweichung	BHI-Medium / C+Y-Medium
C+Y-Medium	232 \pm 77 (7)	
BHI-Medium	81 \pm 19 (3)	0,35
BHI _{Acetat} -Medium	71 \pm 37 (3)	0,31

Das Wachstum erfolgte in den jeweiligen C+Y-Medien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4

Die Mengen an AcP wurden in $\mu\text{mol} / \text{mg}$ Gesamtprotein von Zellen einer 10 ml Kultur bestimmt.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt, die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

Die Ergebnisse der β -Galaktosidaseassays der Promotoren P_{htrA} und P_{spr0931} in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* in BHI- und BHI_{Acetat}-Medium sind in Abb. 4.21 und Tab. 4.18 dargestellt. In Abwesenheit von CiaH führt Acetat zur Zunahme der CiaR-Aktivität. Die Expression des Promotors P_{htrA} ist fast 7-fach erhöht, während P_{spr0931} sogar eine 12-fach erhöhte Expression aufweist. Somit ist

4. Ergebnisse

die Stimulierung der CiaR-Aktivität durch Acetat unabhängig vom Wachstumsmedium und von der zellulären AcP-Menge. In BHI-Medium wirkt Acetat sogar stärker stimulierend als in C+Y-Medium.

Tab. 4.18: Der Einfluss von Acetat in BHI-Medium auf die CiaR-Aktivität

Cia-Genetik	Stamm	Medium	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung	BHI _{Acetat} / BHI
<i>ciaRH-wt</i>	RKL43	BHI	P _{<i>htrA</i>}	398 \pm 20 (4)	
	RKL30	BHI	P _{<i>spr0931</i>}	454 \pm 34 (4)	
	RKL43	BHI _{Acetat}	P _{<i>htrA</i>}	217 \pm 26 (4)	0,55
	RKL30	BHI _{Acetat}	P _{<i>spr0931</i>}	264 \pm 14 (4)	0,58
<i>ciaH::aad9</i>	RKL86	BHI	P _{<i>htrA</i>}	62 \pm 5 (3)	
	RKL81	BHI	P _{<i>spr0931</i>}	161 \pm 42 (3)	
	RKL86	BHI _{Acetat}	P _{<i>htrA</i>}	1046 \pm 13 (3)	6,7
	RKL81	BHI _{Acetat}	P _{<i>spr0931</i>}	1938 \pm 163 (3)	12,0

Gezeigt sind die durch die *cia*-regulierten Promotoren P_{*htrA*} und P_{*spr0931*} vermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* nach Wachstum in BHI-Medium und BHI_{Acetat}-Medium. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben. Die Daten für OD₆₀₀ von 0,4 können dem Anhang entnommen werden.

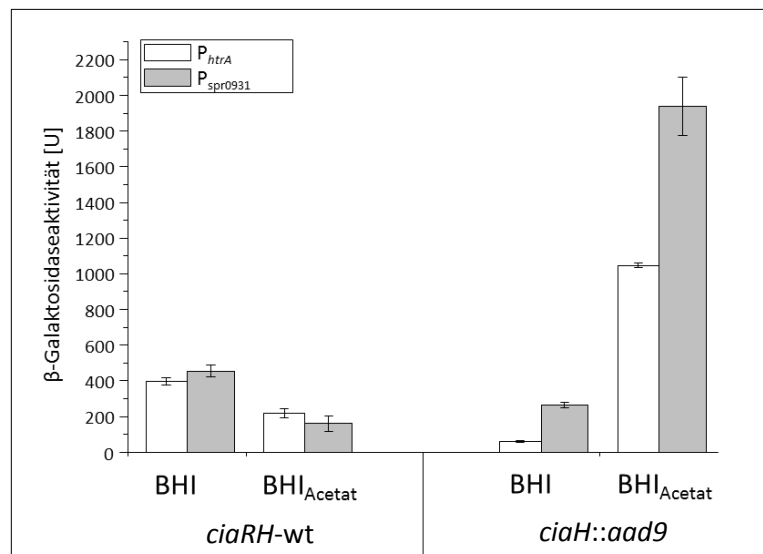


Abb. 4.21: Der Einfluss von Acetat in BHI-Medium auf die CiaR-Aktivität. Gezeigt ist der Vergleich der durch die *cia*-regulierten Promotoren P_{*htrA*} (weiße Säulen) und P_{*spr0931*} (graue Säulen) vermittelten β -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 (links) und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* (rechts) sowie der Einfluss von Acetat (50 mmol/l) im Wachstumsmedium auf die Promotoraktivität. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Das Wachstum der Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8.

Die Zugabe von Acetat ins BHI-Medium führt in Anwesenheit von CiaH zur Abnahme der CiaR-abhängigen Promotoraktivität. Die Aktivität in BHI_{Acetat}-Medium entspricht in etwa der Hälfte der

4. Ergebnisse

Aktivität in BHI-Medium. Dies ist ein Unterschied zu C+Y-Medium, da dort kein deutlicher Abfall stattfindet. Neben der Verhinderung der durch Acetat hervorgerufenen, erhöhten Aktivierung von CiaR reagiert CiaH in BHI_{Acetat}-Medium zusätzlich mit verstärkter Phosphataseaktivität.

Mit diesem Experiment wurden somit zum ersten Mal Bedingungen aufgezeigt, unter denen im Hintergrund des R6-Wildtyps durch Änderung einer Komponente des Wachstumsmediums die Phosphataseaktivität von CiaH beobachtet werden kann.

4.3 Acetat und die durch klinische *ciaH*-Allele vermittelte CiaR-Aktivität

Wie in Kapitel 4.1. beschrieben, verändern die klinischen *ciaH*-Allele in C+Y-Medium die Aktivität von CiaR. Während *ciaHTpVT* im Vergleich zur *ciaH*-wt eine dreifache Erhöhung der CiaR-regulierten Promotoraktivität bewirkt, steigt diese in Anwesenheit der Allele *ciaH556* und *ciaH1057* lediglich um das 1,5-fache an. *CiaH232* verursacht dagegen eine leichte Aktivitätsabnahme. Da die Inaktivierung von *ciaH* in C+Y-Medium nicht zur Abnahme der CiaR-Aktivität, sondern zur Zunahme um einen Faktor 2 führt (Halfmann *et al.*, 2011) konnte unter diesen Bedingungen nicht eindeutig geklärt werden, ob durch die Mutationen in *ciaH232*, *ciaH556* und *ciaH1057* die Kinase- oder Phosphataseaktivitäten von CiaH verändert sind. Eindeutig ist lediglich, dass die Mutation in *ciaHTpVT* eine Zunahme der Kinaseaktivität von CiaH bewirkt, da in diesem Stamm die Promotoraktivität über das Niveau des *ciaH*-Deletionsstammes hinaussteigt.

In BHI-Medium hingegen kann eindeutig eine Aussage über die Kinaseaktivität der *ciaH*-Allele gemacht werden, da unter diesen Wachstumsbedingungen CiaH als Kinase agiert (Halfmann *et al.*, 2011). Zur Überprüfung der Beeinflussung der Kinaseaktivitäten von CiaH durch die Mutationen in den *ciaH*-Allelen, wurden die *cia*-abhängigen Promotoraktivitäten in den R6-Derivaten mit klinischen *ciaH*-Allelen mit denen des *ciaH*-Wildtyps verglichen, analog zum Experiment in C+Y-Medium (Abb. 4.2). Zur Untersuchung der Kinaseaktivität der *ciaH*-Allele wurden die Promotoraktivitäten der *cia*-regulierten Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ in *S. pneumoniae* R6 und den Stämmen mit klinischen *ciaH*-Allelen sowie mit dem Laborallel *ciaH306* in BHI-Medium bestimmt und mit denen des Wildtyps verglichen (Abb. 4.22, Tab 4.19).

Mit Ausnahme von *ciaH232* verursachen alle *ciaH*-Allele Änderungen in den Promotoraktivitäten. Während in Anwesenheit von *ciaH232* die Aktivität von P_{htrA} marginal abfällt (0,9-fach), nimmt die Aktivität von $P_{spr0931}$ geringfügig zu (1,1-fach). Daher wird in diesem Fall nicht von einer Änderung gesprochen. Im Gegensatz zu BHI-Medium nimmt die Aktivität in C+Y-Medium etwas deutlicher ab (0,7- bis 0,8-fach). Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass die Kinaseaktivität durch die Mutation von *ciaH232* nicht beeinflusst wurde.

Die Allele *ciaH556* und *ciaH1057* bewirken wiederum eine Zunahme der CiaR-Aktivität um den Faktor 1,5. Somit ist eindeutig gezeigt, dass durch beide Mutationen die Kinaseaktivität von CiaH leicht erhöht wird. Wie in C+Y-Medium beobachtet wurde, nimmt die Aktivität in Anwesenheit der Allele *ciaHTpVT* und *ciaH306* um den Faktor 3 bzw. 10 zu (Tab. 4.2). Beide Faktoren treten auch in BHI-Medium auf, wobei durch *ciaHTpVT* die Aktivitätszunahme sogar etwas höher als in C+Y-Medium ist. Diese Daten bestätigen, dass durch beide Allele die Kinaseaktivität von CiaH erhöht wird.

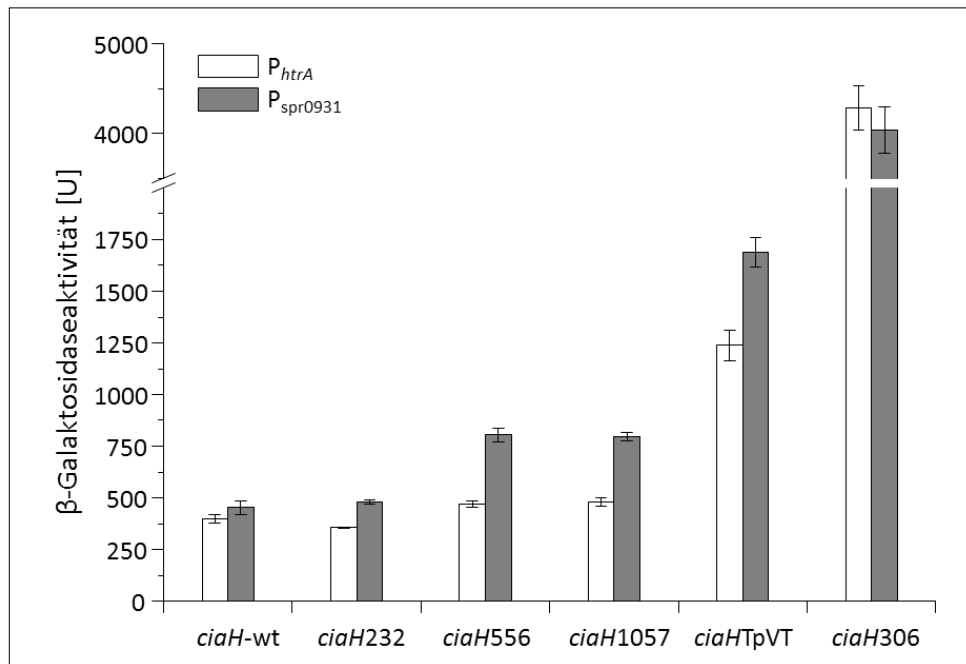


Abb. 4.22: Der Einfluss der klinischen *ciaH*-Allele auf die Kinaseaktivität von CiaH. Gezeigt sind die durch die Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ vermittelten β -Galaktosidaseaktivität des *ciaH*-Wildtyps (RKL43, RKL30) im Vergleich zu den Stämmen mit den klinischen *ciaH*-Allelen *ciaH*232 (RKL248, RKL249), *ciaH*556 (RKL254, RKL255), *ciaH*1057 (RKL257, RKL258), *ciaHTpVT* (RKL251, RKL252) sowie dem *ciaH*306 Allel aus der Labormutante C306 (RKL188, RKL189). Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Die β -Galaktosidaseaktivität, die durch P_{htrA} vermittelt wird, ist in weißen Säulen, die durch $P_{spr0931}$ vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in grauen Balken dargestellt. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,8.

Weiterhin wurden im vorigen Kapitel zum ersten Mal Bedingungen identifiziert, unter denen man die Phosphataseaktivität von CiaH untersuchen kann. Wie bereits zuvor beschrieben, nimmt die *cia*-Expression im *ciaH*-Wildtyp von BHI_{Acetat^-} zu BHI-Medium um einen Faktor 1,8 zu (Tab. 4.18). Dies ist das Maß für die Stärke der Phosphataseaktivität von CiaH. Ändert sich dieses Verhältnis im genetischen Hintergrund der verschiedenen *ciaH*-Allele, so gibt dies Aufschluss über Änderungen in den Phosphataseaktivitäten der mutierten CiaH-Proteine.

Zur Untersuchung der Phosphataseaktivität der *ciaH*-Allele wurden die Promotoraktivitäten der *cia*-regulierten Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ in den *S. pneumoniae* R6 und den Stämmen mit klinischen *ciaH*-Allelen sowie mit dem Laborallel *ciaH*306 in BHI- und BHI_{Acetat^-} -Medium gemessen und für jedes *ciaH*-Allel das Verhältnis der Aktivitäten in BHI_{Acetat^-} -Medium zu denen in BHI-Medium bestimmt (Tab 4.19). Zur besseren Übersicht sind lediglich die Promotoraktivitäten von P_{htrA} in beiden Medien dargestellt.

Tab. 4.19: Die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae*-Stämmen mit verschiedenen *ciaH*-Allelen in BHI-Medium und BHI_{Acetat}-Medium.

<i>ciaH</i> -Allel	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β-Galaktosidaseaktivität (U) ± Standardabweichung		<i>ciaH</i> -Allel / <i>ciaH</i> -wt	BHI-Medium / BHI _{Acetat} -Medium
		BHI	BHI _{Acetat}		
<i>ciaH</i> -wt	P _{<i>htrA</i>}	398 ± 20	217 ± 26		1,8
	P _{spr0931}	454 ± 34	265 ± 14		1,7
<i>ciaH232</i>	P _{<i>htrA</i>}	357 ± 5	86 ± 3	0,9	4,2
	P _{spr0931}	479 ± 10	110 ± 16	1,1	4,4
<i>ciaH556</i>	P _{<i>htrA</i>}	472 ± 16	154 ± 15	1,2	3,1
	P _{spr0931}	803 ± 33	229 ± 5	1,8	3,5
<i>ciaH1057</i>	P _{<i>htrA</i>}	481 ± 22	133 ± 5	1,2	3,6
	P _{spr0931}	795 ± 21	224 ± 12	1,8	3,5
<i>ciaHTpVT</i>	P _{<i>htrA</i>}	1238 ± 74	649 ± 138	3,1	1,9
	P _{spr0931}	1689 ± 72	1081 ± 66	3,8	1,6
<i>ciaH306</i>	P _{<i>htrA</i>}	4288 ± 245	5266 ± 277	10,8	0,8
	P _{spr0931}	4037 ± 260	5064 ± 397	8,9	0,8

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI- und BHI_{Acetat}-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8. Die β-Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Die Daten für OD₆₀₀ von 0,4 können dem Anhang entnommen werden. Das Verhältnis von *ciaH*-Allel/*ciaH*-wt steht als Maß für die Kinaseaktivität von CiaH. Das Verhältnis von BHI_{Acetat}/BHI steht als Maß für die Phosphataseaktivität von CiaH.

In Abb. 4.23 ist zu erkennen, dass die *ciaH*-Allele unterschiedliche Phosphataseaktivitäten von CiaH vermitteln. In Anwesenheit der klinischen Allelen *ciaH232*, *ciaH556* und *ciaH1057* fällt die *cia*-abhängige Promotoraktivität stärker ab als in Anwesenheit des Wildtyp-Allels. Am deutlichsten wird dies bei *ciaH232*. Mit diesem Allel wird durch Acetat die Phosphataseaktivität mehr als doppelt so stark stimuliert wie beim Wildtyp-Allel. Da durch *ciaH232* die Kinaseaktivität von CiaH offensichtlich nicht verändert ist, jedoch die Phosphataseaktivität durch Acetat stärker stimuliert wird als bei *ciaH*-wt, könnte dies ein Hinweis für die durch *ciaH232* verursachte Aktivitätsabnahme von CiaR in C+Y-Medium sein. Da in diesem Medium Acetat vorhanden ist, könnte dort die Phosphataseaktivität stimuliert werden, was sich in der Aktivitätsabnahme zeigt. Die Phosphataseaktivität von CiaH wird durch die Allele *ciaH556* und *ciaH1057* ebenfalls fast um den Faktor 2 stärker stimuliert. Diese beiden Mutationen beeinflussen also die Kinase- und Phosphataseaktivität von CiaH. Die Änderung der Promotoraktivität, die durch *ciaHTpVT* vermittelt wird, ist der des Wildtyp-Allels ähnlich. Demnach bleibt durch *ciaHTpVT* die Phosphataseaktivität unverändert, lediglich die Kinaseaktivität wird erhöht.

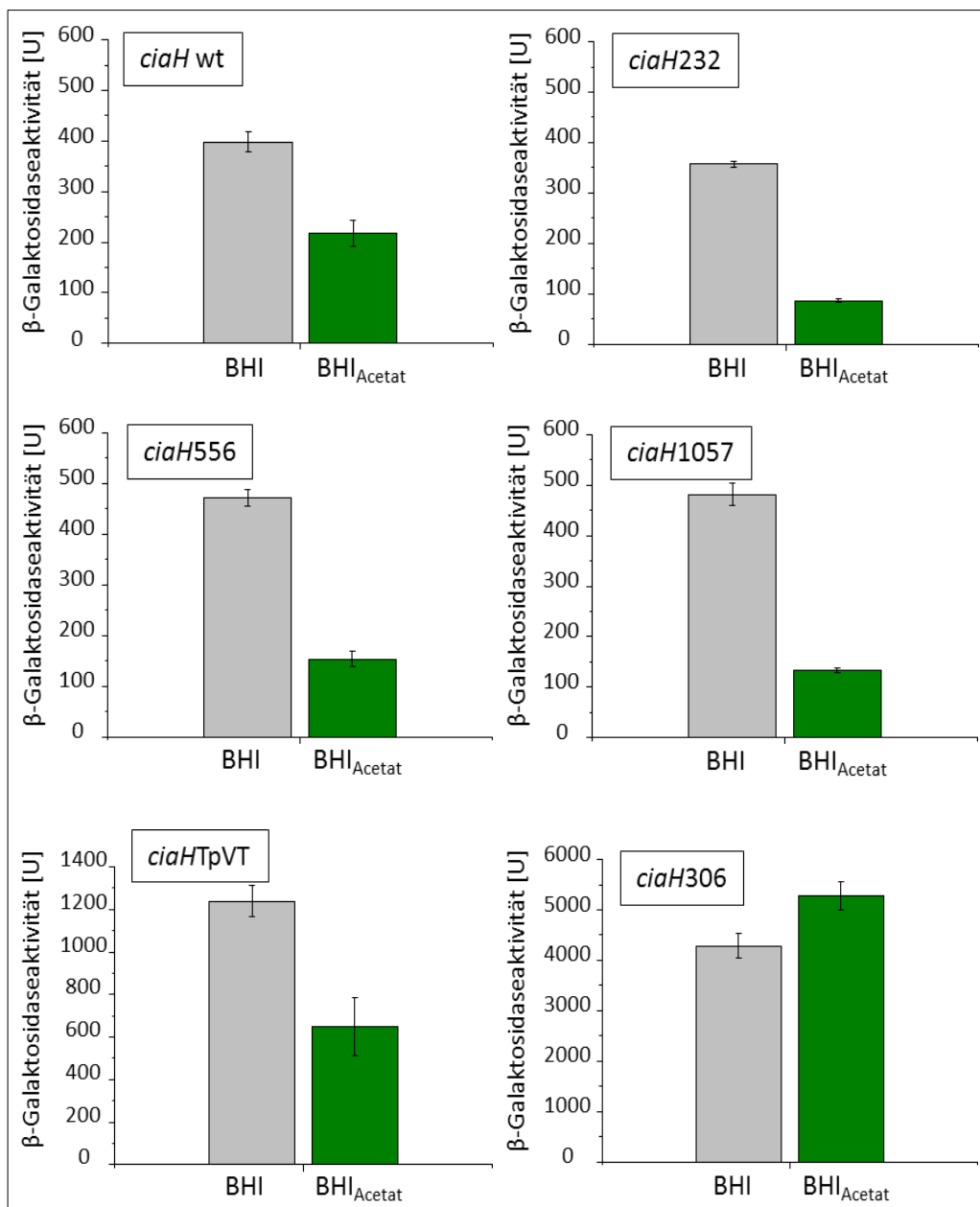


Abb. 4.23: Der Einfluss der klinischen *ciaH*-Allele auf die Phosphataseaktivität von CiaH. Gezeigt ist jeweils der Vergleich der durch P_{htrA} vermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten des Wildtyps R6 (RKL43, RKL30) und den Stämmen mit den klinischen *ciaH*-Allelen *ciaH232* (RKL248, RKL249), *ciaH556* (RKL254, RKL255), *ciaH1057* (RKL257, RKL258), *ciaHTpVT* (RKL251, RKL252) und dem Laborallel *ciaH306* Allel (RKL188, RKL189) in BHI- (graue Säulen) und BHI_{Acetat}-Medium (grüne Säulen). Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U). Die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8.

Überraschend waren die Promotoraktivitäten des Laborallels *ciaH306*, das zur Kontrolle in dieser Arbeit verwendet wurde. Im Gegensatz zu den klinischen Allelen nimmt hier in BHI_{Acetat}-Medium die *cia*-abhängige Promotoraktivität zu. Demnach ist dieses Allel bzgl. seiner Phosphataseaktivität nicht

mehr funktionell. Vielmehr wird durch Acetat die ohnehin bereits stark ausgeprägte Kinaseaktivität in *ciaH306* zusätzlich stimuliert.

Anhand dieser Experimente war zum ersten Mal die Überprüfung der Eigenschaften der *ciaH*-Varianten bzgl. deren Kinase- und Phosphataseaktivität möglich. In *ciaH232*, *ciaH556* und *ciaH1057* wird durch Acetat die Phosphataseaktivität stärker stimuliert als im Wildtyp-Allel. *CiaH556* und *ciaH1057* besitzen zudem leicht erhöhte Kinaseaktivität. Die Phosphataseaktivität von *ciaHTpVT* ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert, jedoch ist dessen Kinaseaktivität erhöht. In dem hier getesteten Laborallel *ciaH306* ist bei *CiaH* die Kinaseaktivität stark erhöht während die Phosphataseaktivität offensichtlich nicht funktionell ist.

5. Diskussion

5.1 Acetylphosphat, die alternative Phosphatquelle für CiaR

In vorliegender Arbeit erfolgte die Charakterisierung der Aktivierung des Response Regulators CiaR in *S. pneumoniae* R6. Diese wurde unter den Aspekten verschiedener klinischer *ciaH*-Allele und unabhängig von CiaH überprüft, wobei in letztgenanntem Fall die Rolle von Acetylphosphat eingehend untersucht wurde. In Zwei-Komponenten Systemen erfolgt die Aktivierung des Response Regulators gewöhnlich durch eine Phosphotransferreaktion von der Sensorkinase zum Response Regulator. Dennoch existieren einige Beispiele für Phosphorylierungen von Response Regulatoren unabhängig von der korrespondierenden Sensorkinase (Laub & Goulian, 2007; Wolfe, 2010) Das CiaRH-System ist unter allen Wachstumsbedingungen und auch unabhängig von CiaH stets aktiv (Halfmann *et al.*, 2011). CiaR liegt in seinem aktiven Zustand phosphoryliert vor. Daher muss neben CiaH eine alternative Phosphatquelle als Phosphodonor für CiaR existieren. Zur CiaH-unabhängigen Phosphorylierung von CiaR sind zwei Wege vorstellbar. Eine Möglichkeit ist die Phosphorylierung über Crosstalk durch eine nicht-korrespondierende Sensorkinase (Laub & Goulian, 2007). Des Weiteren wurde die niedermolekulare, hochenergetische Verbindungen Acetylphosphat als Phosphodonor in Betracht gezogen (Lukat *et al.*, 1992; Wanner, 1992). Frühere Studien zeigten mehrere Hinweise für Acetylphosphat als alternative Phosphatquelle. Mittels Bandshift-Assays wurde gezeigt, dass die Affinität von CiaR zu seiner DNA-Bindestelle durch Acetylphosphat deutlich erhöht wird. Hierzu ist der konservierte Aspartatrest an Position 51 nötig, die Phosphorylierungsstelle von CiaR (Halfmann *et al.*, 2011).

Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Aspekt der Phosphorylierung von CiaR durch Acetylphosphat *in vivo*. Genetische Manipulationen des SpxB-Pta-AckA-Wegs bewirkten das Erzeugen variabler zellulärer Acetylphosphatmengen in *S. pneumoniae*, die sich in drei Zehnerpotenzen unterschieden. In drei Derivaten konnte die AcP-Menge auf einen sehr niedrigen Prozentsatz verringert werden. Hierbei handelt es sich um die Derivate mit der Einzeldelation von *spxB* (4%), der Doppeldelation von *spxB* und *pta* (3%) sowie der Deletion aller drei Gene *spxB*, *pta* und *ackA* (2,5%). Die *pta*-Deletion alleine wirkt sich dagegen nicht auf die AcP-Synthese aus. Eine Akkumulation von Acetylphosphat wurde durch das Inaktivieren von *ackA* verursacht, wenn mindestens eins der beiden Gene *spxB* oder *pta* funktionell waren. Diese Daten bestätigen die wichtige Funktion der Acetatkinase in Pneumokokken zur Umwandlung von Acetylphosphat in Acetat zur ATP-Erzeugung. In *S. pneumoniae* ist hauptsächlich die Pyruvatoxidase für die AcP-Synthese verantwortlich. Sie wird auch als das Schlüsselenzym der AcP-Synthese bezeichnet (Pericone *et al.*, 2003; Ramos-Montanez *et al.*, 2010).

Die Acetylphosphatmengen in R6-Derivaten differieren leicht mit denen in D39-Derivaten (Tab. 5.1). Dort führt das Inaktivieren von *spxB* zum Abfall der AcP-Menge auf 15% bis 20 %. Das Inaktivieren von *pta* zusammen mit *spxB* bewirkt zusätzlich die Reduktion auf 8%. Dass dieser Abfall in den R6-Derivaten nicht sichtbar wurde, könnte mit Messungenauigkeiten zusammenhängen, da man sich hier nahe am Detektionslimit dieser Messmethode befand.

Ein deutlicher Unterschied der relativen AcP-Mengen liegt bei der Doppeldeletion von *spxB* und *ackA* vor. Im Vergleich zum Wildtyp beträgt sie in *S. pneumoniae* R6 die Hälfte, wohingegen sie im D39-Derivat um fast das Doppelte ansteigt. Ausgehend von der *spxB*-Deletion bewirkt die Inaktivierung von *ackA* in R6 und D39 eine Erhöhung von Acetylphosphat um die 11 bis 15-fache Menge. Die Diskrepanzen hängen daher eher mit den unterschiedlichen *spxB*-Allelen beider Stämme zusammen (Ramos-Montanez *et al.*, 2008). Das *spxB*-Allel in *S. pneumoniae* D39 kodiert für eine Pyruvatoxidase, die drei- bis viermal weniger aktiv ist als die von dem *spxB*-Allel in *S. pneumoniae* R6 kodierte (Belanger *et al.*, 2004). Da SpxB den Großteil der Acetylphosphatproduktion ausmacht, könnten sich unterschiedlich aktive Varianten des Enzyms auf die AcP-Gesamtmenge auswirken. Die Pyruvatoxidase in *S. pneumoniae* R6 synthetisiert offenbar mehr Acetylphosphat als die SpxB-Variante in *S. pneumoniae* D39, so dass sich die Doppelinaktivierungen von *spxB* und *ackA* in beiden Stämmen auf die relativen AcP-Mengen umgekehrt auswirken könnten. Dies könnte zudem eine Erklärung für den drastischeren Abfall der AcP-Mengen durch die *spxB*-Einzelinaktivierung in *S. pneumoniae* R6 sein. Durch Ersetzen des *spxB*_{R6}-Allels mit *spxB*_{D39} und anschließenden AcP-Bestimmungen könnte dies überprüft werden. Des Weiteren muss bedacht werden, dass sich die Menge an gebildetem Acetylphosphat in den verwendeten Medien auch bereits im Wildtyp unterscheidet (Tab. 4.16).

Tab. 5.1 Relativer Gehalt an Acetylphosphat in Mutanten des SpxB-Pta-AckA-Wegs

<i>spxB</i>	Anwesenheit des Gens		Relative AcP-Menge zum Wildtyp-Stamm	
	<i>pta</i>	<i>ackA</i>	R6 ¹	D39 ²
-	+	+	0,037	0,18
+	-	+	1,3	1,0
-	+	-	0,54	1,9
-	-	+	0,030	0,08
-	-	-	0,025	0,07
+	+	-	7,7	---
+	-	-	6,1	---

¹Die Daten wurden Tab. 4.7 entnommen;

²Die Daten wurden von einer Studie über *S. pneumoniae* D39 entnommen (Ramos-Montanez *et al.*, 2010); die AcP-Bestimmung erfolgte dort nach Wachstum in BHI-Medium bis zu einer OD₆₂₀ von 0,2.

Die Inaktivierung des SpxB-Pta-AckA-Weges und die damit einhergehende Reduktion von Acetylphosphat bewirkt eine drastische Abnahme der CiaH-unabhängigen CiaR-Aktivität. Dies ist ein

deutlicher Hinweis darauf, dass Acetylphosphat als alternative Phosphatquelle agiert. Diese Beobachtungen stimmen mit anderen *in vivo* Studien über die Aktivierung von Response Regulatoren durch Acetylphosphat überein (Gueriri *et al.*, 2008; Hutchings *et al.*, 2006; Ramos-Montanez *et al.*, 2010; Wolfe, 2010).

CiaR zeigte allerdings eine noch geringe Aktivität, bei der es sich vermutlich um die Restaktivität des unphosphorylierten Response Regulators handelt. Denn auch *in vitro* besitzt CiaR in seiner unphosphorylierten Form eine schwache Affinität zu seiner DNA-Bindestelle (Halfmann *et al.*, 2011). Dass diese Aktivität höher als die der CiaR_{D51A}-Variante ist (Halfmann *et al.*, 2011), könnte darauf zurückzuführen sein, dass das unphosphorylierte CiaR aktiver als seine D51A-Variante ist. Neben der ausbleibenden Phosphorylierung könnte sich die Mutation von Aspartat zu Alanin aufgrund struktureller Änderungen zusätzlich negativ auf die Aktivität auswirken. Eine weitere Möglichkeit für die Restaktivität könnte durch Phosphorylierung über schwachen Crosstalk mit einer nicht korrespondierenden Sensorkinase begründet liegen.

Einen weiteren Hinweis auf Acetylphosphat als alternativen Phosphodonor wurde anhand der Experimente mit verschiedenen Wachstumsmedien erzielt (Kapitel 4.2.8). In BHI-Medium ist das Aufrechterhalten der permanenten CiaR-Aktivität nur in Anwesenheit von CiaH möglich. In Abwesenheit von CiaH beträgt sie lediglich 13% der Aktivität des Wildtyps. In C+Y-Medium hingegen ist sie ohne CiaH leicht erhöht (Halfmann *et al.*, 2011). Die abweichenden AcP-Mengen spielen hierbei sicherlich eine bedeutende Rolle. *S. pneumoniae* R6 produziert in BHI-Medium eine AcP-Menge, die lediglich 35% der in C+Y-Medium produzierten Menge entspricht (Tab. 4.17). Während in C+Y-Medium genügend Acetylphosphat erzeugt wird um die CiaR-Aktivität unabhängig von CiaH auf hohem Niveau zu halten, reicht die AcP-Menge in BHI-Medium lediglich für eine geringe Expression des *cia*-Systems aus.

Auch in BHI-Medium ist die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität mit inaktiviertem SpxB-Pta-AckA-Weg niedriger als mit funktionellem Reaktionsweg (Günzler, 2010). Die Reduktion ist hierbei jedoch weniger stark ausgeprägt als in C+Y-Medium, was auf die *per se* niedrigen AcP-Mengen in BHI-Medium zurückgeführt werden kann.

In einigen Studien mit *E. coli* wurde eine starke Abhängigkeit der Acetylphosphatproduktion von der verwendeten C-Quelle im Wachstumsmedium gezeigt, wodurch sich Änderungen von Acetylphosphatkonzentrationen um mindestens eine Zehnerpotenz erzeugen ließen (McCleary & Stock 1994; Keating, 2008; Wolfe 2005). Die Verwendung von Galactose statt der klassischen C-Quelle Glucose in C+Y-Medium bewirkte in *S. pneumoniae* eine schwache, nicht signifikante Erhöhung der Acetylphosphatproduktion ($p=0,18$). Es handelt sich hierbei um eine Andeutung, dass in Anwesenheit von Galactose die leichte Erhöhung von Acetylphosphat an der hohen CiaH-unabhängigen CiaR-Aktivität beteiligt ist.

Im genetischen Hintergrund der *ciaH*-Deletion war die Darstellung der *ackA*-Deletion, die zur Akkumulation von Acetylphosphat führt, durch die zusätzliche Inaktivierung des CiaR regulierten Gens *htrA* möglich. In diesem Derivat kam es zu einer Hyperaktivierung des *cia*-Systems (20x). Allerdings traten auch Suppressormutationen in *ciaR* und *spxB* auf. Aus Einzelkolonien gewonnene Kulturen ohne *ciaH*, *htrA* und *ackA* mit mutiertem *ciaR* bzw. *spxB* zeigten keinerlei oder eine deutliche Reduktion der *cia*-Expression. Die Mutationen in *ciaR* bewirkten den Verlust funktionell essentieller Regionen an CiaR, wie die DNA-Bindedomäne oder die Region um die Phosphorylierungsstelle. Die Auswirkungen der Missense Mutationen an *spxB* sind bisher nicht bekannt. Die Mutation der geladenen AS Aspartat zur polaren AS Tyrosin an Stelle 90 befindet sich im katalytischen Kern von SpxB (Spellerberg *et al.*, 1996) und könnte sich aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften beider Aminosäuren auf die Aktivität auswirken. Die Mutation von Cystein zu Tyrosin befindet sich in der TPP-bindenden Domäne von SpxB (Spellerberg *et al.*, 1996) und zudem zwei Aminosäuren vor dem für die SpxB-Aktivität wichtigen Prolin (AS 449). Die Substitution von Prolin zu Leucin an dieser Stelle führte zur Aktivitätsabnahme von SpxB (Ramos-Montanez *et al.*, 2008). Vermutlich führen sie zur Reduktion der SpxB-Aktivität und damit zur Verringerung der AcP-Produktion. Es ist unklar, zu welchem Zeitpunkt die Suppressormutationen während des β -Galaktosidaseassays entstanden sind, so dass diese bereits eine Auswirkung auf die Aktivitätsmessung der Ausgangskultur haben könnten. Dennoch ist ein deutlicher Aktivitätsanstieg vorhanden. Dies deutet an, dass Acetylphosphat von CiaR als Phosphatquelle verwendet wird. Die durch die AcP-Akkumulation verursachte Hyperaktivierung von CiaR bei fehlender Sensorikase wird von den Zellen offensichtlich über zwei Wege unterdrückt; durch die CiaR-Aktivität inhibierende Mutationen an *ciaR* selbst oder die Acetylphosphatproduktion verringernde Mutationen an SpxB.

Diese Beobachtungen zeigen, dass Acetylphosphat *in vivo* eine alternative Phosphatquelle für CiaR darstellt. Steht die Phosphorylierung von CiaR nicht unter der Kontrolle von CiaH, wirken sich die Reduktion von Acetylphosphat negativ und die Akkumulation von Acetylphosphat positiv auf die CiaR-Aktivität aus.

5.2 Synthetische Lethalität durch die Kombination von *ackA*- und *ciaH*-Deletion

Im Zuge dieser Arbeit zeigte sich ein häufig als synthetische Lethalität bezeichnetes Phänomen (Lucchesi, 1968; Tucker & Fields, 2003). Die Kombination der Deletion von *ciaH* und *ackA* führte zum Zelltod von *S. pneumoniae*-Kolonien auf Blutagar, während beide Deletionen alleine nicht lethal waren. Die synthetische Lethalität zeigte sich auch wenn *ciaH* und *ackA* zusammen mit *pta* deletiert wurden, jedoch nicht zusammen mit *spxB*. Die Deletion von *pta* und *ackA* bewirkt wie die Einzeldelation von *ackA* die Akkumulation von Acetylphosphat über das Niveau des Wildtyps hinaus. Die Deletion von *ackA* mit *spxB* verursacht dies jedoch nicht. Es konnte ausgeschlossen werden, dass das von SpxB produzierte H₂O₂ für den Zelltod verantwortlich ist, da Katalase im Blutagar die Lethalität ebenfalls nicht verhinderte. Zudem waren Zellen mit einer *ackA*-Deletion im genetischen Hintergrund einer *ciaR*-Deletion und von *ciaRH*-wt lebensfähig. Daher lag die Vermutung nahe, dass die Akkumulation von Acetylphosphat eine Ursache der synthetischen Lethalität darstellt, vermutlich aufgrund der fehlenden Kontrolle der CiaR-Phosphorylierung durch CiaH und die dadurch verursachte Hyperaktivierung von CiaR. So könnte die Hyperaktivierung dafür sorgen, dass die Überexpression eines oder mehrerer Genprodukte des *cia*-Regulons schädlich für die Zellen ist.

Der Response Regulator CiaR reguliert die Expression von 15 Promotoren, die die Transkription von 24 Genen kontrollieren (Halfmann *et al.*, 2007b). Die Gengruppen *ccnA-E* und *htrA* innerhalb des *cia*-Regulons sind an der Ausbildung der meisten durch CiaRH verursachten Phänotypen beteiligt. Die Gengruppe *ccnA-E* enthält fünf kleine, nicht kodierende, regulatorische RNAs, die wegen ihrer Abhängigkeit von CiaR als csRNAs (für *cia* dependent *s*mall RNAs) bezeichnet werden. Die dazu korrespondierenden Gene lauten *ccnA-E* (für *cia*-*c*ontrolled *n*on coding RNA). Sie besitzen eine Größe von 87-151 nt und weisen eine große Ähnlichkeit untereinander auf. Nach *in silico*-Berechnungen bilden sie zwei Stammschleife-Strukturen aus, die eine ungepaarte Region flankieren. Sie sind in intergenen Regionen lokalisiert und weisen Sequenzbereiche mit Komplementarität zur Shine-Dalgarno-Sequenz und Startcodons auf und zählen zu den *in trans* agierenden sRNAs (Halfmann *et al.*, 2007b). Kleine RNAs dieser Gruppe besitzen häufig eine posttranskriptionelle, regulatorische Funktion der Genexpression, indem sie an Sequenzbereiche von mRNAs binden, und dadurch deren Translation beeinflussen (Gottesman & Storz, 2010). Zudem zählen ihre Promotoren zu den am stärksten von CiaR regulierten (Halfmann *et al.*, 2007b). Im Zuge mehrerer Arbeiten wurden posttranskriptionelle Genregulationen durch die csRNAs nachgewiesen. Dazu gehören mit *comC* und *comX* (indirekte Regulation) Kompetenzgene sowie mit *spr0081*, *shetA* (*spr0371*), *brnQ* (*spr0551*), *nirC* (*spr1097*) Gene, die vermutlich für Transporter von Zucker, Säuren und Aminosäuren kodieren (Kaysen, 2012; Kirsch, 2011; Kovács, 2009; Thronicke, 2010) und *spr0159*, ein Regulator mit DNA-Bindedomäne (Gartmann, 2012). Es kann davon ausgegangen werden, dass weitere bisher

unbekannte Zielgene der csRNAs existieren. Aufgrund der Regulation von Nährstofftransportern könnte die Überexpression der csRNAs das Zellwachstum inhibieren. Dennoch waren Zellen ohne die funktionellen Gene *ackA*, *ciaH* und *ccnA-E* ebenfalls nicht lebensfähig, so dass die Überexpression der csRNAs nicht die für die Lethalität verantwortliche Komponente des *cia*-Regulons darstellt.

Bei HtrA handelt es sich um ein Protein der HtrA-Familie, das in Gram positiven und Gram negativen Bakterien wie auch in Eukaryonten existiert. HtrA besitzt Protease- und Chaperonaktivität, wobei das Umschalten von einer Funktion zur anderen temperaturabhängig ist (Spiess *et al.*, 1999). Proteine dieser Familie spielen vermutlich eine Rolle bei der Qualitätskontrolle von Proteinen, indem sie teilweise entfaltete Proteine degradieren oder reparieren (Kim & Kim, 2005; Kolmar *et al.*, 1996). In *S. pneumoniae* liegt HtrA extrazellulär, aber membranassoziiert vor (Sebert *et al.*, 2005) und ist am Äquator und am Septum sich teilender Zellen lokalisiert (Tsui *et al.*, 2011). Die Substrate von HtrA sind in *S. pneumoniae* bisher nicht bekannt, jedoch gibt es Hinweise auf eine Rolle bei der Qualitätskontrolle von Proteinen, die durch die Sec-Translokase ans Zellseptum exportiert werden (Tsui *et al.*, 2011). Zudem besitzt HtrA Relevanz für das Wachstum von *S. pneumoniae* unter Hitze- und oxidativem Stress (Ibrahim *et al.*, 2004a; Ibrahim *et al.*, 2004b), wodurch auch ein Zusammenhang zu SpxB bestehen könnte. Aufgrund seiner proteolytischen Aktivität und seiner vermutlich geringen Substratspezifität in *S. pneumoniae* war vorstellbar, dass durch die Überexpression von HtrA essentielle Proteine unspezifisch abgebaut werden, so dass die Zellen absterben. Beispielsweise wurde beobachtet, dass in einem Stamm mit hyperaktivem *cia*-System die Proteinmenge des essentiellen Proteins PBP2x abnimmt. Die Deletion von *htrA* in diesem Stamm führte wiederum zur Zunahme der PBP2x-Menge. Zudem traten bei der Darstellung eines *S. pneumoniae*-Stammes, in dem *htrA* unter Kontrolle des im Vergleich zum nativen Promotor starken P_{vegM} und dem Promotor der 16S-rRNA ektopisch überexprimiert wurde, stets Mutationen in *htrA* auf (Peters K., persönliche Mitteilung). Dies deutet stark daraufhin, dass eine Überexpression von *htrA* schädlich für *S. pneumoniae* sein kann.

S. pneumoniae-Kolonien ohne *ackA*, *ciaH* und *htrA* waren auf Blutagar lebensfähig und zeigten ein homogenes Koloniebild. Während des Wachstums in Flüssigmedium trat jedoch eine genetische Instabilität auf, mit Suppressormutationen in *ciaR* und *spxB*. Die Überexpression von HtrA stellt demnach die hauptsächliche Komponente des *cia*-Regulons dar, die für die synthetische Lethalität verantwortlich ist. Zwar treten Suppressormutationen auf, doch durch Inaktivieren von *htrA* konnte zumindest die Darstellung lebensfähiger Zellen erzielt werden. Die durch die Akkumulation von Acetylphosphat bewirkte Hyperaktivierung von CiaR ist offensichtlich weiterhin zu hoch, so dass diese durch Mutationen in *spxB* oder *ciaR* reduziert bzw. komplett inhibiert wird. Das Auftreten von Suppressormutationen in *ciaR* erinnert an die genetische Instabilität von *S. pneumoniae*-Derivaten mit stark aktivierenden *ciaH*-Allelen, in denen Missense und Nonsense Mutationen in *ciaR* und *ciaH*

auftreten; insbesondere da sich die Hyperaktivierung von CiaR in *S. pneumoniae* ohne *ciaH*, *ackA* und *htrA* im Bereich der Derivate mit *ciaH102* und *ciaH202* befindet (Müller *et al.*, 2011).

Insgesamt gesehen wurde keine reine Flüssigkultur von *S. pneumoniae* ohne *ciaH*, *ackA* und *htrA* erhalten. Ein ähnlicher Fall trat in einer Studie zur Untersuchung der Rolle von Acetylphosphat als alternativer Phosphodonator mit dem Zwei-Komponenten System NtrC/NtrB von *E. coli* auf. Bei NtrB handelt es sich um eine bifunktionelle Sensorkinase. Zellen mit Deletionen von *ackA* und *glnL*, dem für die SK NtrB kodierenden Gen, wuchsen unabhängig vom verwendeten Wachstumsmedium sehr schwach. Zwar waren diese Zellen nicht lethal, jedoch akkumulierten hier rasch Pseudorevertanten, die wiederum besser wuchsen. Eine reine Flüssigkultur des Stammes mit *ackA*- und *glnL*-Deletion konnte nicht isoliert werden. Ähnlich wie in vorliegender Arbeit zeigten Expressionsmessungen mit unreinen Kulturen eine erhöhte NtrC-Aktivität (Feng *et al.*, 1992).

Die Ursache der genetischen Instabilität von *S. pneumoniae* ohne *ciaH*, *ackA* und *htrA* in Flüssigmedium muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Möglicherweise spielen weitere Genprodukte des *cia*-Regulons hierbei eine Rolle. Vorstellbar ist wiederum ein Einfluss der csRNAs, der dann allerdings nicht auf Blutagar auftritt, sondern in C+Y-Medium. Ein auffälliger Unterschied zwischen D-Agar und C+Y-Medium zeigt sich in den Aminosäuren. Während in D-Agar die Aminosäuren in Form von Peptonen, einem Gemisch aus Polypeptiden und Aminosäuren, vorliegen (Tab. 3.14), existieren in C+Y-Medium hauptsächlich einzelne Aminosäuren und Hefeextrakt (Tab. 3.12). *S. pneumoniae* ist auxotroph für die Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin (Kazmierczak *et al.*, 2009). Diese werden von BnrQ transportiert, dessen Expression von den csRNAs negativ reguliert wird (Kirsch, 2011). Daher könnte die Überexpression der csRNAs in C+Y-Medium einen Wachstumsdefekt verursachen, jedoch nicht auf D-Agar. Durch die Kombination der Deletion der Gengruppen *htrA* und *ccnA-E* zusammen mit den Deletionen von *ackA* und *ciaH* könnte diese Vermutung überprüft werden.

5.3 Der Einfluss von Acetat

Durch genetische Manipulation des AcP-Syntheseweges in Kombination mit Aktivitätsmessungen der CiaR-regulierten Promotoren wurde in Abwesenheit von CiaH Acetylphosphat als wesentliche Phosphatquelle von CiaR identifiziert. Dennoch zeigten sich weitere Aspekte, die offensichtlich die CiaR-Phosphorylierung beeinflussen.

So stellt sich die Frage nach dem stimulierenden Effekt von Acetat auf die CiaH-unabhängige CiaR-Aktivität. Die CiaR-Aktivierung kann durch Acetat ohne funktionellen SpxB-Pta-AckA-Weg stimuliert werden (Abb. 5.1). Aufgrund der Genetik kann Acetat die AcP-Produktion im Stamm ohne AcP-Syntheseweg nicht beeinflussen, so dass hier ein alternativer Weg existieren muss. Im R6-Stamm mit *ciaH⁻ spxB⁻ pta⁻ ackA⁺*, also in Anwesenheit der Acetatkinase existiert zudem ein zusätzlicher Effekt, da hier die CiaR-Aktivierung noch stärker ist als in R6 mit *ciaH⁻ spxB⁻ pta⁻ ackA⁻* (Kapitel 5.4).

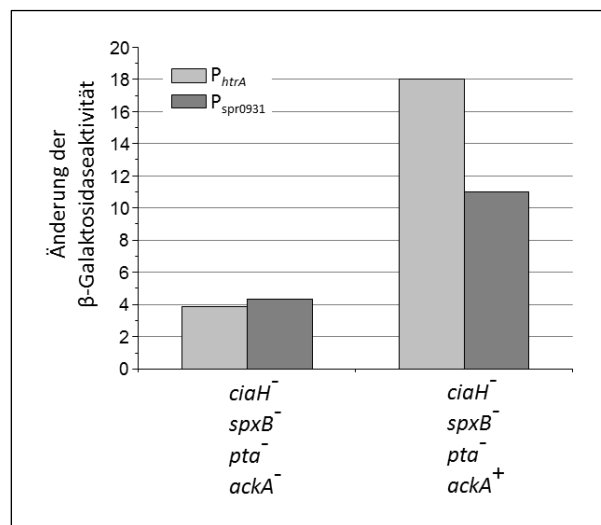


Abb. 5.1: Stimulierender Effekt von Acetat auf die CiaR-Aktivität. Gezeigt ist die Änderung der durch P_{htrA} und P_{spr0931} vermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*-Derivaten mit verschiedenen Kombinationen von Deletionen im AcP-Syntheseweg. Die Abbildung zeigt die relative Änderung der β -Galaktosidaseaktivitäten von C+Y-Medium ohne Acetat zu C+Y-Medium mit 50 mmol/l Acetat (vgl. Tab. 4.12, 4.14, 4.15).

Eine denkbare Möglichkeit für die CiaR-Aktivierung in R6 mit *ciaH⁻ spxB⁻ pta⁻ ackA⁻* wäre die Aktivierung durch Acetylierung. Die Acetylierung von Response Regulatoren wurde an dem Beispiel des Chemotaxis-Proteins CheY in *E. coli* gezeigt, wobei CheY seine Autoacetylierung unter Verwendung von Acetyl-CoA als Acetyldonor katalysiert (Barak *et al.*, 1992; Barak *et al.*, 2006). Dies

ist für CiaR sehr unwahrscheinlich, da im Stamm ohne AcP-Syntheseweg die Umwandlung von Acetat in Acetyl-CoA aufgrund des Fehlens von *pta* und *ackA* nicht stattfindet.

Eine weitere Möglichkeit wäre Crosstalk durch eine andere Sensorkinase, deren Kinaseaktivität durch Acetat stimuliert wird. Allgemein wird davon ausgegangen, dass Crosstalk zwischen zwei verschiedenen Zwei-Komponenten System selten ist und oftmals nur durch die Darstellung von Mutanten sichtbar wird, die eine effektive Signalübertragung zwischen nicht korrespondierenden Partnern zulassen oder nach Überexpression einer Sensorkinase (Laub & Goulian, 2007). Beispielsweise besteht ein Crosstalk zwischen den Zwei-Komponenten Systemen CpxAR und EnvZ/OmpR in *E. coli* nur dann, wenn die Sensorkinase EnvZ und der Response Regulator OmpR gleichzeitig inaktiviert sind (Siryaporn & Goulian, 2008). Dies wird darauf zurückgeführt, dass Sensorkinasen *in vitro* eine höhere kinetische Präferenz zur Phosphorylierung ihres korrespondierenden Partners besitzen als zu nicht korrespondierenden Response Regulatoren, so dass der Phosphotransfer zwischen nicht korrespondierenden Partnern *in vivo* zu langsam ist um eine relevante Auswirkung auf die Aktivierung zu haben. Zwischen korrespondierenden Partnern eines TCS besteht zudem eine höhere Bindungsaffinität als zwischen nicht korrespondierenden Partnern. Des Weiteren kann Crosstalk aufgrund der Bifunktionalität von Sensorkinasen unterdrückt werden (Laub & Goulian, 2007; Skerker *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2005). Zur Identifizierung eines Crosstalks zwischen zwei nicht korrespondierenden Partnern müssen daher offensichtlich die Sensorkinase und der Response Regulator des jeweiligen Partners inaktiviert werden. Allerdings existiert eine Studie in *E. coli*, in der Crosstalk zwischen EnvZ und CpxR trotz der Anwesenheit des Partners (OmpR) beschrieben wurde. In einem Stamm ohne *cpxA* und *ackA-pta* wird die CpxR-abhängige Promotoraktivität von P_{cpxP} durch EnvZ um das 4-fache erhöht. Diese entspricht allerdings nur einem Bruchteil der Stimulierung, die im selben genetischen Hintergrund mit zusätzlicher *ompR*-Inaktivierung auftritt. Dennoch findet Crosstalk trotz der Anwesenheit des korrespondierenden Partners der Sensorkinase statt (Groban *et al.*, 2009).

Möglich ist daher, dass in *S. pneumoniae* durch Acetat die Kinaseaktivität einer Sensorkinase stimuliert wird und trotz der Anwesenheit ihres Partners ein Crosstalk mit CiaR erkennbar ist, vorausgesetzt des Fehlens von CiaH. Dieser Crosstalk sollte dann noch deutlicher ausgeprägt sein, wenn der korrespondierende RR der bisher unbekanntes SK und CiaH zusammen inaktiviert sind.

Ein Crosstalk einer der übrigen zwölf Sensorkinasen in *S. pneumoniae* mit CiaR wurde bisher nicht nachgewiesen. Es existieren Vermutungen bzgl. einer Verbindung von CiaRH zu TCS03, TCS13 (Dawid *et al.*, 2009; Heintz, 2006) und TCS12 (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004). Bei TCS12 handelt es sich um ComDE, die zentrale Komponente zur Induktion der Kompetenzentwicklung von *S. pneumoniae* (Claverys & Håvarstein, 2002). Neuere Untersuchungen zeigten einen positiven Einfluss von ComDE auf die CiaR-Aktivität, der jedoch hauptsächlich von CiaH

abhängig ist (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Kaysen, 2012; Müller, 2011; Peterson *et al.*, 2004). 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). TCS13 induziert die Expression eines Bacteriocinclusters (Lux *et al.*, 2007).

Crosstalk findet aufgrund der spezifischen Interaktion eher zwischen TCS mit hoher Ähnlichkeit zueinander statt (Laub & Goulian, 2007). Möglicherweise wird er zu einem Response Regulator der gleichen Familie bevorzugt. CiaR gehört zur OmpR-Familie der Response Regulatoren. In *S. pneumoniae* zählen RR04, RR02, RR10, RR06 und RR08 ebenfalls zu dieser Familie (Lange *et al.*, 1999) und weisen zudem in dieser Reihenfolge die höchste Sequenzähnlichkeit zu CiaR auf. Das TCS04 (PnpRS) hat einen Einfluss auf die Virulenz und Stressresistenz von *S. pneumoniae* (McCluskey *et al.*, 2004). Das TCS 02 (WalRK, YycFG) spielt eine bedeutende Rolle beim Aufrechterhalten der Zellwandhomöostase und bei der Antwort auf Zellwandstress (Dubrac & Msadek, 2008; Winkler & Hoch, 2008). Beim RR WalR handelt es sich um ein essentielles Gen (Lange *et al.*, 1999). TCS10 (VncRS) zeigt eine Beteiligung an der Vancomycintoleranz (Haas *et al.*, 2004), TCS08 reguliert Gene eines Phosphotransferasesystems in *S. pneumoniae* (McKessar & Hakenbeck, 2007). Hierbei handelt es sich um Phänotypen, die auch durch CiaRH beeinflusst werden. Eine Verbindung zu CiaRH erscheint daher physiologisch sinnvoll (Müller, 2011).

Offensichtlich wird die Kinaseaktivität der mit CiaR Crosstalk praktizierenden Sensorkinase durch Acetat stimuliert. In *E. coli* existiert ein Beispiel, indem Acetat als physiologischer Stimulus für die Sensorkinase BarA des TCS BarA/UvrY identifiziert (Chavez *et al.*, 2010). Die Sequenzanalyse mit UvrY von *E. coli* und *Bacillus amyloliquefaciens* zeigte recht gute Ähnlichkeit zu RR03 und RR11 von *S. pneumoniae*. Hinweise auf eine Vernetzung von TCS03 mit CiaRH sind bekannt (Heintz, 2006). TCS03 und TCS11 spielen wie CiaRH offensichtlich eine Rolle bei der Vancomycintoleranz von *S. pneumoniae* (Haas *et al.*, 2005), so dass eine Verknüpfung sinnvoll sein könnte.

Zur Identifizierung von Crosstalk-Partnern könnte diese Sensorkinasen als erste Kandidaten überprüft werden. Um nähere Hinweise zu bekommen, könnte ein „Phosphotransfer Profiling“ durchgeführt werden. Hierbei wird in einem *in vitro* Assay mit den aufgereinigten Sensorkinasen und Response Regulatoren von *S. pneumoniae* überprüft, zwischen welchen SK und RR ein Phosphotransfer möglich ist (Laub & Goulian, 2007; Skerker *et al.*, 2005). Des Weiteren könnte ein möglicher Crosstalk überprüft werden, indem die CiaR-Aktivität in Anwesenheit von Acetat in einem Stamm ohne *ciaH* mit der eines Stammes mit Deletion von *ciaH* und einer weiteren Sensorkinase verglichen wird. Vermutlich könnte nach der Identifizierung eines mutmaßlichen Partners dessen korrespondierender RR deletiert werden, so dass der Crosstalk effizienter stattfindet sollte, was sich wiederum in einer Erhöhung der CiaR-Aktivität zeigen würde.

5.4 Die besondere Rolle der Acetatkinase

Eine Besonderheit beim positiven Effekt von Acetat zeigt sich bei der CiaR-Aktivität in dem Derivat von *S. pneumoniae* mit *ciaH⁻ spxB⁻ ptā⁻ ackA⁺*. In diesem Fall wird die CiaR-Aktivität durch Acetat stärker stimuliert als in R6 mit *ciaH⁻ spxB⁻ ptā⁻ ackA⁻* (Abb. 5.1). Daher stellt die Acetatkinase zusammen mit Acetat in dem genetischen Hintergrund von *ciaH⁻ spxB⁻ ptā⁻ ackA⁺* einen zusätzlichen Faktor zur Stimulierung der CiaR-Aktivität dar. Ein Einfluss von Acetat auf die AcP-Mengen existiert den Messungen in vorliegender Arbeit zufolge nicht. Die Zugabe von Acetat bewirkt keinen signifikanten Anstieg von Acetylphosphat im Derivat mit *ciaH⁻ spxB⁻ ptā⁻ ackA⁺* ($p \geq 0,1$). Zudem wurden unter gleichen Bedingungen keine Unterschiede in den AcP-Mengen zwischen R6 *ciaH⁻ spxB⁻ ptā⁻ ackA⁺* und R6 *ciaH⁻ spxB⁻ ptā⁻ ackA⁻* festgestellt ($p = 0,4-0,8$). Da die Messungen jedoch am Detektionslimit dieser Methode erfolgten, kann nicht definitiv ausgeschlossen werden, dass aufgrund gewisser Messungenauigkeit in R6 mit *ciaH⁻ spxB⁻ ptā⁻ ackA⁺* die Acetatkinase eine gewisse Menge an Acetylphosphat produziert, die von CiaR genutzt werden kann. Die gleichbleibende AcP-Menge könnte auch daher rühren, dass Acetylphosphat direkt nach seiner Bildung als Phosphodonor verwendet wird und somit direkt aus der Reaktion entfernt wird. Eine Aktivierung von Response Regulatoren unabhängig von der korrespondierenden Sensorkinase durch Acetat, die über die AcP-Syntheseweg erfolgt, wurde gezeigt; allerdings ohne Bestimmung der AcP-Mengen (Chavez *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010).

Des Weiteren ist ein alternativer Weg zur Phosphorylierung von CiaR vorstellbar. AckA katalysiert seine Autophosphorylierung und liegt als phosphoryliertes Intermediat vor, indem die Phosphatgruppe als hochenergetische Acylbindung an das Protein gebunden ist (Fox *et al.*, 1986). Daher könnte AckA auch direkt als Phosphodonor für CiaR agieren, ohne dass Acetylphosphat als Zwischenprodukt gebildet wird. So wurde beispielsweise in *E. coli* gezeigt, dass AckA unter Verwendung von ATP oder GTP über eine reversible Phosphotransferreaktion mit Enzym I des PTS interagiert (Fox *et al.*, 1986). Daher könnte im speziellen Fall von R6 mit *ciaH⁻ spxB⁻ ptā⁻ ackA⁺* die Acetatkinase als direkte Phosphatquelle für CiaR agieren. Dieser Effekt zeigt sich jedoch nicht, sobald Acetylphosphat für AckA aus dem Stoffwechsel bereitgestellt wird, wie die CiaR-Aktivitäten im R6-Derivat mit *ciaH⁻ spxB⁺ ptā⁺ ackA⁺* zeigen. Die Acetatkinase bevorzugt offensichtlich die Umwandlung von Acetylphosphat in Acetat zur ATP-Generierung. Im genetischen Hintergrund von *spxB⁻ ptā⁻ ackA⁺* ist dieser Reaktionsweg jedoch inaktiviert, so dass AckA aufgrund der Anwesenheit von Acetat die umgekehrte Reaktion bevorzugen könnte.

Dass ein Enzym des Stoffwechsels an der Phosphorylierung von Response Regulatoren beteiligt ist, wurde bisher nicht gezeigt. Allerdings zeigen neuere Studien, dass Proteine des Metabolismus neben ihrer enzymatischen Funktion weitere Aufgaben in der Zelle erfüllen, ein als Moonlighting

bezeichnetes Phänomen (Henderson & Martin, 2011). In grampositiven Bakterien wie *S. pneumoniae* sind die meisten glykolytischen Enzyme an der Zelloberfläche lokalisiert. Beispielsweise ist das für die Enolase kodierende Gen in *S. pneumoniae* essentiell und stellt einen Virulenzfaktor an der Zelloberfläche dar (Bergmann *et al.*, 2001; Eberhard *et al.*, 1999). In *B. subtilis* ist die Enolase Teil des RNA-Degradosom, ein Komplex aus RNA-Helicase, Phosphofruktokinase und Enolase (Lehnik-Habrink *et al.*, 2012). Des Weiteren existieren Beispiele über „Trigger-Enzyme“; bifunktionelle Proteine, die im Metabolismus aktiv sind und zusätzlich an der Kontrolle der Genexpression beteiligt sind, beispielsweise durch Protein-Protein-Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (Commichau & Stülke, 2008). Es kann daher die Hypothese aufgestellt werden, dass es sich bei AckA in *S. pneumoniae* ebenfalls um ein Moonlighting-Enzym handelt, welches eine Funktion bei der Phosphorylierung von Response Regulatoren einnimmt.

Eine Überprüfung der Interaktion von AckA mit CiaR müssen weiterführende Experimente zeigen. Hinweise dazu könnte eine Analyse mittels des Bacterial-two-Hybrid Systems liefern (Karimova *et al.*, 1998), eine Anwendung zum Nachweis von Interaktionen prokaryotischer Proteine, die auf dem Yeast-two-Hybrid basiert (Chien *et al.*, 1991; Fields & Song, 1989).

Dieses System nutzt die Eigenschaft der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* und kann in *E. coli* angewendet werden. Die Adenylatcyclase besteht aus zwei Domänen (T18 und T25), die getrennt voneinander inaktiv sind. Durch die Expression dieser Domänen als Fusionsproteine potentiell interagierender Proteine wird bei einer Interaktion die Funktionalität der Adenylatcyclase wiederhergestellt und ermöglicht die Expression eines cAMP-CRP-abhängigen Reportergens wie beispielsweise *lacZ*. Die Interaktion der Fusionsproteine kann durch die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität mit entsprechenden Kontrollen überprüft werden. (Karimova *et al.*, 1998; Lüttmann *et al.*, 2009). Alternativ könnten Bindungspartner von CiaR mittels eines „Formaldehyd Cross-linkings“ ermittelt werden, indem durch eine Western Blot Analyse mit Antikörpern von CiaR Bindungspartner detektiert und massenspektrometisch identifiziert werden (Klockenbusch & Kast, 2010).

5.5 Die Korrelation der AcP-Menge mit der Aktivierung von CiaR

Die AcP-Mengen in den Derivaten des SpxB-Pta-AckA-Weges korrelieren nicht immer exakt mit den CiaH-unabhängigen CiaR-Aktivitäten. Die Derivate mit kompletter Inaktivierung des AcP-Synthesewegs, der Deletion von *spxB* und der Inaktivierung von *spxB* und *pta* produzieren AcP-Mengen, die auf nahezu gleich niedrigem Niveau liegen ($p \geq 0,2$). Allerdings ist die Reduktion der CiaH-unabhängigen CiaR-Aktivität in den drei Derivaten unterschiedlich stark ausgeprägt. Im Vergleich zum Derivat mit funktionellem AcP-Syntheseweg ist die CiaR-Aktivität durch die komplette Deletion des AcP-Syntheseweges auf 14% herabgesetzt. Sind *spxB* und *pta* inaktiviert, beträgt die Aktivität noch 40%, die *spxB*-Deletion alleine bewirkt eine Abnahme auf 60%.

Hierbei muss bedacht werden, dass diese Daten im klassischen C+Y-Medium mit Acetat (12,5 mmol/l) erzielt wurden, was wiederum die Phosphorylierung von CiaR-Aktivität stimuliert. Daher handelt es sich im genetischen Hintergrund von *ciaH⁻ spxB⁻ pta⁻ ackA⁻* im klassischen C+Y-Medium eher um die CiaR-Restaktivität, die durch den vermutlichen Acetat-vermittelten Kinase-Crosstalk bewirkt wird. Unphosphoryliertes CiaR könnte vielmehr in C+Y-Medium ohne Acetat vorliegen. Die Anwesenheit von Acetat in C+Y-Medium könnte daher auch verantwortlich für die relativ hohe CiaR-Aktivität in R6 mit *ciaH⁻ spxB⁻* und R6 mit *ciaH⁻ spxB⁻ pta⁻* sein.

In diesem Zusammenhang ist auch der Anstieg der CiaH-unabhängigen Promotoraktivität in R6 mit *ciaH⁻ spxB⁻ ackA⁻* im Vergleich zum *ciaH*-Deletionsderivat mit intaktem SpxB-Pta-AckA-Weg auffallend, da die AcP-Menge in erstgenanntem Derivat um die Hälfte verringert ist.

Vor kurzem wurde mittels einer Überexpressionsanalyse von CiaR gezeigt, dass nicht die Acetylphosphatmenge, sondern die CiaR-Menge limitierend für die CiaR-Aktivität ist (Schultchen-Kamp, 2012). Die P_{vegT} vermittelte Überexpression von *ciaR* in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* bewirkt eine 7-fach erhöhte CiaR-Menge. Gleichzeitig ist hierbei die CiaR-Aktivität um das 8 bis 11-fache erhöht (zur Übersicht Abb. 5.2). Des Weiteren ist die CiaR-Aktivität in C+Y-Medium und BHI-Medium unter diesen Bedingungen gleichhoch. Der relative Aktivitätsanstieg ist in BHI-Medium aufgrund der geringen CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* sogar deutlicher ausgeprägt, trotz geringerer AcP-Synthese (Tab. 4.17). Daher ist die hohe CiaR-Aktivität in R6 mit *ciaH⁻ spxB⁻ ackA⁻* weitestgehend nachvollziehbar. Plausibel erscheint dieser Aktivitätsanstieg auch im Vergleich zu R6 mit *ciaH⁻ spxB⁻ ackA⁺*. Durch die Inaktivierung von *ackA* im genetischen Hintergrund von *ciaH⁻ spxB⁻* akkumuliert Acetylphosphat und erhöht damit die CiaR-Aktivität.

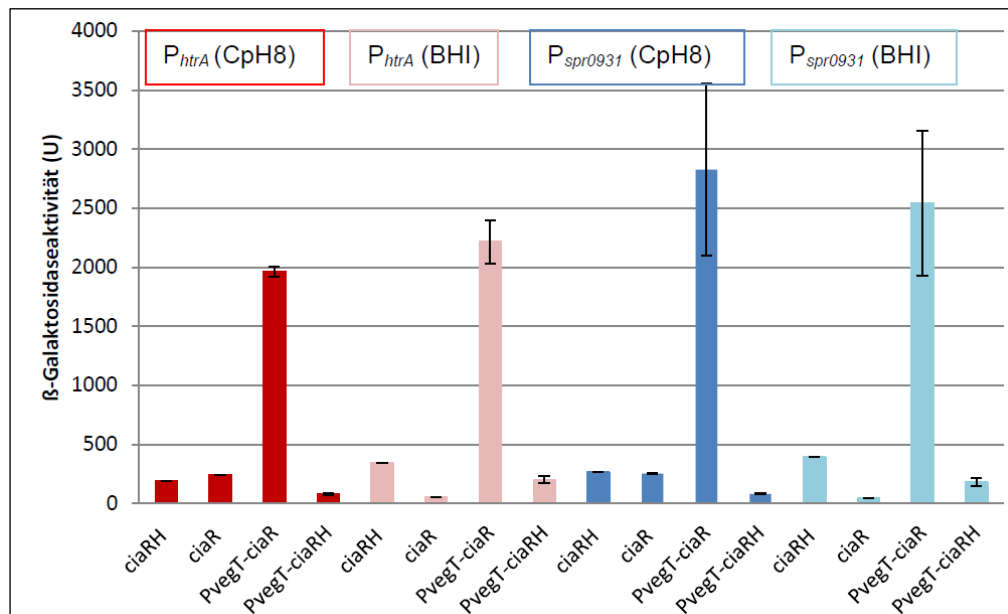


Abb. 5.2: Einfluss der Überexpression von *ciaR* und *ciaRH* auf die CiaR-Aktivität (Schultchen-Kamp, 2012). Die Abbildung gibt einen Überblick über die CiaR-abhängigen Promotoraktivitäten von P_{htrA} und $P_{spr0931}$ in C+Y-Medium und BHI-Medium in *S. pneumoniae* mit funktionellem CiaRH-System (*ciaRH*), *ciaH*-Deletion (*ciaR*) sowie überexprimiertem *ciaR* ($P_{vegT-ciaR}$) und überexprimiertem *ciaRH* ($P_{vegT-ciaRH}$); die Beschriftung ist in Klammern angegeben. Die Überexpression erfolgte im genetischen Hintergrund der *ciaRH*-Deletion (*ciaR'*-*aad9'*-*ciaH*). Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein (U).

Dennoch stellt sich weiterhin die Frage nach der relativ zu R6 *ciaH*⁻ *spxB*⁻ *ackA*⁻ bestehenden geringeren CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*. Vorstellbar wäre, dass durch die Inaktivierung von *spxB* ein zusätzlicher an der CiaR-Phosphorylierung beteiligter Faktor beeinflusst wird. Beispielsweise wirkt sich die *spxB*-Deletion negativ auf die Kompetenz aus (Bättig & Mühlemann, 2008), die wiederum regulatorisch mit CiaRH in Verbindung steht (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Guenzi *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 2011; Peterson *et al.*, 2004; Zähler *et al.*, 2002). Auch die Expression von *pta* und *ackA* werden offensichtlich durch das Kompetenzsystem induziert. Zwei Transkriptomstudien zeigten erhöhte Transkriptmengen von *pta* und *ackA* auf (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004).

Des Weiteren erfolgt durch genetische Modifikationen des SpxB-Pta-AckA-Wegs ein drastischer Eingriff in den zentralen Metabolismus von *S. pneumoniae*. Acetyl-CoA ist nicht nur Vorläufer von Acetylphosphat, sondern auch Vorläufer weiterer wichtiger Stoffwechselwege wie die Fettsäure-, Zellwand- und AS-Synthese (Wolfe, 2005). Zusätzlich spielen Acetyl-CoA und CoA-enthaltende Komponenten eine wichtige Rolle an der *spxB*-Expression (Ramos-Montanez *et al.*, 2008).

Vor kurzem wurde in *E. coli* gezeigt, dass das Acetyl-CoA-abhängige Acetylierungsmuster der α -Untereinheit der RNA-Polymerase als Folge schwankender Acetyl-CoA Mengen verändert wird, was die Interaktion der RNA-Polymerase mit CpxR beeinflusst. Dies stellt neben der Phosphorylierung von CpxR durch Acetylphosphat eine zweite posttranslationelle Modifikation dar, die die Transkription

CpxR-abhängiger Gene beeinflusst (Lima *et al.*, 2012). Daher ist denkbar, dass Veränderung am SpxB-Pta-AckA-Weg solche Reaktionen hervorrufen können. Die Überprüfung der CiaR-Phosphorylierung *in vivo* im Abgleich mit den CiaR-Aktivitäten und den AcP-Mengen oder die Bestimmung der Aktivitäten einer phosphomimetischen CiaR-Mutante in den AcP-Derivaten könnte Hinweise auf eine zusätzliche posttranslationelle Modifikation liefern.

5.6 Die physiologische Bedeutung von Acetylphosphat auf das CiaRH-System

Dass Acetylphosphat als alternative Phosphatquelle für CiaR agiert, wurde in vorliegender Arbeit eindeutig gezeigt. Allerdings stellt sich hierbei die Frage nach seiner physiologischen Bedeutung in Anwesenheit von CiaH. In den meisten Zwei-Komponenten Systemen hat Acetylphosphat auf die Phosphorylierung von Response Regulatoren keinen großen Einfluss. Bifunktionelle Sensorkinasen können aufgrund ihrer Phosphataseaktivität die Aktivierung von Response Regulatoren durch Acetylphosphat unterdrücken. Trotz allem existieren wenige Hinweise auf ein Beeinflussen der RR-Aktivität durch AcP auch in Anwesenheit der korrespondierenden Sensorkinase (Wolfe, 2005, Laub & Goulian, 2007).

In Anwesenheit von CiaH wirken sich Veränderungen im zellulären AcP-Pool nur geringfügig auf die CiaR-Aktivität aus. CiaH hält hierbei den Phosphorylierungsstatus von CiaR durch ihre Kinase- und Phosphataseaktivität weitestgehend im Gleichgewicht (diese Arbeit). Überraschenderweise wurde in einer anderen Studie in AcP-Derivaten ein negativer Effekt auf CiaRH-Aktivität beobachtet (Ramos-Montanez *et al.*, 2010). Unterschiede existieren hierbei im verwendeten Wachstumsmedium und den Zeitpunkten der Expressionsmessungen.

Weiterhin existiert eine Stimulierung der Phosphataseaktivität von CiaH durch Acetat, was in einer Reduktion der CiaR-Aktivität resultiert (diese Arbeit). Hierbei sind mehrere Möglichkeiten über den Wirkungsmechanismus von Acetat auf CiaH denkbar. Acetat könnte als direktes Signal auf die extrazelluläre Domäne oder nach Aufnahme in die Zellen auf cytoplasmatische Bereiche von CiaH einwirken. Weiterhin könnte auch das im Stoffwechsel produzierte Acetat intrazellulär oder nach dem Export die CiaH-Funktion beeinflussen. Auch eine Bindung an Konnektorproteine wie in *S. mutans*, wo Ca^{2+} über das Konnektorprotein CiaX die Aktivität von CiaRH reprimiert, ist vorstellbar (He *et al.*, 2008). Kürzlich sollten anhand verschiedener Mutationen der extrazellulären Domäne von CiaH Hinweise auf eine Interaktion mit Acetat erhalten werden. Jedoch ging dadurch auch die Kinaseaktivität von CiaH verloren, weshalb eine Überprüfung dessen auf diesem Wege nicht möglich war (Grün, 2012). Sollte Acetat cytoplasmatisch vorliegend auf CiaH einwirken, könnte dies direkt

oder nach Umwandlung in ein anderes Stoffwechselprodukt erfolgen. Die Klärung des Mechanismus müssen weiterführende Untersuchungen zeigen.

Man darf nicht außer Acht lassen, dass Änderungen in der Genetik des SpxB-Pta-AckA-Wegs sich nicht nur auf die AcP-Produktion, sondern auch auf die Acetatproduktion auswirken. Mehrere Studien zeigen in den meisten AcP-Derivaten in *S. pneumoniae* eine Verringerung der ATP-Produktion (Pericone *et al.*, 2003; Ramos-Montanez *et al.*, 2010; eigene Daten, unveröffentlicht), was wahrscheinlich auch eine Verringerung der Acetatproduktion mit sich nachzieht.

Daher sollte die Phosphataseaktivität von CiaH bei verringerter Acetatsynthese reduziert sein. In den meisten Kombinationen genetischer Inaktivierungen des AcP-Syntheseweges ist die CiaR-Aktivität leicht erhöht (diese Arbeit), was diese Annahme unterstützt. Im Gegensatz zu BHI-Medium enthält das klassische C+Y-Medium Acetat. Zusätzlich produziert *S. pneumoniae* in C+Y-Medium mehr Acetylphosphat und daraus resultierend mehr Acetat als in BHI-Medium. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass in C+Y-Medium während des exponentiellen Wachstums das CiaRH-System weniger aktiv ist als in BHI-Medium (Halfmann *et al.*, 2011). Allerdings muss man hierbei auch die Wirkungen des pH-Werts und der Kompetenz in beiden Medien auf die CiaRH-Aktivität bedenken (Kaysen, 2012; Müller, 2011).

Die physiologische Bedeutung von Acetylphosphat liegt vielmehr darin, dass es als Vorläufer von Acetat agiert. Während Acetylphosphat die CiaR-Aktivität stimuliert, wird diese gleichzeitig durch die Acetat-vermittelte Phosphataseaktivität von CiaH inhibiert. Des Weiteren wirkt Acetat selbst negativ auf AckA. Vor kurzem durchgeführte Expressionsanalysen zeigten eine Abnahme der *ackA*-Transkription durch Acetat (Brückner R., persönliche Mitteilung). Offensichtlich benutzt das CiaRH-System die Substrate Acetylphosphat und Acetat über die Acetatkinasereaktion zur Feinabstimmung der CiaR-Aktivität, was eine Kopplung an den Metabolismus von *S. pneumoniae* darstellt (Abb. 5.3).

Die Stimulierung der Phosphataseaktivität von CiaH durch Acetat ist zudem sinnvoll, da offensichtlich ein schwacher Acetat-vermittelter Kinase-Crosstalk die CiaR-Phosphorylierung unterstützt (diese Arbeit). So inhibiert CiaH die CiaR-Phosphorylierung durch Acetylphosphat und einer weiteren Sensorikase. Die CiaR-Aktivität ist damit auch abhängig vom energetischen Status der Zelle.

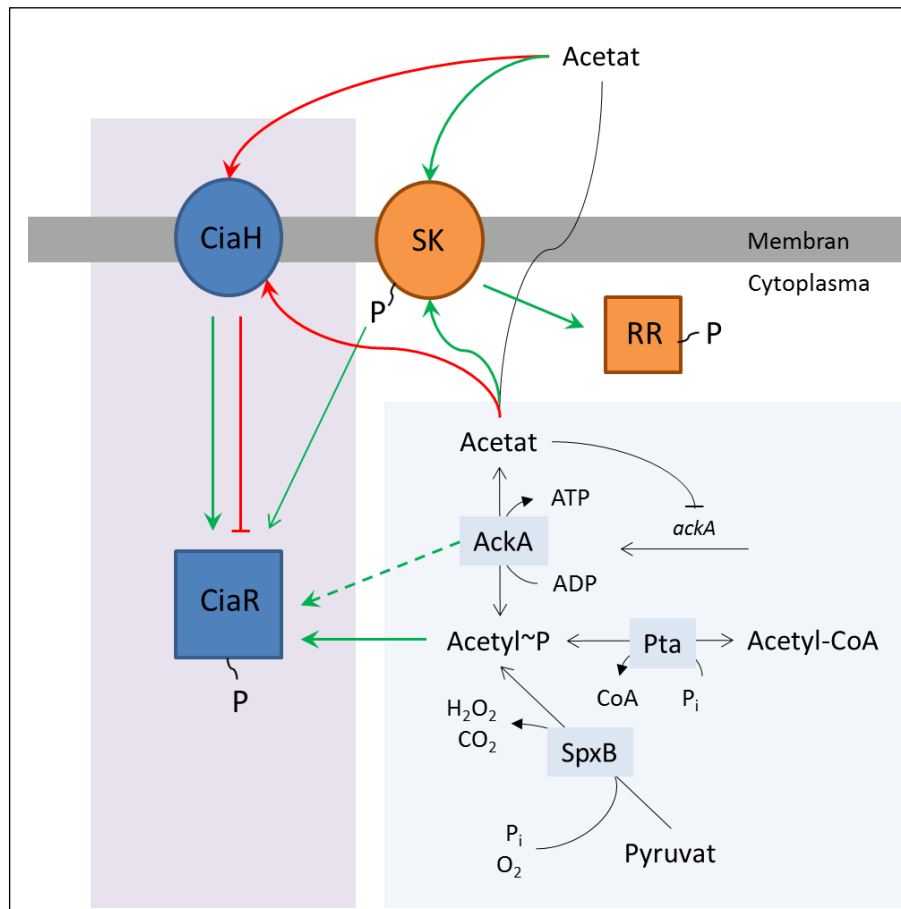


Abb. 5.3: Physiologische Rolle von Acetylphosphat und Acetat für das CiaRH-System. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der neuen Erkenntnisse aus dieser Arbeit über die Auswirkungen von Acetylphosphat und Acetat auf die CiaR-Aktivität. Einige der dargestellten Verbindungen müssen noch weitergehend überprüft werden. Acetylphosphat agiert als alternativer Phosphodonator für CiaR. Vermutlich fungiert die Acetatkinase als eine zusätzliche alternative Phosphatquelle für CiaR. Acetat stimuliert intra- oder extrazellulär Kinase-Crosstalk mit CiaR und gleichzeitig die Phosphataseaktivität von CiaH sowie die Transkription von *ackA*. Der Phosphorylierungsstatus von CiaR wird hauptsächlich von CiaH kontrolliert. Rote Pfeile zeigen die Wege zur Unterdrückung, grüne Pfeile die Wege zur Stimulierung der CiaR-Phosphorylierung an. SpxB: Pyruvatoxidase, Pta: Phosphotransacetylase, AckA: Acetatkinase, SK: Sensorkinase, RR: Response Regulator.

Die Kopplung der Aktivität von CiaRH an den Metabolismus ist für *S. pneumoniae* unter einem weiteren physiologischen Aspekt sinnvoll. Das CiaR-Regulon enthält Gene, deren Produkte an der Zuckerverwertung (*malMP*) und dem Zuckertransport (*manLMN*) beteiligt sind. Das *manLMN*-Operon kodiert für ein PTS, das hauptsächlich Glucose, aber auch andere Zucker transportiert. Dessen Promotor ist der einzig negativ kontrollierte CiaR-kontrollierte Promotor im CiaR-Regulon (Halfmann *et al.*, 2007b). Gleichzeitig reduziert ManLMN die CiaRH-Aktivität (Müller, 2011). Acetat induziert wiederum als Stoffwechselendprodukt über CiaRH die Expression des Zuckertransportsystems. Hierbei zeigt sich die komplexe Verknüpfung von CiaRH als des metabolischen Netzwerks der Zelle.

Eine weitere physiologische Bedeutsamkeit von Acetylphosphat und Acetat wird in Mutanten mit *ciaH*-Allelen deutlich. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, besitzt $\text{CiaH}_{\text{T230P}}$ (*ciaH306*) einen Phosphatasedefekt und erhöhte Kinaseaktivität. Die CiaR-Aktivität kann in diesem Fall nicht mehr durch Acetat runterreguliert werden. Hierbei wäre es sogar möglich, dass die CiaR-Phosphorylierung von CiaH und Acetylphosphat gleichzeitig stattfindet. Die Bestimmung der CiaR-Aktivität in einem Stamm mit *spxB*⁻ *pta*⁻ *ackA*⁻ mit *ciaH306* sollte Hinweise hierzu liefern. Darüber hinaus bewirkt Acetat in Anwesenheit von *ciaH306* sogar einen kleinen Aktivitätsanstieg (Abb. 4.23), der möglicherweise wiederum mit dem Kinase-Crosstalk zusammenhängt.

5.7 Die Regulation der CiaR-Aktivität - eine Bestandsaufnahme

Die vorangegangenen Kapitel und vergangene Studien zeigen immer mehr das komplexe Netzwerk auf, indem sich das CiaRH-System befindet. Als Bestandsaufnahme zeigt Abb. 5.4 einen schematischen Überblick über die verschiedenen Faktoren, die die CiaR-Aktivität steuern; die Ergebnisse vorliegender Arbeit eingeschlossen. Die CiaR-Phosphorylierung hängt offenbar vom energetischen Zustand einschließlich Acetylphosphat und Acetat, dem Kompetenzsystem, dem pH-Wert und einigen Genprodukten des CiaR-Regulons ab.

Die Beteiligung des Stoffwechsels zeigt sich weiterhin in der Abhängigkeit der CiaR-Aktivität vom Wachstumsmedium und der Wachstumsphase (Halfmann *et al.*, 2011). Während des Wachstums in C+Y-Medium wird beim Übergang in die stationäre Phase die CiaR-Aktivität in Abhängigkeit von CiaH induziert. In BHI-Medium erfolgt diese Induktion nicht, sondern vielmehr eine geringe Aktivitätsabnahme. Möglicherweise hängt dies mit der Umstellung des Metabolismus zusammen, wobei Acetat an der Feinabstimmung der CiaR-Aktivität beteiligt sein könnte. Zudem zeigten sich im genetischen Hintergrund der *ciaH*-Deletion während des Wachstums im AcP-Derivat ohne *spxB* und im Derivat ohne *pta* Änderungen in den Aktivitätsunterschieden zum *ciaH*-Deletionsderivat mit intaktem AcP-Syntheseweg (Abb. 4.10), die dies unterstützen.

CiaH hält in allen Wachstumsmedien ein konstantes CiaR-Aktivitätsniveau aufrecht. Neben verschiedenen Aktivitätsstärken ist das Kinase/Phosphatasegleichgewicht von CiaH in den jeweiligen Medien verändert. In BHI-Medium hält CiaH durch ihre Kinaseaktivität die CiaR-Aktivierung aufrecht. In klassischem C+Y-Medium agiert CiaH als schwache Phosphatase (Halfmann *et al.*, 2011). In C+Y-Medium ohne Acetat agiert CiaH wiederum als schwache Kinase (diese Arbeit). Dies verdeutlicht erneut die zentrale Bedeutung der Acetatkinasereaktion an der Regulation der CiaRH-Aktivität.

Weiterhin ist beschrieben, dass die CiaR-Aktivität unter Calciummangel (Giammarinaro *et al.*, 1999) und bei Behandlung mit Vancomycin (Haas *et al.*, 2005) und Penicillin (Rogers *et al.*, 2007) induziert wird. Jedoch sind die Experimente zur Demonstration des Calciummangels als induzierendes Signal nicht konsistent (Giammarinaro *et al.*, 1999). Der Effekt von Vancomycin und Penicillin scheint nicht sehr spezifisch für die CiaR-Aktivität zu sein, da auch die Expression einer großen Anzahl an Genen, die nicht zum CiaR-Regulon gehören, beeinflusst wird (Haas *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2007).

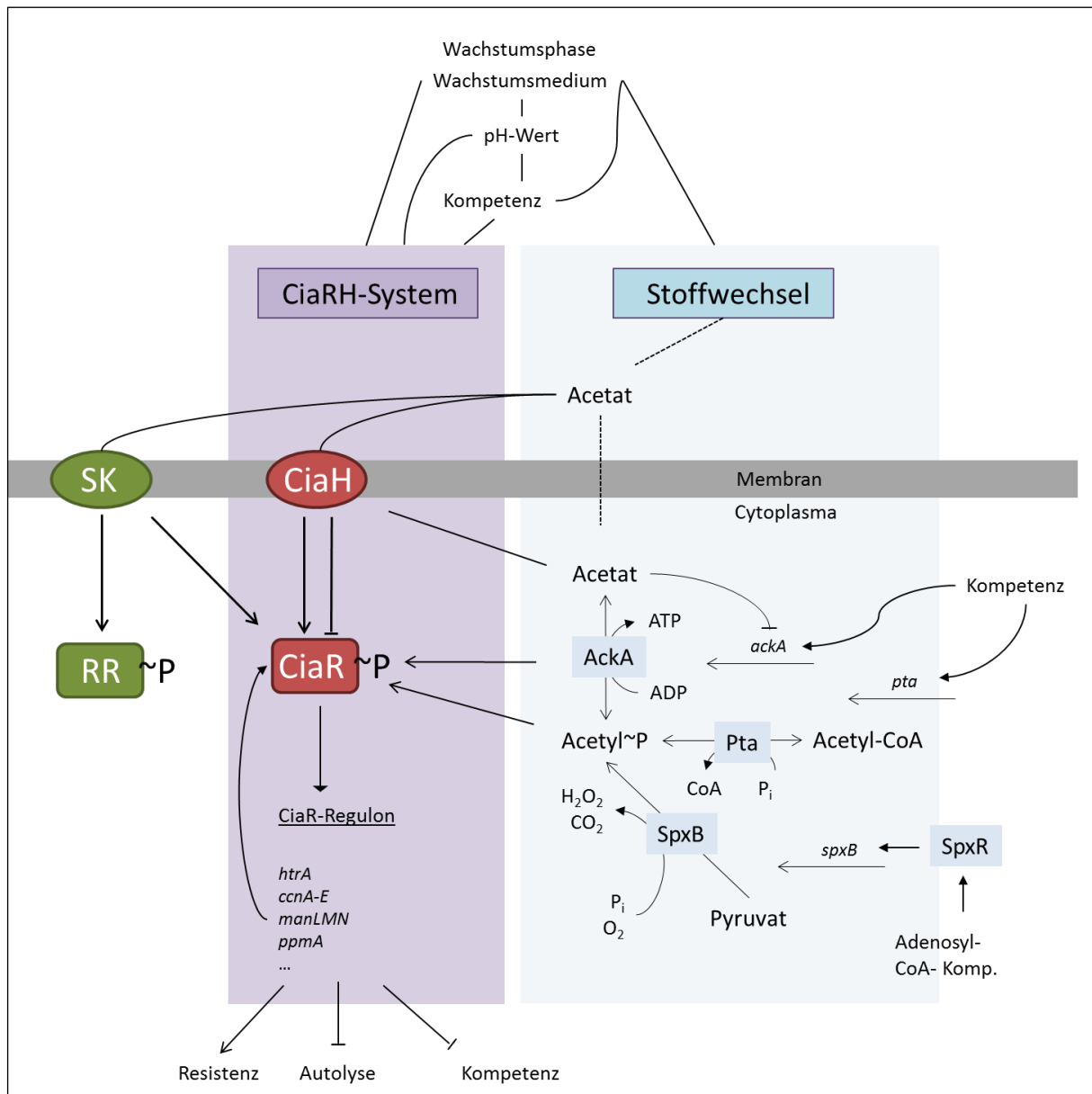


Abb. 5.4: Schematische Darstellung der Steuerung der CiaR-Aktivität. Gezeigt sind intra- und extrazelluläre Einflüsse auf die CiaR-Aktivität und die phänotypischen Auswirkungen. Gezeigt sind die Einflüsse der Wachstumsphase und des Wachstumsmediums, welches über den Stoffwechsel, den pH-Wert und die Kompetenz eine Verknüpfung zur CiaR-Aktivität darstellt. Acetat stimuliert die Phosphataseaktivität von CiaH. Acetylphosphat dient als alternative Phosphatquelle für CiaR. Überprüft werden muss die Rolle der Acetatkinase als direkter Phosphodonor für CiaR und der durch Acetat induzierte Kinase-Crosstalk. Zusätzlich sind die Gene dargestellt, deren Produkte an der Regulation der CiaR-Aktivität beteiligt sind. Weitere Erläuterungen: siehe Text.

Eine weitere Komponente, die die CiaR-Aktivität beeinflusst, ist die Kompetenz in *S. pneumoniae*. Eine Verknüpfung von CiaRH mit der Kompetenz wurde mehrmals gezeigt. Ein hyperaktives CiaRH-System unterdrückt die Kompetenz (Guenzi *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 2011; Zähler *et al.*, 2002). In mehreren Transkriptomanalysen wurde in Anwesenheit eines inaktiven CiaRH-Systems eine erhöhte Expression mehrerer Kompetenzgene festgestellt (Echenique *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003;

Sebert *et al.*, 2002). Auf der anderen Seite wurden während eines genetischen Screenings Mutanten mit einem hochregulierten Kompetenzsystem identifiziert, die Insertionen in *ciaR* aufwiesen (Martin *et al.*, 2000). Des Weiteren ist in Zellen mit inaktiviertem Kompetenzsystem die CiaR-Aktivität reduziert (Müller, 2011). Das CiaR-Regulon wird durch das Kompetenzsystem induziert (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004). Der Mechanismus der Induktion ist bislang jedoch ungeklärt. Es zeigte sich allerdings, dass der Effekt hauptsächlich von CiaH abhängt (Kaysen, 2012). Des Weiteren existiert ein Einfluss des pH-Werts auf die CiaRH-Aktivität. Dieser Effekt verläuft hauptsächlich über das Kompetenzsystem, dessen Induktion selbst vom pH-Wert abhängt (Chen & Morrison, 1987a; Tomasz, 1966), aber auch über einen weiteren Faktor. Zudem sind offensichtlich Genprodukte des CiaR-Regulons für das Wachstum von *S. pneumoniae* in alkalischem pH-Wert (Kaysen, 2012).

Eine Verknüpfung der Kompetenz mit CiaRH besteht zudem über den Pyruvatstoffwechsel. Die Genexpression von *pta* und *ackA* werden leicht durch das Kompetenzsystem induziert. Zwei Transkriptomstudien weisen erhöhte Transkriptmengen von *pta* und *ackA* auf (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004). Des Weiteren trägt SpxB zur Kompetenzentwicklung bei. Eine Inaktivierung von *spxB* wirkt sich negativ auf die Kompetenz aus (Bättig & Mühlemann, 2008).

Eine weitere Regulation seiner Aktivität erfährt CiaR über einige Produkte des eigenen Regulons (Müller, 2011). Es existiert eine Feedback-Regulation durch die Genprodukte HtrA, csRNA1-5 und ManLMN. Die Abwesenheit dieser Genprodukte hat einen positiven Einfluss auf die CiaR-Aktivität. Dahingegen wirkt sich die Abwesenheit des CiaR-regulierten Gens *ppmA* negativ auf die CiaR-Aktivität aus.

5.8 Auswirkungen der *ciaH*-Mutationen klinischer Pneumokokken-Isolate

Neben diversen extra- und intrazellulären Einflüssen beeinflussen auch intrinsische Faktoren an CiaH selbst die CiaR-Aktivität. Hierbei handelt es sich um verschiedene Aminosäuresubstitutionen in der Sensorkinase. Neben bekannten *ciaH*-Allelen in β -lactamresistenten Labormutanten von *S. pneumoniae* R6 (Müller, 2011; Zähner *et al.*, 2002) wurden im Rahmen dieser Arbeit vier neue Allele in klinischen Isolaten identifiziert und charakterisiert (Kapitel 4.1).

Aufgrund der ständig wachsenden Anzahl sequenzierter Pneumokokken-Genome wurde im Laufe dieser Arbeit erneut eine Datenbankanalyse zur Überprüfung des Auftretens klinischer *ciaH*-Allele durchgeführt. Hierbei wurden zwei weitere Allele identifiziert (Tab. 5.2). Das *ciaH1127*-Allel enthält an Aminosäure 376 eine Substitution von Threonin zu Isoleucin, verursacht durch eine Transition von C zu T. Diese befindet sich in der CA-Domäne von CiaH. Im *ciaH58/857*-Allel existieren zwei Mutationen gleichzeitig. An Aminosäure 20 liegt ein Austausch von Asparagin zu Aspartat sowie an Stelle 286 eine Substitution von Prolin zu Leucin vor. Erstgenannte stellt zum ersten Mal eine Veränderung dar, die in der Nähe der ersten Transmembrandomäne existiert. Die Substitution P286L ist wiederum in der CA-Domäne lokalisiert. Verursacht wurden diese Mutationen durch eine G-A-Transition (Base 58) und eine C-T-Transition (Base 857).

Des Weiteren stellte sich heraus, dass die bereits bekannten Allele weitaus häufiger auftreten als die erste Datenbankanalyse zeigte (vgl. Tab. 4.1). So existiert *ciaH232* in neun Stämmen, *ciaH556* in sieben Stämmen und *ciaH1057* in dreizehn Stämmen (Stand September 2012). Das Allel *ciaHTpVT* taucht bisher nur in *S. pneumoniae* Tupelo auf. Die fortschreitende Massensequenzierung wird bekannte Allele sicherlich in weiteren Isolaten und möglicherweise weitere Allele aufweisen.

Die klinischen *ciaH*-Allele sind in bestimmten Serotypen verbreitet. Die Verteilung ist hierbei beschränkt auf einige wenige Serotypen und zeigt ein Verbreitungsmuster. So wurde in einigen Isolaten des Serotyps 7 nur *ciaH556* identifiziert, jedoch keins der übrigen Allele. *CiaH1057* tritt vermehrt in Isolaten des Serotyps 9 und 19 auf, *ciaH232* in Serotyp 19 und 23. Resistenz gegenüber Penicillin und anderen β -Lactamen tritt in einigen Serotypen gehäuft auf. Die Häufigkeit β -lactamresistenter Isolate ist weltweit in den Serotypen 6, 9, 14, 19 und 23 besonders ausgeprägt; über Resistenzen in Serotyp 15 gibt es Hinweise (Imöhl *et al.*, 2010; Reinert *et al.*, 2007). Die klinischen Allele sind mit Ausnahme von *ciaH556* in genau solchen Isolaten vorhanden. Bekanntlich wurden die Laborallele in *S. pneumoniae* R6 auf β -Lactamen selektioniert und stellen primäre Resistenzdeterminanten dar (Laible & Hakenbeck, 1987; Müller *et al.*, 2011; Zähner *et al.*, 2002).

Tab. 5.2: Verbreitung der *ciaH*-Allele in klinischen Isolaten von *S. pneumoniae*

<i>ciaH</i> -Allel	Änderung in der AS-Sequenz	Pneumokokken-Isolat	Serotyp	Referenz
<i>ciaH232</i>	N78D	Hu15	19A	Hakenbeck, unveröffentlicht
		Hu17	19A	Hakenbeck, unveröffentlicht
		PS2677	23F	Hakenbeck, unveröffentlicht
		ATCC700676	19A	Genbank ACA36974
		GA54354	23A	Genbank EJH01707
		GA62331	23A	Genbank EJH16328
		GA04375	19F	Genbank EGE88499
		3063-00	19F	Genbank EHE62798
¹ <i>ciaH232a</i>	N78D	GA47210	15	Genbank EHZ59792
<i>ciaH556</i>	V186I	CDC1087-00	7	Genbank EDT91273
		GA40028	² n.b.	Genbank EHE32158
		NP141	7	Genbank EHZ97803
		2070109	7	Genbank EJG43007
		GA47439	7	Genbank EHE40107
		GA47283	7	Genbank EHE32158
		2070108	7	Genbank EJG41679
<i>ciaHTpVT</i>	A198S	Tupelo	14	(Moscoso <i>et al.</i> , 2010)
<i>ciaH1057</i>	D353N	SP9-BS68	9V	(Hiller <i>et al.</i> , 2007)
		SP195	9A	Genbank EDT92388
		GA44511	19A	Genbank EHD79475
		GA43257	19A	Genbank EHZ48722
		GA49542	9	Genbank EHZ77428
		GA56113	9	Genbank EJH06203
		GA19998	19A	Genbank EJH11017
		GA47388	19A	Genbank EHE37213
		GA54644	19A	Genbank EHE51126
		GA08780	9A	Genbank EHE69203
		2070425	9	Genbank EJG50373
		GA17301	9	Genbank EJG92985
GA17570	9A	Genbank EGI83522		
<i>ciaH58/857</i>	N20D, P286L	GA52612	15	Genbank EJG86519
<i>ciaH1127</i>	T376I	EU-NP04	6	Genbank EHZ94255

¹Zusätzlich zu den stillen Mutationen in *ciaH232* tritt in *ciaH232a* eine weitere stille Mutation (G582A) auf.

²n.b.: nicht bestimmt

Über den Beitrag klinischer Allele zur β -Lactamresistenz in diesen Isolaten kann mitunter aufgrund der genetischen Diversität und fehlender Resistenzbestimmungen dieser Isolate keine weitergehende Aussage gemacht werden. Eine Reduktion der β -Lactamsuszeptibilität hängt stark mit über *ciaH*-Allele vermittelten Aktivitätssteigerungen des *cia*-Systems zusammen. Von den klinischen Allelen führt lediglich die Anwesenheit des *ciaHTpVT*-Allels zur deutlichen Aktivitätssteigerung (Abb. 4.2). Der durch *ciaH556* und *ciaH1057* bewirkte Aktivitätsanstieg reicht dabei nicht zur Resistenzerhöhung aus. Mit Ausnahme von *ciaHTpVT* handelt es sich daher bei den übrigen klinischen Allelen nicht um primäre Resistenzdeterminanten, da sie zumindest unabhängig von weiteren Resistenzdeterminanten keine Suszeptibilitätsänderungen gegenüber β -Lactamen aufweisen (Abb. 4.3). Vorstellbar ist, dass sie als sekundäre Resistenzdeterminanten in Kombination mit niederaffinen PBPs agieren könnten. Beispielsweise könnte die Anwesenheit veränderter PBPs Bedingungen erzeugen, die von den mutierten CiaHs registriert werden, wodurch diese ihrerseits mit

einer Aktivitätssteigerung von CiaR reagieren, die zur Verringerung der Suszeptibilität ausreicht. Durch die Kombination veränderter PBPs mit *ciaH*-Allelen und anschließender Untersuchung der CiaR-abhängigen Promotoraktivität könnte dies überprüft werden.

Neben seiner positiven Wirkung auf die β -Lactamresistenz beeinflusst das CiaRH System die Kompetenz von *S. pneumoniae* negativ (Guenzi *et al.*, 1994). Zur kompletten Unterdrückung der Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* R6 in dem kompetenz-zulassenden C+Y-Medium ist ein hyperaktives CiaRH System nötig, welches, vermittelt durch *ciaH*-Allele, eine mindestens vierfache Aktivitätserhöhung erfährt (Müller, 2011). Die beschriebenen klinischen Allele vermitteln einen bis zu dreifachen Aktivitätsanstieg. Während *ciaH232*, *ciaH556*, *ciaH1057* die Kompetenz in keinsten Weise blockieren, erfährt *S. pneumoniae* R6 mit *ciaHTpVT* eine Blockierung im frühen exponentiellen Wachstum (Abb. 4.4). Eine knapp zweifache Erhöhung der CiaR-Aktivität durch Allele wirkt sich in C+Y-Medium dagegen nicht auf den Kompetenzphänotyp aus. Auch die dreifache Aktivitätserhöhung genügt nicht zur vollständigen Unterdrückung. Dies stellt einen Unterschied zu den Laborallelen dar, da diese alle aufgrund ihres hoch- bis hyperaktivierenden Effekts die Kompetenz komplett unterdrücken. Die Daten zum Block der Kompetenz korrelieren mit den Daten der β -Lactamresistenz. Schwache Allele bewirken weder eine Resistenzhöhung, noch eine Reduktion der Transformierbarkeit.

An der Ausbildung beider Phänotypen spielen die Gengruppen *ccnA-E* und *htrA* eine bedeutende Rolle. Das Inaktivieren von *htrA* in *S. pneumoniae* R6x mit dem *ciaH306* stellt die Kompetenz wieder her (Sebert *et al.*, 2005). Ein leicht inhibierender Einfluss von *csRNA1* ist beschrieben (Tsui *et al.*, 2010). Zudem bewirkt in *S. pneumoniae* R6 mit *ciaH306* oder *ciaH202* das Inaktivieren von *htrA* eine Verringerung des Kompetenzblocks; das Inaktivieren von *ccnA-E* die Wiederherstellung der natürlichen Kompetenz (Müller *et al.*, 2011). Beide Gengruppen tragen in Anwesenheit eines hyperaktiven CiaRH Systems offensichtlich gemeinsam zum Kompetenzblock bei. Die durch die Hyperaktivierung des CiaRH Systems vermittelte β -Lactamresistenz hängt hauptsächlich von den *csRNAs* ab. Allerdings sollte man nicht außer Acht lassen, dass weitere Genprodukte des CiaR-Regulons, die bisher keine festgelegte Funktion haben, ebenfalls eine Rolle spielen könnten. Neben der β -Lactamresistenz und Kompetenz beeinflussen Laborallele auch das Wachstum von *S. pneumoniae*. So ist bei stark aktivierenden Allelen das exponentielle Wachstum und die Autolyse in der stationären Wachstumsphase verlangsamt (Müller, 2011). Hierbei haben *csRNA4* und *csRNA5* eine unterstützende Funktion (Halfmann *et al.*, 2007b). In Anwesenheit klinischer Allele hingegen ist das Wachstum von *S. pneumoniae* im Vergleich zum Wildtyp weitestgehend unverändert (Kapitel 4.1.5). Offensichtlich ist die durch klinische *ciaH*-Allele vermittelte Expressionssteigerung des *cia*-

Regulons nicht ausreichend zur Ausbildung der durch hyperaktivierende Laborallele vermittelten Phänotypen.

Wie in den Kapiteln 4.1 und 4.3 gezeigt wurde, beeinflussen die klinischen Allele die Aktivität des Response Regulators CiaR. Da es sich bei CiaH um eine bifunktionelle Sensorkinase handelt (Halfmann *et al.*, 2011), können Mutationen gleichzeitig Auswirkungen auf die Kinase- und Phosphataseaktivität haben. Dies wurde in vorliegender Arbeit gezeigt (Abb. 4.22, 4.23). Da Acetat die Phosphataseaktivität von CiaH stimuliert, hängt die von CiaH vermittelte Aktivitätsänderung des Response Regulators neben den Aminosäureänderungen auch von der Anwesenheit des Acetats ab. Die Allele *ciaH556*, *ciaH1057* und *ciaHTpVT* erhöhen ohne externes Acetat die CiaR-Aktivität durch verstärkte Kinaseaktivität. Gleichzeitig wird durch *ciaH556* und *ciaH1057* die Phosphataseaktivität erhöht. In Anwesenheit von Acetat zusammen mit jeweils einem der beiden mutierten CiaH-Proteine erfährt CiaR eine stärkere Aktivitätsreduktion als durch das Wildtyp-Allel. Durch beide Allele erfährt CiaH demnach eine Verstärkung der Kinase- und Phosphataseaktivität. Je nachdem welche der Aktivitäten dominierend ist, reagiert CiaR im Vergleich zum Wildtyp-CiaH mit erhöhter oder reduzierter Aktivität. Durch die A198S-Substitution des Tupelo-Allels erfährt CiaH hingegen keine Änderung der Phosphataseaktivität. Acetat bewirkt hierbei im Verhältnis gesehen eine genauso starke Aktivitätsabnahme wie mit dem Wildtyp-Allel. Dahingegen zeigt CiaH mit der N78D-Substitution des *ciaH232*-Allels keine Änderung der Kinase-, sondern der Phosphataseaktivität. Im Gegensatz zu den klinischen Allelen weist das *ciaH306*-Allel einen Phosphatasedefekt auf. Vor kurzem wurde gezeigt, dass dies auch auf die Laborallele *ciaH305*, *ciaH202*, *ciaH208* und *ciaH408* zutrifft (Grün, 2012). Dahingegen wird durch diese Mutationen die Kinaseaktivität von CiaH drastisch erhöht, was ein hyperaktives *cia*-System zur Folge hat (Müller *et al.*, 2011). Dies stellt den großen Unterschied zwischen Laborallelen und klinischen Allelen dar.

5. Diskussion

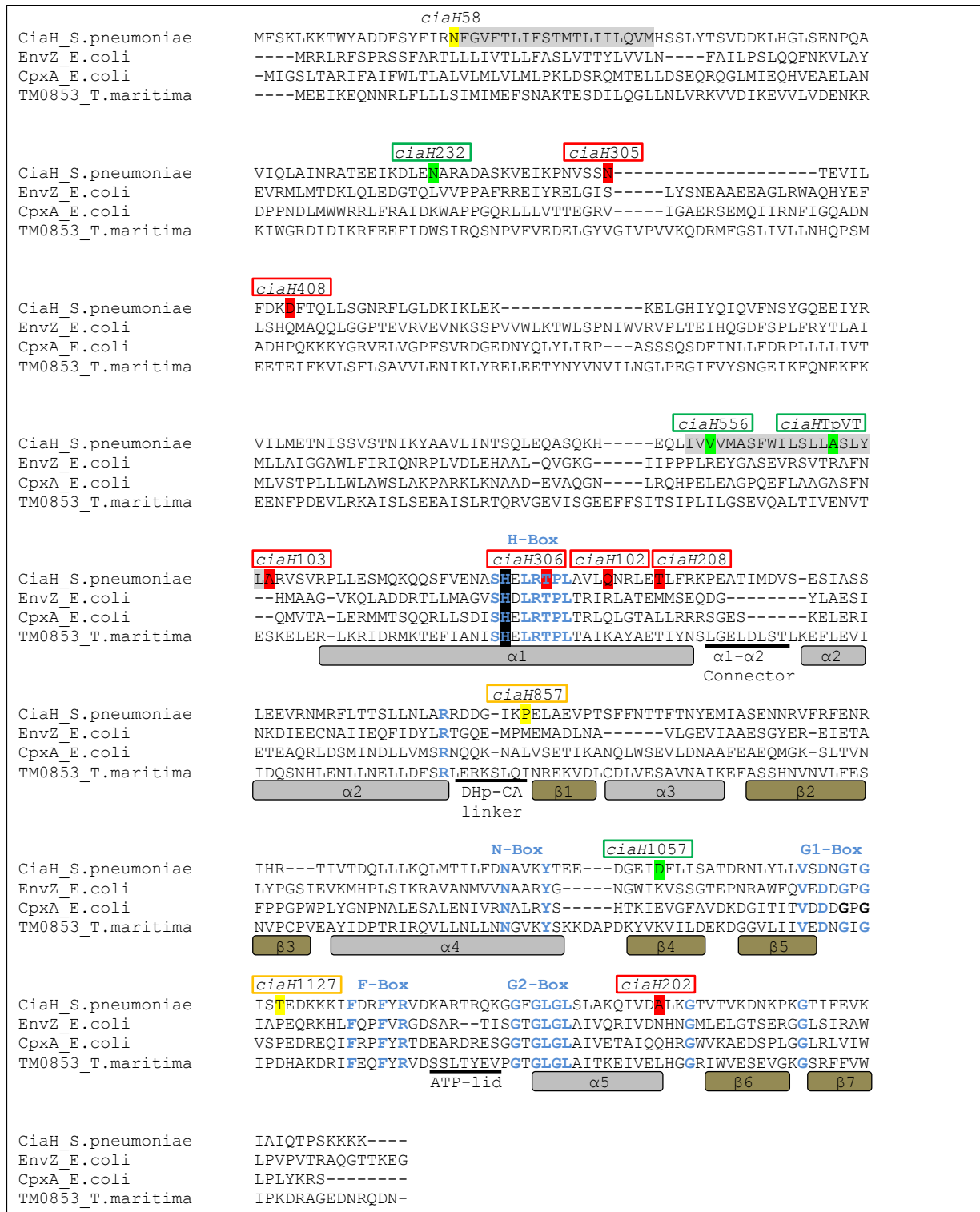


Abb. 5.5: Alignment der Sensorinasen CiaH, EnvZ, CpxA und TM0853. Die Aminosäuresequenzen der Histidinkinasen stammen von den Stämmen *S. pneumoniae* R6, *E. coli* K-12 MG1655, und *T. maritima* MSB8. Das Alignment wurde mit Hilfe des Programms ClustalW 1.83 erstellt. Das Sequenzalignment enthält CiaH und Sensorinasen der gleichen Klasse, auf die sich bei der Interpretation der CiaH-Aminosäureaustausche bezogen wurde. Das phosphorylierbare Histidin ist schwarz, die durch das Programm SOSUI bestimmten Transmembrandomänen von CiaH sind grau hinterlegt. Wesentliche Merkmale der Sekundärstruktur von TM0853 sind eingezeichnet (Casino *et al.*, 2009). Die Aminosäuren, die in den jeweiligen *ciaH*-Allelen ausgetauscht sind, sind durch jeweilige Allelbezeichnung angegeben und gesondert markiert; grün: in dieser Arbeit charakterisierte klinische Allele, gelb: uncharakterisierte klinische Allele, rot: Laborallele. Die Lage hochkonservierter Aminosäuren und der Boxen sind blau markiert.

Mittels Kristallstrukturen, insbesondere von Komplexen aus Sensorkinasen und Response Regulatoren, sind Rückschlüsse über die Funktionsmechanismen von Sensorkinasen und deren Signaltransduktion zum Response Regulator möglich. Somit können Hinweise auf die Auswirkungen von Mutationen der Sensorkinase auf molekularer Ebene gezogen werden. Von CiaH und CiaR sind bisher keine Strukturen verfügbar. Allerdings enthält CiaH als Sensorkinase der Klasse I im cytoplasmatischen Bereich die konservierten Boxen H, N, G1, F und G2 (Gao & Stock, 2009). Die Strukturaufklärung des HK853-RR468-Komplexes stellt ein Paradigma für einen Komplex aus Sensorkinase der Klasse I und deren korrespondierenden Response Regulators dar (Casino *et al.*, 2009), weshalb sich ein Vergleich der Sekundärstrukturen von CiaH und HK853 unter Betrachtung struktureller Merkmale zur Erlangung von möglichen Erklärungen der Auswirkungen der jeweiligen Mutationen in CiaH besonders eignet. Des Weiteren werden dazu die Sekundärstrukturen der Sensorkinasen EnvZ und CpxA von *E. coli* verwendet, da in diesen Sensorkinasen teilweise homologe Mutationen wie in CiaH und deren Einflüsse auf die Aktivität des korrespondierenden Response Regulators beschrieben sind (Forst & Roberts, 1994; Raivio & Silhavy, 1997; Russo & Silhavy, 1991; Tokishita *et al.*, 1992). So befindet sich *ciaH306*, wie auch *ciaH102* und *ciaH208*, in der α 1-Helix der DHP-Domäne (Abb. 5.5). Bei SK dieser Familie steht die α 1-Helix mit ihrem C-terminalen Ende, in dem auch die Mutationen in CiaH angesiedelt sind, in Kontakt zum Response Regulator (Casino *et al.*, 2009). Dies deutet neben den Auswirkungen auf die Konformation auch auf Veränderungen der Interaktion von Sensorkinase und Response Regulator hin. Im Speziellen für *ciaH306* und dessen hervorrufende T230P-Substitution ist auffällig, dass diese in der H-Box, stromabwärts des konservierten und zur Autophosphorylierung benötigten Histidins liegt. Dieser Threoninrest ist im konservierten Sequenzmotiv E/DxxN/T lokalisiert, wobei x für eine beliebige Base steht. Für den konservierten Asparagin- bzw. Threoninrest ist beschrieben, dass er kritisch für die Phosphatasefunktion und vermutlich essentiell für die Koordination des nukleophilen Wassermoleküls während der Dephosphorylierungsreaktion ist (Huynh & Stewart, 2011). Die Substitution des Threonins in den Sensorkinasen CpxA, PhoR und VanS bewirkte zudem einen Phosphatasedefekt (Baptista *et al.*, 1997; Raivio & Silhavy, 1997; Yamada *et al.*, 1989). Der Phosphatasedefekt des Produkts von *ciaH306* ist also absolut im Einklang mit Beobachtungen anderer Sensorkinasen. Modifikationen an der DHP-Domäne wirken sich auf die Interaktion zwischen SK und RR und auf die Interaktion zwischen DHP- und CA-Domäne aus (Albanesi *et al.*, 2009), was gleichzeitig einen Einfluss auf die Autophosphorylierung und die Kinase-/Phosphataseaktivität haben kann. Offensichtlich ist diese Region von CiaH essentiell für dessen Phosphataseaktivität, da auch *ciaH102* und *ciaH208* keine Phosphataseaktivität aufzeigen (Grün, 2012).

Das klinische Allel *ciaH1057* befindet sich in der CA-Domäne von CiaH. Der Sekundärstrukturvergleich mit TM0853 von *T. maritima* deutet auf eine Lokalisation in der β 4-Domäne hin. Diese Domäne bildet

einen lateralen Kontakt zum Response Regulator (Casino *et al.*, 2009). Für die CA-Domäne gibt es zudem Hinweise auf eine unterstützende Rolle der Phosphatasefunktion. Von mehreren Sensorkinasen existieren Phosphatasemutanten mit Veränderungen in der CA-Domäne (Huynh & Stewart, 2011). Die D353N-Substitution von CiaH beeinflusst Kinase- und Phosphataseaktivität gleichzeitig. Hierbei wird eine polare Verbindung durch eine saure ersetzt, was die Konformation von CiaH und dessen Interaktion mit CiaR beeinflussen und zu den beobachteten Konsequenzen führen könnte.

Die drei weiteren charakterisierten Allele befinden sich in der extrazellulären und zweiten Transmembrandomäne. Kristallstrukturen kompletter Sensorkinasen existieren bisher nicht, weshalb über den Mechanismus der Signalerkennung und die Weiterleitung zur cytoplasmatischen Domäne relativ wenig bekannt ist. Vor kurzem wurden erste Strukturaufklärungen der Transmembrandomänen klassischer Sensorkinasen beschrieben. Hierbei wurde gezeigt, dass beide Transmembrandomänen helicale, antiparallele Motive darstellen, die schwach miteinander interagieren (Maslennikov *et al.*, 2010). Des Weiteren wird der zweiten TM-Domäne eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von der extrazellulären Domäne zur cytoplasmatischen Domäne zugesprochen (Gao & Stock, 2009). Durch das Tupelo-Allel erfolgt die Substitution einer hydrophoben Aminosäure durch eine polare, was sicherlich einen Einfluss auf die Konformation und Signalweiterleitung über TM2 hat. Durch *ciaH556* wird lediglich ein Methylrest durch einen Ethylrest ersetzt. Der Einfluss auf die CiaH-Funktion ist dennoch nicht überraschend, da beispielsweise *ciaH103* eine ähnliche Veränderung auf Molekülebene bewirkt (A203V), was sich drastisch auf die CiaH-Funktion auswirkt (Müller *et al.*, 2011).

Die Sensordomäne registriert in der Regel Stimuli aus der Umgebung. Diese können direkt als Liganden an der extrazellulären Domäne binden oder über Konnektoren, die mit der extrazellulären Domäne interagieren (Casino *et al.*, 2010). Durch Bindung der Stimuli an der Sensorkinase selber oder an ein Konnektorprotein kann eine Konformationsänderung verursacht werden, die die Aktivität der katalytisch aktiven Domäne der Sensorkinase verändert. Durch eine Mutation in der extrazellulären Domäne sollte *per se* die Konformation verändert sein, was Auswirkungen auf die Aktivität haben könnte, oder die Bindung des Liganden eine veränderte Reaktion hervorrufen. Denkbar wäre auch das Imitieren eines Signals durch die Mutation an sich. So bewirkt die N78D-Substitution durch *ciaH232* eine Stimulierung der Phosphataseaktivität, dieselbe Substitution an Aminosäure 95 (*ciaH305*) jedoch eine Erhöhung der Kinaseaktivität (Müller *et al.*, 2011).

Das neu identifizierte klinische Allel *ciaH58/857* besitzt einen Aminosäureaustausch direkt vor der ersten Transmembrandomäne und ist bei Betrachtung des Proteinalignments in der Nähe des DHp-CA-Linkers lokalisiert. Transmembrandomänen weisen eine schwache Interaktion miteinander auf (Maslennikov *et al.*, 2010). Die Region des DHp-CA-Linkers von TM0853 steht in Kontakt mit dem

korrespondierenden Response Regulator (Casino *et al.*, 2009). Daher könnten sich diese Substitutionen in CiaH ebenfalls auf die CiaR-Aktivität auswirken. Zudem bleibt eine Substitution von Prolin zu Leucin sicherlich nicht ohne Folgen auf die Struktur. Eine Überprüfung der Auswirkungen der beiden neu identifizierten Allele könnte in weiteren Untersuchungen erfolgen.

Insgesamt gesehen ist für die Aktivität eines TCS die korrekte Konformation der Sensorkinase und deren passende Interaktion mit dem Response Regulator nötig. Kinase- und Phosphataseaktivitäten werden vermutlich wechselseitig reguliert und obliegen einer dynamischen Kontrolle der Konformation der Sensorkinase (Huynh & Stewart, 2011). Offenbar beeinflussen CiaH-Mutationen über Konformationsänderungen von CiaH die Interaktion mit CiaR, was Einflüsse auf dessen Phosphorylierungsstatus hat.

5.9 Ausblick

In vorliegender Arbeit wurde Acetylphosphat als alternative Phosphatquelle für CiaR identifiziert und Acetat als eine Komponente zur Stimulierung der Phosphataseaktivität von CiaH. Weiterhin zeigte sich ein aktivierender Effekt von Acetat auf die Phosphorylierung von CiaR in Abwesenheit von CiaH, bei dem es sich wahrscheinlich um Crosstalk mit einer anderen Sensorkinase handelt, deren Kinaseaktivität durch Acetat stimuliert wird. Da nun Bedingungen identifiziert wurden, unter denen ein Crosstalk deutlich wird, könnte im Folgenden der Crosstalk-Partner identifiziert.

Im Rahmen der Überprüfung von Acetylphosphat als Phosphodonor fiel auf, dass neben dem Kinase-Crosstalk unter bestimmten genetischen Voraussetzungen die stimulierende Wirkung von Acetat auf die CiaR-Phosphorylierung durch die Acetatkinase unterstützt wird. Hierbei blieb ungeklärt, ob die CiaR-Phosphorylierung über die Bildung von Acetylphosphat verläuft oder AckA direkt als Phosphodonor fungiert. Folgeuntersuchungen sollten daher eine Interaktion von CiaR mit AckA überprüfen.

Die CiaR-Aktivitäten korrelieren nicht in allen AcP-Derivaten mit den Acetylphosphatkonzentrationen. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, ob neben der CiaR-Phosphorylierung weitere posttranslationelle Modifikationen an der Transkription CiaR-regulierter Gene beteiligt sind.

Weiterhin bewirkte die Kombination der Deletion von *ciaH* und *ackA* eine synthetische Lethalität von *S. pneumoniae*-Kolonien. Ursache hierfür war die Hyperaktivierung des CiaR-Regulons und im

Speziell die Überexpression von *htrA*, da dessen Inaktivierung die Darstellung lebensfähiger, jedoch genetisch instabiler Kolonien ermöglichte. Die für die Instabilität verantwortlichen Komponenten des CiaR-Regulons könnten identifiziert werden um anschließend die CiaR-Aktivität in diesem genetischen Hintergrund untersuchen zu können und die Rolle von Acetylphosphat zu verifizieren. Alternativ könnte man die *ackA*-Expression ektopisch unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors stellen und gleichzeitig das native *ackA* zusammen mit *ciaH* deletieren. Das Entfernen der induzierenden Substanz verursacht kurzfristig die *ackA*-Deletion, worauf unmittelbar danach die Messung der CiaR-Aktivität als Kinetik erfolgen könnte.

Im Laufe dieser Arbeit wurden neben den charakterisierten klinischen *ciaH*-Allelen zwei neue Allele in der Datenbank des NCBI gefunden. Diese könnten zur Vollständigkeit wie die übrigen *ciaH*-Allele phänotypisch charakterisiert werden.

Es zeigte sich, dass das CiaRH-System zur Feinabstimmung seiner Aktivität die Komponenten Acetylphosphat und Acetat verwendet. Diese physiologische Rolle dieser Verbindungen spielt vermutlich eine entscheidende Rolle für die CiaR-Aktivität in Anwesenheit von *ciaH*-Allelen mit Phosphatasedefekt. Es sollte überprüft werden, ob unter diesen Bedingungen Acetylphosphat als Phosphodonor für CiaR agiert. Die Bestimmung der in Anwesenheit von *ciaH306* in den AcP-Derivaten könnte Hinweise dazu liefern.

6. Literaturverzeichnis

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

Aguilar, P. S., Hernandez-Arriaga, A. M., Cybulski, L. E., Erazo, A. C. & de Mendoza, D. (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **20**, 1681-1691.

Ahn, S.-J., Lemos, J. A. C. & 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. & Buschiazio, A. (2009). Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16185-16190.

Alloing, G., Martin, B., Granadel, C. & 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.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* **48 Suppl 1**, 5-16.

Avery, O. T., Macleod, C. M. & McCarty, M. (1944). Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med* **79**, 137-158.

Baptista, M., Depardieu, F., Reynolds, P., Courvalin, P. & Arthur, M. (1997). Mutations leading to increased levels of resistance to glycopeptide antibiotics in VanB-type enterococci. *Mol Microbiol* **25**, 93-105.

Barak, R., Welch, M., Yanovsky, A., Oosawa, K. & Eisenbach, M. (1992). Acetyladenylate or its derivative acetylates the chemotaxis protein CheY in vitro and increases its activity at the flagellar switch. *Biochemistry* **31**, 10099-10107.

Barak, R., Yan, J., Shainskaya, A. & Eisenbach, M. (2006). The chemotaxis response regulator CheY can catalyze its own acetylation. *J Mol Biol* **359**, 251-265.

Bättig, P. & Mühlemann, K. (2008). Influence of the *spxB* gene on competence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **190**, 1184-1189.

Baur, S., Marles-Wright, J., Buckenmaier, S., Lewis, R. J. & Vollmer, W. (2009). Synthesis of CDP-activated ribitol for teichoic acid precursors in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **191**, 1200-1210.

Belanger, A. E., Clague, M. J., Glass, J. I. & Leblanc, D. J. (2004). Pyruvate oxidase is a determinant of Avery's rough morphology. *J Bacteriol* **186**, 8164-8171.

Benisty, R., Cohen, A. Y., Feldman, A., Cohen, Z. & Porat, N. (2010). Endogenous H₂O₂ produced by *Streptococcus pneumoniae* controls FabF activity. *Biochim Biophys Acta* **1801**, 1098-1104.

Bentley, S. (2008). Genomic 'valleys of death'. *Nat Rev Microbiol* **6**, 260-261.

Bentley, S. D., Aanensen, D. M., Mavroidi, A. & other authors (2006). Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* **2**, e31.

Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S. & Hammerschmidt, S. (2001). alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* **40**, 1273-1287.

Bidossi, A., Mulas, L., Decorosi, F., Colomba, L., Ricci, S., Pozzi, G., Deutscher, J., Viti, C. & Oggioni, M. R. (2012). A functional genomics approach to establish the complement of carbohydrate transporters in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* **7**, e33320.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.

Biswas, I., Drake, L., Erkina, D. & Biswas, S. (2008). Involvement of sensor kinases in the stress tolerance response of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **190**, 68-77.

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.

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

Buelow, D. R. & Raivio, T. L. (2010). Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol* **75**, 547-566.

Busch, A., Lacal, J., Martos, A., Ramos, J. L. & Krell, T. (2007). Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13774-13779.

Camilli, R., Del Grosso, M., Iannelli, F. & Pantosti, A. (2008). New genetic element carrying the erythromycin resistance determinant erm(TR) in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 619-625.

Carvalho, S. M., Kloosterman, T. G., Kuipers, O. P. & Neves, A. R. (2011). CcpA Ensures Optimal Metabolic Fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* **6**, e26707.

Casino, P., Rubio, V. & Marina, A. (2009). Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **139**, 325-336.

Casino, P., Rubio, V. & Marina, A. (2010). The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 1-9.

Chastanet, A., Prudhomme, M., Claverys, J. P. & Msadek, T. (2001). Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival. *J Bacteriol* **183**, 7295-7307.

- Chavez, R. G., Alvarez, A. F., Romeo, T. & Georgellis, D. (2010).** The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol* **192**, 2009-2012.
- Chen, H., Ma, Y., Yang, J. & other authors (2008).** Genetic requirement for pneumococcal ear infection. *PLoS One* **3**, e2950.
- Chen, J. D. & Morrison, D. A. (1987a).** Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **133**, 1959-1967.
- Chen, J. D. & Morrison, D. A. (1987b).** Cloning of *Streptococcus pneumoniae* DNA fragments in *Escherichia coli* requires vectors protected by strong transcriptional terminators. *Gene* **55**, 179-187.
- Cheung, J. & Hendrickson, W. A. (2010).** Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr Opin Microbiol* **13**, 116-123.
- Chi, F., Leider, M., Leendertz, F., Bergmann, C., Boesch, C., Schenk, S., Pauli, G., Ellerbrok, H. & Hakenbeck, R. (2007).** New *Streptococcus pneumoniae* clones in deceased wild chimpanzees. *J Bacteriol* **189**, 6085-6088.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. & Fields, S. (1991).** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9578-9582.
- Clarke, E. J. & Voigt, C. A. (2011).** Characterization of combinatorial patterns generated by multiple two-component sensors in *E. coli* that respond to many stimuli. *Biotechnol Bioeng* **108**, 666-675.
- Claverys, J. P. & Håvarstein, L. S. (2002).** Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* **7**, d1798-1814.
- Claverys, J. P., Prudhomme, M. & Martin, B. (2006).** Induction of Competence Regulons as a General Response to Stress in Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol*.
- Cock, P. J. & Whitworth, D. E. (2007).** Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions. *Mol Biol Evol* **24**, 2355-2357.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114.
- Commichau, F. M. & Stülke, J. (2008).** Trigger enzymes: bifunktional proteins active in metabolism and in controlling gene expression. *Mol Microbiol* **67**, 692-702.
- Cornick, J. E. & Bentley, S. D. (2012).** *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. *Microbes Infect*.
- Croucher, N. J., Walker, D., Romero, P. & other authors (2009).** Role of conjugative elements in the evolution of the multidrug-resistant pandemic clone *Streptococcus pneumoniae* Spain23F ST81. *J Bacteriol* **191**, 1480-1489.
- Croucher, N. J., Harris, S. R., Fraser, C. & other authors (2011).** Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* **331**, 430-434.

- Da Re, S. S., Deville-Bonne, D., Tolstykh, T., M, V. r. & Stock, J. B. (1999).** Kinetics of CheY phosphorylation by small molecule phosphodonors. *FEBS Lett* **457**, 323-326.
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Henard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J. & Claverys, J. P. (2004).** Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells. *Mol Microbiol* **51**, 1071-1086.
- Dawid, S., Sebert, M. E. & Weiser, J. N. (2009).** Bacteriocin activity of *Streptococcus pneumoniae* is controlled by the serine protease HtrA via posttranscriptional regulation. *J Bacteriol* **191**, 1509-1518.
- Denapaite, D. & Hakenbeck, R. (2011).** A new variant of the capsule 3 cluster occurs in *Streptococcus pneumoniae* from deceased wild chimpanzees. *PLoS One* **6**, e25119.
- Denapaite, D., Bruckner, R., Hakenbeck, R. & Vollmer, W. (2012).** Biosynthesis of Teichoic Acids in *Streptococcus pneumoniae* and Closely Related Species: Lessons from Genomes. *Microb Drug Resist.*
- Ding, F., Tang, P., Hsu, M. H., Cui, P., Hu, S., Yu, J. & Chiu, C. H. (2009).** Genome evolution driven by host adaptations results in a more virulent and antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. *BMC Genomics* **10**, 158.
- Dintner, S., Staron, A., Berchtold, E., Petri, T., Mascher, T. & Gebhard, S. (2011).** Coevolution of ABC transporters and two-component regulatory systems as resistance modules against antimicrobial peptides in Firmicutes Bacteria. *J Bacteriol* **193**, 3851-3862.
- Dopazo, J., Mendoza, A., Herrero, J. & other authors (2001).** Annotated draft genomic sequence from a *Streptococcus pneumoniae* type 19F clinical isolate. *Microb Drug Resist* **7**, 99-125.
- Dubrac, S. & Msadek, T. (2008).** Tearing down the wall: peptidoglycan metabolism and the Walk/WalR (YycG/YycF) essential two-component system. *Adv Exp Med Biol* **631**, 214-228.
- Eberhard, T., Kronvall, G. & Ullberg, M. (1999).** Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb Pathog* **26**, 175-181.
- Echenique, J. R., Chapuy-Regaud, S. & Trombe, M. C. (2000).** Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of *ciaRH* and *comCDE*. *Mol Microbiol* **36**, 688-696.
- Echenique, J. R. & Trombe, M. C. (2001a).** Competence modulation by the NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae* involves signal transduction. *J Bacteriol* **183**, 768-772.
- Echenique, J. R. & Trombe, M. C. (2001b).** Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J. Bacteriol* **183**, 4599-4608.
- Eldholm, V., Gutt, B., Johnsborg, O., Brückner, R., Maurer, P., Hakenbeck, R., Mascher, T. & 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**, 1761-1773.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. & Green, P. (1998).** Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* **8**, 175-185.

- Feng, J., Atkinson, M. R., McCleary, W., Stock, J. B., Wanner, B. L. & Ninfa, A. J. (1992).** Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 6061-6070.
- Fields, S. & Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fleming, A. (1929).** On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology* **10**, 226-236.
- Forst, S. A. & Roberts, D. L. (1994).** Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res Microbiol* **145**, 363-373.
- Fox, D. K., Meadow, N. D. & Roseman, S. (1986).** Phosphate transfer between acetate kinase and enzyme I of the bacterial phosphotransferase system. *J Biol Chem* **261**, 13498-13503.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M. & other authors (1997).** Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**, 580-586.
- Galperin, M. Y. (2006).** Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**, 4169-4182.
- Galperin, M. Y. (2010).** Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* **13**, 150-159.
- Gao, R. & Stock, A. M. (2009).** Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**, 133-154.
- Gartmann, J. (2012).** Posttranskriptionelle Kontrolle durch csRNAs in *Streptococcus pneumoniae*. In *Abteilung Mikrobiologie*: TU Kaiserslautern.
- Giammarinaro, P., Sicard, M. & Gasc, A. M. (1999).** Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal-transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **145**, 1859-1869.
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. (1998).** Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**, 195-202.
- Gottesman, S. & Storz, G. (2010).** Bacterial Small RNA Regulators: Versatile Roles and Rapidly Evolving Variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- Griffith, F. (1928).** The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* **27**, 113-159.
- Groban, E. S., Clarke, E. J., Salis, H. M., Miller, S. M. & Voigt, C. A. (2009).** Kinetic buffering of cross talk between bacterial two-component sensors. *J Mol Biol* **390**, 380-393.
- Grün, J. (2012).** Charakterisierung von Histidine Kinase Mutanten des Zwei-Komponenten Regulationssystems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*: TU Kaiserslautern.
- Guenzi, E., Gasc, A. M., Sicard, M. A. & Hakenbeck, R. (1994).** A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **12**, 505-515.

Gueriri, I., Bay, S., Dubrac, S., Cyncynatus, C. & Msadek, T. (2008). The Pta-AckA pathway controlling acetyl phosphate levels and the phosphorylation state of the DegU orphan response regulator both play a role in regulating *Listeria monocytogenes* motility and chemotaxis. *Mol Microbiol* **70**, 1342-1357.

Günzler, U. (2010). Die Genregulation durch den Regulator CiaR in Abwesenheit der Kinase CiaH in *Streptococcus pneumoniae*. In *Abteilung Mikrobiologie*. Kaiserslautern: TU Kaiserslautern.

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

Haas, W., Kaushal, D., Sublett, J., Obert, C. & Tuomanen, E. I. (2005). Vancomycin Stress Response in a Sensitive and a Tolerant Strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **187**, 8205-8210.

Hakenbeck, R., Tornette, S. & Adkinson, N. F. (1987). Interaction of non-lytic beta-lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **133**, 755-760.

Hakenbeck, R. (1999). beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and evolutionary mechanism. *Chemotherapy* **45**, 83-94.

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

Hakenbeck, R., Bruckner, R., Denapaite, D. & Maurer, P. (2012). Molecular mechanisms of beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol* **7**, 395-410.

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

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

Halfmann, A. (2008). Identifizierung des Regulons des Zwei-Komponenten Systems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*. In *Abteilung Mikrobiologie*. Kaiserslautern: TU Kaiserslautern.

Halfmann, A., Schnorpfeil, A., Müller, M., Marx, P., Günzler, U., Hakenbeck, R. & Brückner, R. (2011). Activity of the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Mol Microbiol Biotechnol* **20**, 96-104.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

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

He, X., Wu, C., Yarbrough, D., Sim, L., Niu, G., Merritt, J., Shi, W. & 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: TU Kaiserslautern.

Henderson, B. & Martin, A. (2011). Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect Immun* **79**, 3476-3491.

Henriques-Normark, B. & Normark, S. (2010). Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. *Exp Cell Res* **316**, 1408-1414.

Hiller, N. L., Janto, B., Hogg, J. S. & other authors (2007). Comparative Genomic Analyses of Seventeen *Streptococcus pneumoniae* Strains: Insights into the Pneumococcal Supragenome, pp. 8186-8195.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.

Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**, 165-170.

Hoskins, J., Alborn, W. E., Jr., Arnold, J. & other authors (2001). Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6. *J Bacteriol* **183**, 5709-5717.

Hutchings, M. I., Hong, H. J. & Buttner, M. J. (2006). The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **59**, 923-935.

Huynh, T. N. & Stewart, V. (2011). Negative control in two-component signal transduction by transmitter phosphatase activity. *Mol Microbiol* **82**, 275-286.

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

Imöhl, M., Reinert, R. R. & van der Linden, M. (2010). Serotype-specific penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Germany from 1992 to 2008. *Int J Med Microbiol* **300**, 324-330.

Jacobs, M. R., Koornhof, H. J., Robins-Browne, R. M. & other authors (1978). Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* **299**, 735-740.

Jung, K., Fried, L., Behr, S. & Heermann, R. (2011). Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr Opin Microbiol*.

Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5752-5756.

Kaysen, A. (2012). The interconnection of genetic competence and the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*. In *Abteilung Mikrobiologie*: TU Kaiserslautern.

- Kazmierczak, K. M., Wayne, K. J., Rechtsteiner, A. & Winkler, M. E. (2009).** Roles of rel in stringent response, global regulation and virulence of serotype 2 *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* **72**, 590-611.
- Keating, D. H., Shulla, A., Klein, A. H. & Wolfe, A. J. (2008).** Optimized two-dimensional thin layer chromatography to monitor the intracellular concentration of acetyl phosphate and other small phosphorylated molecules. *Biol Proced Online* **10**, 36-46.
- Kharat, A. S. & Tomasz, A. (2006).** Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall. *Mol Microbiol* **60**, 93-107.
- Kim, D. Y. & Kim, K. K. (2005).** Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. *J Biochem Mol Biol* **38**, 266-274.
- King, S. J. (2010).** Pneumococcal modification of host sugars: a major contributor to colonization of the human airway? *Mol Oral Microbiol* **25**, 15-24.
- Kirsch, C. (2011).** Evaluierung des regulatorischen Potentials der kleinen, von CiaR regulierten RNAs in *Streptococcus pneumoniae*. In *Abteilung Mikrobiologie*: TU Kaiserslautern.
- Kislak, J. W., Razavi, L. M., Daly, A. K. & Finland, M. (1965).** Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med Sci* **250**, 261-268.
- Klein, A. H., Shulla, A., Reimann, S. A., Keating, D. H. & Wolfe, A. J. (2007).** The intracellular concentration of acetyl phosphate in *Escherichia coli* is sufficient for direct phosphorylation of two-component response regulators. *J Bacteriol*.
- Klockenbusch, C. & Kast, J. (2010).** Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin beta1. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 927585.
- Kolmar, H., Waller, P. R. & Sauer, R. T. (1996).** The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J Bacteriol* **178**, 5925-5929.
- Koshland, D. E., Jr. (1977).** A response regulator model in a simple sensory system. *Science* **196**, 1055-1063.
- Kovács, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R. & Brückner, R. (2006).** A Functional *dlt* Operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **188**, 5797-5805.
- Kovács, M. (2009).** Die kleinen nicht kodierenden RNAs im Regulon des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*. In *Abteilung Mikrobiologie*. Kaiserslautern: TU Kaiserslautern.
- Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jimenez, H., Guazzaroni, M. E. & Ramos, J. L. (2010).** Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol* **64**, 539-559.
- Lacks, S. & Hotchkiss, R. D. (1960).** A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim Biophys Acta* **39**, 508-518.

- Laible, G. & 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. & other authors (1999).** Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **237**, 223-234.
- Lanie, J. A., Ng, W. L., Kazmierczak, K. M., Andrzejewski, T. M., Davidsen, T. M., Wayne, K. J., Tettelin, H., Glass, J. I. & Winkler, M. E. (2007).** Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* **189**, 38-51.
- Laub, M. T. & Goulian, M. (2007).** Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* **41**, 121-145.
- Lehnik-Habrink, M., Lewis, R. J., Mader, U. & Stulke, J. (2012).** RNA degradation in *Bacillus subtilis*: an interplay of essential endo- and exoribonucleases. *Mol Microbiol* **84**, 1005-1017.
- Lévesque, C. M., Mair, R. W., Perry, J. A., Lau, P. C., Li, Y. H. & Cvitkovitch, D. G. (2007).** Systemic inactivation and phenotypic characterization of two-component systems in expression of *Streptococcus mutans* virulence properties. *Lett Appl Microbiol* **45**, 398-404.
- Li, J., Tan, C., Zhou, Y., Fu, S., Hu, L., Hu, J., Chen, H. & Bei, W. (2011).** The two-component regulatory system CiaRH contributes to the virulence of *Streptococcus suis* 2. *Vet Microbiol* **148**, 99-104.
- Lima, B. P., Thanh Huyen, T. T., Basell, K., Becher, D., Antelmann, H. & Wolfe, A. J. (2012).** Inhibition of acetyl phosphate-dependent transcription by an acetyltable lysine on RNA polymerase. *J Biol Chem* **287**, 32147-32160.
- Liu, Y. & Burne, R. A. (2009a).** Multiple Two-Component Systems of *Streptococcus mutans* Regulate Arginine Deiminase Gene Expression and Stress Tolerance. *J Bacteriol* **191**, 7363-7366.
- Liu, Y. & Burne, R. A. (2009b).** Multiple Two-Component Systems Modulate Alkali Generation in *Streptococcus gordonii* in Response to Environmental Stresses. *J Bacteriol* **191**, 7353-7362.
- Lucchesi, J. C. (1968).** Synthetic lethality and semi-lethality among functionally related mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **59**, 37-44.
- Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M. & Stock, J. B. (1992).** Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 718-722.
- Lüttmann, D., Heermann, R., Zimmer, B., Hillmann, A., Rampp, I. S., Jung, K. & Gorke, B. (2009).** Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA(Ntr) in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **72**, 978-994.
- Lux, T., Nuhn, M., Hakenbeck, R. & Reichmann, P. (2007).** Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **189**, 7741-7751.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970).** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**, 159-162.

- Marmur, J. (1961).** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology* **3**, 208-218.
- Martin, B., Prudhomme, M., Alloing, G., Granadel, C. & 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. & 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: TU Kaiserslautern.
- Mascher, T., Zähner, D., Merai, M., Balmelle, N., de Saizieu, A. B. & Hakenbeck, R. (2003).** The *Streptococcus pneumoniae* cia regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J Bacteriol* **185**, 60-70.
- Mascher, T., Heintz, M., Zähner, D., Merai, M. & Hakenbeck, R. (2006a).** The CiaRH system of *Streptococcus pneumoniae* prevents lysis during stress induced by treatment with cell wall inhibitors and mutations in *pbp2x* involved in β -lactam resistance. *J Bacteriol* **188**, 1959-1978.
- Mascher, T., Helmann, J. D. & Udden, G. (2006b).** Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 910-938.
- Maslennikov, I., Klammt, C., Hwang, E. & other authors (2010).** Membrane domain structures of three classes of histidine kinase receptors by cell-free expression and rapid NMR analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10902-10907.
- Mazda, Y., Kawada-Matsuo, M., Kanbara, K., Oogai, Y., Shibata, Y., Yamashita, Y., Miyawaki, S. & Komatsuzawa, H. (2012).** Association of CiaRH with resistance of *Streptococcus* mutans to antimicrobial peptides in biofilms. *Mol Oral Microbiol* **27**, 124-135.
- McCleary, W. R., Stock, J. B. & Ninfa, A. J. (1993).** Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J Bacteriol* **175**, 2793-2798.
- McCleary, W. R. & Stock, J. B. (1994).** Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem* **269**, 31567-31572.
- McCluskey, J., Hinds, J., Husain, S., Witney, A. & Mitchell, T. J. (2004).** A two-component system that controls the expression of pneumococcal surface antigen A (PsaA) and regulates virulence and resistance to oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **51**, 1661-1675.
- McCullers, J. A., English, B. K. & Novak, R. (2000).** Isolation and characterization of vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* from the cerebrospinal fluid of a patient who developed recrudescence meningitis. *J Infect Dis* **181**, 369-373.
- McKessar, S. J. & Hakenbeck, R. (2007).** The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* **189**, 1342-1350.
- Miller, J. H. (1972).** *Experiments in molecular genetics*. New York: Cold Spring Harbor Press.

- Minnen, A., Attaiech, L., Thon, M., Gruber, S. & Veening, J. W. (2011).** SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **81**, 676-688.
- Mitchell, A. M. & Mitchell, T. J. (2010).** *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect* **16**, 411-418.
- Mitchell, T. J. (2000).** Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* **151**, 413-419.
- Mitchell, T. J. (2003).** The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* **1**, 219-230.
- Mitrophanov, A. Y. & Groisman, E. A. (2008).** Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev* **22**, 2601-2611.
- Moscoso, M., Domenech, M. & 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.
- Müller, M. (2011).** Die Regulation des Zweikomponentensystems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae* und die phänotypischen Konsequenzen. In *Dissertation*: TU Kaiserslautern.
- Müller, M., Marx, P., Hakenbeck, R. & Brückner, R. (2011).** Effect of new alleles of the histidine kinase gene *ciaH* on the activity of the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Microbiology* **157**, 3104-3112.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & 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.
- Nakajima, H., Suzuki, K. & Imahori, K. (1978).** Purification and properties of acetate kinase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biochem* **84**, 193-203.
- Ninfa, A. J. & Magasanik, B. (1986).** Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5909-5913.
- Nixon, B. T., Ronson, C. W. & Ausubel, F. M. (1986).** Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntxB* and *ntxC*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7850-7854.
- Ogura, M., Kawata-Mukai, M., Itaya, M., Takio, K. & Tanaka, T. (1994).** Multiple copies of the *proB* gene enhance *degS*-dependent extracellular protease production in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**, 5673-5680.
- Ottolenghi, E. & Hotchkiss, R. D. (1962).** Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med* **116**, 491-519.
- Overweg, K., Kerr, A., Sluijter, M., Jackson, M. H., Mitchell, T. J., de Jong, A. P., de Groot, R. & Hermans, P. W. (2000).** The putative proteinase maturation protein A of *Streptococcus pneumoniae*

is a conserved surface protein with potential to elicit protective immune responses. *Infect Immun* **68**, 4180-4188.

Paul, R., Jaeger, T., Abel, S., Wiederkehr, I., Folcher, M., Biondi, E. G., Laub, M. T. & Jenal, U. (2008). Allosteric regulation of histidine kinases by their cognate response regulator determines cell fate. *Cell* **133**, 452-461.

Pericone, C. D., Overweg, K., Hermans, P. W. & Weiser, J. N. (2000). Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun* **68**, 3990-3997.

Pericone, C. D., Park, S., Imlay, J. A. & Weiser, J. N. (2003). Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the fenton reaction. *J Bacteriol* **185**, 6815-6825.

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

Peterson, S. N., Sung, C. K., Cline, R. & other authors (2004). Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol Microbiol* **51**, 1051-1070.

Philips, B. J., Meguer, J. X., Redman, J. & Baker, E. H. (2003). Factors determining the appearance of glucose in upper and lower respiratory tract secretions. *Intensive Care Med* **29**, 2204-2210.

Pinas, G. E., Cortes, P. R., Orio, A. G. & Echenique, J. (2008). Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **154**, 1300-1308.

Puyet, A. & Espinosa, M. (1993). Structure of the maltodextrin-uptake locus of *Streptococcus pneumoniae*. Correlation to the *Escherichia coli* maltose regulon. *J Mol Biol* **230**, 800-811.

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

Quach, D., van Sorge, N. M., Kristian, S. A., Bryan, J. D., Shelver, D. W. & Doran, K. S. (2009). The CiaR response regulator in group B *Streptococcus* promotes intracellular survival and resistance to innate immune defenses. *J Bacteriol* **191**, 2023-2032.

Raivio, T. L. & Silhavy, T. J. (1997). Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *J Bacteriol* **179**, 7724-7733.

Ramos-Montanez, S., Tsui, H. C., Wayne, K. J., Morris, J. L., Peters, L. E., Zhang, F., Kazmierczak, K. M., Sham, L. T. & Winkler, M. E. (2008). Polymorphism and regulation of the *spxB* (pyruvate oxidase) virulence factor gene by a CBS-HotDog domain protein (SpxR) in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **67**, 729-746.

Ramos-Montanez, S., Kazmierczak, K. M., Hentchel, K. L. & Winkler, M. E. (2010). Instability of *ackA* (Acetate Kinase) Mutations and Their Effects on Acetyl Phosphate (AcP) and ATP Amounts in *Streptococcus pneumoniae* D39. *J Bacteriol*.

Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Thompson, C. M., Lipsitch, M. & Malley, R. (2007). SpxB is a suicide gene of *Streptococcus pneumoniae* and confers a selective advantage in an in vivo competitive colonization model. *J Bacteriol* **189**, 6532-6539.

Reichmann, P., Varon, E., Günther, E., Reinert, R. R., Lüttiken, R., Marton, A., Geslin, P., Wagner, J. & Hakenbeck, R. (1995). Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Germany: genetic relationship to clones from other European countries. *J Med Microbiol* **43**, 377-385.

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

Reinert, R. R., van der Linden, M., Seegmuller, I., Al-Lahham, A., Siedler, A., Weissmann, B., Toschke, A. M. & von Kries, R. (2007). Molecular epidemiology of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with invasive pneumococcal disease in Germany. *Clin Microbiol Infect* **13**, 363-368.

Rogers, P. D., Liu, T. T., Barker, K. S., Hilliard, G. M., English, B. K., Thornton, J., Swiatlo, E. & McDaniel, L. S. (2007). Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin. *J Antimicrob Chemother* **59**, 616-626.

Russo, F. D. & Silhavy, T. J. (1991). EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J Mol Biol* **222**, 567-580.

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

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual.*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

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

Schultchen-Kamp, S. (2012). Autoregulatorische Aspekte im Regulon des Zwei-Komponenten-Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*. In *Abteilung Mikrobiologie*: TU Kaiserslautern.

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

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

Sevvana, M., Vijayan, V., Zweckstetter, M. & other authors (2008). A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. *J Mol Biol* **377**, 512-523.

Sham, L. T., Tsui, H. C., Land, A. D., Barendt, S. M. & Winkler, M. E. (2012). Recent advances in pneumococcal peptidoglycan biosynthesis suggest new vaccine and antimicrobial targets. *Curr Opin Microbiol*.

Shen, K., Gladitz, J., Antalis, P. & other authors (2006). Characterization, distribution, and expression of novel genes among eight clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **74**, 321-330.

Shi, X., Wegener-Feldbrugge, S., Huntley, S., Hamann, N., Hedderich, R. & Sogaard-Andersen, L. (2008). Bioinformatics and experimental analysis of proteins of two-component systems in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **190**, 613-624.

Shockley, T. E. & Hotchkiss, R. D. (1970). Stepwise introduction of transformable penicillin resistance in *Pneumococcus*. *Genetics* **64**, 397-408.

Sicard, M., Gasc, A. M., Giammarinaro, P., Lefrancois, J., Pasta, F. & Samrakandi, M. (2000). Molecular biology of *Streptococcus pneumoniae*: an everlasting challenge. *Res Microbiol* **151**, 407-411.

Siryaporn, A. & Goulian, M. (2008). Cross-talk suppression between the CpxA-CpxR and EnvZ-OmpR two-component systems in *E. coli*. *Mol Microbiol* **70**, 494-506.

Siryaporn, A. & Goulian, M. (2010). Characterizing cross-talk in vivo avoiding pitfalls and overinterpretation. *Methods Enzymol* **471**, 1-16.

Skerker, J. M., Prasol, M. S., Perchuk, B. S., Biondi, E. G. & Laub, M. T. (2005). Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* **3**, e334.

Spellerberg, B., Cundell, D. R., Sandros, J., Pearce, B. J., Idanpaan-Heikkila, I., Rosenow, C. & Masure, H. R. (1996). Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **19**, 803-813.

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

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

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

Taniai, H., Iida, K., Seki, M., Saito, M., Shiota, S., Nakayama, H. & Yoshida, S. (2008). Concerted action of lactate oxidase and pyruvate oxidase in aerobic growth of *Streptococcus pneumoniae*: role of lactate as an energy source. *J Bacteriol* **190**, 3572-3579.

Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T. & other authors (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**, 498-506.

Thronicke, B. (2010). Die Kontrolle der Expression des Gens spr0081 in *Streptococcus pneumoniae*. In *Abteilung Mikrobiologie*: TU Kaiserslautern.

Throup, J. P., Koretke, K. K., Bryant, A. P. & other authors (2000). A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**, 566-576.

- Tokishita, S., Kojima, A. & Mizuno, T. (1992).** Transmembrane signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*: functional importance of the transmembrane regions of membrane-located protein kinase, EnvZ. *J Biochem* **111**, 707-713.
- Tomasz, A. & Hotchkiss, R. D. (1964).** Regulation of the Transformability of Pneumococcal Cultures by Macromolecular Cell Products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 480-487.
- Tomasz, A. (1966).** Model for the mechanism controlling the expression of competent state in *Pneumococcus* cultures. *J Bacteriol* **91**, 1050-1061.
- Tomasz, A. & Mosser, J. L. (1966).** On the nature of the pneumococcal activator substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 58-66.
- Trappetti, C., Ogunniyi, A. D., Oggioni, M. R. & Paton, J. C. (2011).** Extracellular matrix formation enhances the ability of *Streptococcus pneumoniae* to cause invasive disease. *PLoS One* **6**, e19844.
- Tsui, H. C., Mukherjee, D., Ray, V. A., Sham, L. T., Feig, A. L. & Winkler, M. E. (2010).** Identification and characterization of noncoding small RNAs in *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 strain D39. *J Bacteriol* **192**, 264-279.
- Tsui, H. C., Keen, S. K., Sham, L. T., Wayne, K. J. & Winkler, M. E. (2011).** Dynamic distribution of the SecA and SecY translocase subunits and septal localization of the HtrA surface chaperone/protease during *Streptococcus pneumoniae* D39 cell division. *MBio* **2**.
- Tucker, C. L. & Fields, S. (2003).** Lethal combinations. *Nat Genet* **35**, 204-205.
- van der Linden, M., Al-Lahham, A., Nicklas, W. & Reinert, R. R. (2009).** Molecular characterization of pneumococcal isolates from pets and laboratory animals. *PLoS One* **4**, e8286.
- Wanner, B. L. (1992).** Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J Bacteriol* **174**, 2053-2058.
- Weng, L., Biswas, I. & Morrison, D. A. (2009).** A self-deleting Cre-lox-ermAM cassette, Cheshire, for marker-less gene deletion in *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods* **79**, 353-357.
- West, A. H. & Stock, A. M. (2001).** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-376.
- Wicker, T., Schlagenhaut, E., Graner, A., Close, T. J., Keller, B. & Stein, N. (2006).** 454 sequencing put to the test using the complex genome of barley. *BMC Genomics* **7**, 275.
- Winkler, M. E. & Hoch, J. A. (2008).** Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **190**, 2645-2648.
- 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.
- Wu, C., Ayala, E. A., Downey, J. S., Merritt, J., Goodman, S. D. & Qi, F. (2010).** Regulation of ciaXRH operon expression and identification of the CiaR regulon in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **192**, 4669-4679.

Xu, H., Caimano, M. J., Lin, T., He, M., Radolf, J. D., Norris, S. J., Gherardini, F., Wolfe, A. J. & Yang, X. F. (2010). Role of acetyl-phosphate in activation of the Rrp2-RpoN-RpoS pathway in *Borrelia burgdorferi*. *PLoS Pathog* **6**, e1001104.

Yamada, M., Makino, K., Amemura, M., Shinagawa, H. & Nakata, A. (1989). Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: analysis of mutant *phoB* and *phoR* genes causing different phenotypes. *J Bacteriol* **171**, 5601-5606.

Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R. & Ishihama, A. (2005). Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**, 1448-1456.

Yesilkaya, H., Spissu, F., Carvalho, S. M., Terra, V. S., Homer, K. A., Benisty, R., Porat, N., Neves, A. R. & Andrew, P. W. (2009). Pyruvate formate lyase is required for pneumococcal fermentative metabolism and virulence. *Infect Immun* **77**, 5418-5427.

Zähner, D., Kaminski, K., van der Linden, M., Mascher, T., Merai, M. & Hakenbeck, R. (2002). The *ciaR/ciaH* regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 211-216.

Zapun, A., Contreras-Martel, C. & Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 361-385.

7. Anhang

In Tab. 7.1 und 7.2 sind Daten der β -Galaktosidaseaktivitäten während des gesamten Wachstums von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* und deren Derivate mit genetischen Manipulationen im Acetylphosphat-Syntheseweg dargestellt (vgl Kapitel 4.2.3).

Tab. 7.1: CiaR-Aktivität in Abhängigkeit der Wachstumsphase von *S. pneumoniae* R6 Derivaten mit modifiziertem Pyruvatmetabolismus.

R6 wt

MP	P_{htrA}	$P_{spr0931}$	P_{ccnA}	P_{vegM}
1	193 ± 44 (10)	228 ± 74 (9)	456 ± 96 (4)	932 ± 219 (3)
2	202 ± 53 (14)	230 ± 62 (9)	549 ± 100 (4)	1134 ± 101 (3)
3	260 ± 93 (5)	333 ± 28 (4)	1017 ± 313 (4)	1318 ± 137 (3)
4	363 ± 89 (5)	423 ± 76 (4)	1159 ± 298 (4)	1163 ± 97 (3)
5	362 ± 72 (5)	463 ± 105 (4)	1271 ± 218 (4)	1208 ± 90 (3)

R6 *spxB::ermB*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	Ø:m/wt	P_{vegM}
1	194 ± 1 (2)	1,01	351 ± 85 (2)	1,54	970 ± 126 (2)	2,12	1,55	1150 ± 229 (2)
2	177 ± 37 (2)	0,88	264 ± 31 (2)	1,15	729 ± 21 (2)	1,32	1,12	1372 ± 13 (2)
3	201 ± 25 (2)	0,77	325 ± 134 (2)	0,98	1057 ± 48 (2)	1,03	0,93	1269 ± 233 (2)
4	232 ± 10 (2)	0,63	530 ± 16 (2)	1,25	1358 ± 134 (2)	1,17	1,02	1173 ± 177 (2)
5	233 ± 35 (2)	0,64	538 ± 1 (2)	1,16	1415 ± 115 (2)	1,11	0,97	n.b.

R6 *pta::cat*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	Ø:m/wt	P_{vegM}
1	237 ± 75 (3)	1,23	237 ± 32 (3)	1,04	559 ± 111 (3)	1,23	1,16	1013 ± 40 (2)
2	216 ± 37 (3)	1,07	286 ± 36 (3)	1,24	931 ± 139 (3)	1,70	1,34	1419 ± 301 (2)
3	380 ± 59 (3)	1,46	456 ± 96 (3)	1,36	1355 ± 342 (3)	1,33	1,39	1315 ± 122 (2)
4	379 ± 66 (3)	1,04	472 ± 129 (3)	1,11	1369 ± 155 (3)	1,18	1,11	1308 ± 23 (2)
5	378 ± 75 (3)	1,04	516 ± 138 (3)	1,11	1481 ± 200 (3)	1,17	1,11	1426 ± 80 (2)

R6 *ackA::aphIII*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	Ø:m/wt	P_{vegM}
1	121 ± 55 (2)	0,63	156 ± 64 (2)	0,68	475 ± 91 (3)	1,04	0,78	1364 ± 468 (2)
2	145 ± 18 (2)	0,71	216 ± 25 (2)	0,93	570 ± 113 (3)	1,03	0,90	1481 ± 196 (2)
3	284 ± 99 (2)	1,09	515 ± 35 (2)	1,55	989 ± 524 (3)	0,97	1,20	954 ± 356 (2)
4	428 ± 62 (2)	1,18	512 ± 71 (2)	1,21	948 ± 465 (3)	0,81	1,07	955 ± 207 (2)
5	421 ± 69 (2)	1,16	487 ± 100 (2)	1,05	1014 ± 493 (3)	0,80	1,00	999 ± 161 (2)

R6 *pta::cat ackA::aphIII*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	Ø:m/wt	P_{vegM}
1	287 ± 25 (2)	1,49	331 ± 49 (2)	1,45	893 ± 23 (2)	1,96	1,63	1029 ± 39 (2)
2	265 ± 21 (2)	1,31	252 ± 28 (2)	1,10	777 ± 203 (2)	1,91	1,27	1378 ± 421 (2)
3	312 ± 60 (2)	1,2	412 ± 67 (2)	1,23	1094 ± 71 (2)	1,08	1,17	1197 ± 124 (2)
4	360 ± 42 (2)	0,99	391 ± 60 (2)	0,92	1110 ± 23 (2)	0,95	0,95	1017 ± 240 (2)
5	369 ± 4 (2)	1,02	420 ± 62 (2)	0,91	1027 ± 52 (2)	0,81	0,91	1158 ± 131 (2)

R6 *spxB::ermB ackA::aphIII*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	\emptyset :m/wt	P_{vegM}
1	233 ± 74 (2)	1,21	304 ± 111 (2)	1,33	875 ± 168 (2)	1,92	1,49	883 ± 91 (2)
2	199 ± 24 (2)	0,98	339 ± 139 (2)	1,47	840 ± 130 (2)	1,53	1,32	1068 ± 1 (2)
3	346 ± 46 (2)	1,33	505 ± 95 (2)	1,51	1392 ± 325 (2)	1,37	1,41	1026 ± 265 (2)
4	352 ± 21 (2)	0,96	552 ± 125 (2)	1,30	1463 ± 23 (2)	1,26	1,17	941 ± 22 (2)
5	413 ± 90 (2)	1,14	466 ± 115 (2)	1,01	1569 ± 221 (2)	1,23	1,13	1101 ± 214 (2)

R6 *spxB::ermB pta::cat*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	\emptyset :m/wt	P_{vegM}
1	360 ± 54 (4)	1,86	314 ± 53 (4)	1,37	829 ± 255 (3)	1,81	1,68	1045 ± 44 (2)
2	326 ± 25 (4)	1,61	295 ± 61 (4)	1,28	848 ± 116 (3)	1,54	1,48	1488 ± 232 (2)
3	286 ± 40 (2)	1,1	356 ± 164 (2)	1,07	971 ± 61 (3)	0,95	1,04	1376 ± 65 (2)
4	431 ± 9 (2)	1,18	477 ± 16 (2)	1,13	1039 ± 300 (3)	0,89	1,07	1364 ± 11 (2)
5	450 ± 14 (2)	1,24	485 ± 74 (2)	1,04	1189 ± 299 (3)	0,94	1,08	1265 ± 125 (2)

R6 *spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	\emptyset :m/wt	P_{vegM}
1	243 ± 18 (4)	1,26	313 ± 66 (4)	1,37	597 ± 170 (2)	1,31	1,31	1018 ± 216 (2)
2	208 ± 24 (4)	1,03	259 ± 43 (4)	1,13	614 ± 114 (2)	1,11	1,09	1308 ± 134 (2)
3	306 ± 36 (2)	1,17	358 ± 108 (2)	1,08	835 ± 562 (2)	0,82	1,02	1030 ± 285 (2)
4	466 ± 40 (2)	1,28	471 ± 59 (2)	1,11	1400 ± 235 (2)	1,21	1,20	1057 ± 257 (2)
5	466 ± 35 (2)	1,28	486 ± 13 (2)	1,05	1263 ± 150 (2)	0,99	1,11	1057 ± 297 (2)

Durch die Promotoren P_{htrA} , $P_{spr0931}$, P_{ccnA} und P_{vegM} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium.

Die Messungen erfolgten bei einer OD_{600} von 0,4 (MP1), OD_{600} von 0,8 (MP2), 30 min nach Erreichen von OD_{600} 0,8 (MP3), 30 min nach Erreichen von MP3 (T4) und 45 min nach Erreichen von MP4 (MP5).

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen unabhängiger Experimente sind angegeben, die Anzahl der jeweiligen Durchgänge steht in Klammern. m/wt gibt das Vielfache der β -Galaktosidaseaktivität der jeweiligen Mutante zum R6-Wiltyp an, \emptyset :m/wt im Mittel.

Tab. 7.2: CiaR-Aktivität in Abhängigkeit der Wachstumsphase von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* und Derivaten mit modifiziertem Pyruvatmetabolismus.

Durch die Promotoren P_{htrA} , $P_{spr0931}$, P_{ccnA} und P_{vegM} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in Derivaten von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* mit genetischen Veränderungen im AcP-Syntheseweg

MP	P_{htrA}	$P_{spr0931}$	P_{ccnA}	P_{vegM}
1	172 ± 33 (4)	261 ± 56 (7)	612 ± 125 (3)	935 ± 172 (2)
2	240 ± 52 (4)	303 ± 64 (7)	736 ± 105 (3)	1322 ± 12 (2)
3	288 ± 10 (2)	347 ± 84 (3)	826 ± 166 (3)	990 ± 320 (2)
4	314 ± 24 (2)	403 ± 57 (3)	857 ± 195 (3)	982 ± 294 (2)
5	318 ± 25 (2)	405 ± 74 (3)	836 ± 340 (3)	924 ± 108 (2)

R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	Ø:m/wt	P_{vegM}
1	93 ± 16 (2)	0,54	87 ± 13 (2)	0,33	218 ± 11 (2)	0,36	0,41	1028 ± 290 (2)
2	172 ± 1 (2)	0,72	157 ± 8 (2)	0,52	387 ± 12 (2)	0,53	0,59	1314 ± 399 (2)
3	243 ± 25 (2)	0,84	228 ± 1 (2)	0,66	471 ± 107 (2)	0,57	0,69	1438 ± 460 (2)
4	279 ± 28 (2)	0,89	254 ± 11 (2)	0,63	482 ± 54 (2)	0,56	0,69	1289 ± 255 (2)
5	290 ± 18 (2)	0,91	270 ± 44 (2)	0,67	553 ± 17 (2)	0,66	0,74	1358 ± 291 (2)

R6 *ciaH::aad9 pta::cat*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	Ø:m/wt	P_{vegM}
1	231 ± 25 (2)	1,34	286 ± 50 (2)	1,10	650 ± 61 (5)	1,06	1,17	1153 ± 331 (2)
2	251 ± 28 (2)	1,05	308 ± 43 (2)	1,02	671 ± 113 (5)	0,91	0,99	1244 ± 229 (2)
3	279 ± 39 (2)	0,97	299 ± 45 (2)	0,86	671 ± 100 (5)	0,81	0,88	1201 ± 238 (2)
4	274 ± 32 (2)	0,87	362 ± 48 (2)	0,90	704 ± 109 (5)	0,82	0,86	1295 ± 281 (2)
5	262 ± 5 (2)	0,82	360 ± 38 (2)	0,89	676 ± 127 (5)	0,81	0,85	1260 ± 231 (2)

R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB ackA::aphIII*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	Ø:m/wt	P_{vegM}
1	2583 ± 425 (2)	15,0	2738 ± 656 (3)	10,5	5645 ± 1426 (3)	9,2	11,6	975 ± 224 (3)
2	3893 ± 189 (2)	16,2	4210 ± 153 (3)	13,9	7211 ± 393 (3)	9,8	13,3	1043 ± 97 (3)
3	4434 ± 454 (2)	15,4	4707 ± 333 (3)	13,6	8197 ± 989 (3)	9,9	13,0	1330 ± 201 (3)
4	4464 ± 585 (2)	14,2	5386 ± 403 (3)	13,4	9213 ± 1451 (3)	10,8	12,8	1346 ± 105 (3)
5	5033 ± 424 (2)	15,8	5422 ± 820 (3)	13,4	8554 ± 1250 (3)	10,2	13,1	1301 ± 99 (3)

R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	Ø:m/wt	P_{vegM}
1	82 ± 17 (6)	0,48	74 ± 7 (5)	0,28	154 ± 14 (3)	0,25	0,34	835 ± 170 (4)
2	112 ± 10 (6)	0,47	118 ± 15 (5)	0,39	199 ± 35 (3)	0,27	0,38	1035 ± 63 (4)
3	144 ± 47 (2)	0,5	160 ± 15 (3)	0,46	278 ± 31 (3)	0,33	0,43	1130 ± 152 (4)
4	179 ± 16 (2)	0,57	182 ± 10 (3)	0,45	294 ± 10 (3)	0,34	0,45	1204 ± 68 (4)
5	177 ± 20 (2)	0,55	184 ± 4 (3)	0,45	290 ± 20 (3)	0,34	0,45	1166 ± 71 (4)

R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII*

MP	P_{htrA}	m/wt	$P_{spr0931}$	m/wt	P_{ccnA}	m/wt	Ø:m/wt	P_{vegM}
1	35 ± 13 (5)	0,20	28 ± 7 (4)	0,11	65 ± 12 (3)	0,11	0,14	1008 ± 344 (2)
2	44 ± 13 (5)	0,18	33 ± 6 (4)	0,11	85 ± 28 (3)	0,11	0,14	1131 ± 296 (2)
3	56 ± 11 (3)	0,19	49 ± 19 (3)	0,14	95 ± 20 (3)	0,12	0,15	1247 ± 136 (2)
4	56 ± 8 (3)	0,18	53 ± 13 (3)	0,13	113 ± 39 (3)	0,13	0,14	1373 ± 48 (2)
5	67 ± 14 (3)	0,21	56 ± 18 (3)	0,14	120 ± 26 (3)	0,14	0,16	1206 ± 431 (2)

Durch die Promotoren P_{htrA} , $P_{spr0931}$, P_{ccnA} und P_{vegM} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium.

Die Messungen erfolgten bei einer OD₆₀₀ von 0,4 (MP1), OD₆₀₀ von 0,8 (MP2), 30 min nach Erreichen von OD₆₀₀ 0,8 (MP3), 30 min nach Erreichen von MP3 (MP4) und 45 min nach Erreichen von MP4 (MP5).

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen unabhängiger Experimente sind angegeben, die Anzahl der jeweiligen Durchgänge steht in Klammern. m/wt gibt das Vielfache der β -Galaktosidaseaktivität der jeweiligen Mutante zum Stamm mit der *ciaH*-Deletion und dem SpxB-Pta-AckA-Wildtyp an, \emptyset :m/wt im Mittel.

In Tab. 7.3 und 7,4 sind die Ergebnisse der β -Galaktosidaseassays von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* in C+Y-Medien mit verschiedenen Zuckerquellen bei OD₆₀₀ von 0,4 dargestellt (vgl. Kapitel 4.2.7).

Tab. 7.3: Der Einfluss der C-Quelle auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6

Stamm	C-Quelle	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	Mutante / wt
RKL43	Glucose & Saccharose	P _{htrA}	193 \pm 44 (9)	1,01
RKL3		P _{spr0931}	228 \pm 74(9)	0,97
RKL43	Glucose	P _{htrA}	191 \pm 53	
RKL30		P _{spr0931}	236 \pm 76	
RKL43	Lactose	P _{htrA}	235 \pm 43	1,23
RKL30		P _{spr0931}	290 \pm 48	1,23
RKL43	Galactose	P _{htrA}	286 \pm 29	1,21
RKL30		P _{spr0931}	301 \pm 79	1,28

Durch die Promotoren P_{htrA} und P_{spr0931} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 in C+Y-Medien mit verschiedenen C-Quellen.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4.

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

Tab. 7.4: Der Einfluss der C-Quelle auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6

Stamm	C-Quelle	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	Mutante / wt
RKL86	Glucose & Saccharose	P _{htrA}	172 \pm 33 (4)	0,66
RKL81		P _{spr0931}	261 \pm 56 (7)	0,89
RKL86	Glucose	P _{htrA}	262 \pm 52	
RKL81		P _{spr0931}	292 \pm 72	
RKL86	Lactose	P _{htrA}	205 \pm 44	0,78
RKL81		P _{spr0931}	240 \pm 41	0,82
RKL86	Galactose	P _{htrA}	482 \pm 114	1,84
RKL81		P _{spr0931}	414 \pm 93	1,41

Durch die Promotoren P_{htrA} und P_{spr0931} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* in C+Y-Medien mit verschiedenen C-Quellen.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4.

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

Tab. 7.5: Änderung der Promotoraktivitäten von P_{htrA} und $P_{spr0931}$ von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* zum R6-Wildtyp in modifizierten C+Y-Medien

C+Y-Medium	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	R6 <i>ciaH::aad9</i> / R6 (<i>ciaRH</i> -wt)
C+Y	P_{htrA}	0,89
	$P_{spr0931}$	1,14
C+Y _{Glc}	P_{htrA}	1,37
	$P_{spr0931}$	1,24
C+Y _{Lac}	P_{htrA}	0,87
	$P_{spr0931}$	0,83
C+Y _{Gal}	P_{htrA}	1,69
	$P_{spr0931}$	1,38

Die Werte wurden aus den Daten von Tab 7.3 und 7.4 ermittelt.

In Tab. 7.6 und 7.7 sind die Ergebnisse der β -Galaktosidaseassays von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* in C+Y-Medien mit verschiedenen Acetatmengen bei OD₆₀₀ von 0,4 dargestellt (vgl Kapitel 4.2.8).

Tab. 7.6: Die Auswirkungen von Acetat auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6

Stamm (<i>ciaRH</i> -wt)	Acetat-konzentration [mmol/l]	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	Verändertes C+Y / C+Y
RKL43	0	P_{htrA}	231 \pm 49 (4)	1,20
RKL30	0	$P_{spr0931}$	201 \pm 29 (3)	0,88
RKL43	12,5	P_{htrA}	193 \pm 44 (9)	
RKL30	12,5	$P_{spr0931}$	228 \pm 74(9)	
RKL43	25	P_{htrA}	175 \pm 42 (4)	0,91
RKL30	25	$P_{spr0931}$	225 \pm 101 (3)	0,99
RKL43	50	P_{htrA}	168 \pm 35 (5)	0,87
RKL30	50	$P_{spr0931}$	197 \pm 50 (6)	0,86
RKL43	50 ¹	P_{htrA}	161 \pm 42 (3)	0,83
RKL30	50 ¹	$P_{spr0931}$	200 \pm 13 (3)	0,87
RKL43	0 ²	P_{htrA}	240 \pm 80 (3)	1,24
RKL30	0 ²	$P_{spr0931}$	208 \pm 12 (3)	0,91

Durch die Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in C+Y-Medien mit verschiedenen Acetatkonzentrationen.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte im jeweiligen C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4.

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

¹Anstelle von Na-Acetat wurden 50 mmol/l K-Acetat ins C+Y-Medium gegeben.

²Anstelle von Na-Acetat wurden 50 mmol/l KCl ins C+Y-Medium gegeben.

Tab. 7.7: Die Auswirkungen von Acetat auf die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9*

Stamm (<i>ciaH::aad9</i>)	Acetat- konzentration [mmol/l]	Promotor- <i>lacZ</i> - Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	Verändertes C+Y / C+Y
RKL86	0	P _{htrA}	108 \pm 35 (3)	0,63
RKL81	0	P _{spr0931}	167 \pm 44 (3)	0,64
RKL86	12,5	P _{htrA}	172 \pm 33 (4)	
RKL81	12,5	P _{spr0931}	261 \pm 56 (7)	
RKL86	25	P _{htrA}	265 \pm 37 (3)	1,54
RKL81	25	P _{spr0931}	335 \pm 35 (2)	1,28
RKL86	50	P _{htrA}	367 \pm 31 (2)	2,13
RKL81	50	P _{spr0931}	661 \pm 83 (4)	2,53
RKL86	50 ¹	P _{htrA}	343 \pm 41 (3)	1,99
RKL81	50 ¹	P _{spr0931}	535 \pm 55 (4)	2,05
RKL86	0 ²	P _{htrA}	139 \pm 13 (3)	0,81
RKL81	0 ²	P _{spr0931}	197 \pm 32	0,75

Durch die Promotoren P_{htrA} und P_{spr0931} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in C+Y-Medien mit verschiedenen Acetatkonzentrationen.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte im jeweiligen C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4.

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

¹Anstelle von Na-Acetat wurden 50 mmol/l K-Acetat ins C+Y-Medium gegeben.

²Anstelle von Na-Acetat wurden 50 mmol/l KCl ins C+Y-Medium gegeben.

Tab 7.8 zeigt die Ergebnisse der β -Galaktosidaseassays von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat*, Tab. 7.9 von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII* in C+Y-Medien mit verschiedenen Acetatmengen bei OD₆₀₀ von 0,4.

Tab. 7.8: Der Einfluss von Acetat in Kombination von genetisch modifiziertem Pyruvat-metabolismus auf die CiaR-Aktivität (*S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat*)

Stamm	Acetatkonzentration [mmol/l]	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	Verändertes C+Y / C+Y Standard
RKL412	0	P_{htrA}	56 \pm 1 (4)	0,68
RKL413		$P_{spr0931}$	45 \pm 10 (3)	0,61
RKL412	12,5	P_{htrA}	82 \pm 17 (6)	
RKL413		$P_{spr0931}$	74 \pm 7 (5)	
RKL412	50	P_{htrA}	205 \pm 28 (4)	2,5
RKL413		$P_{spr0931}$	218 \pm 30 (4)	2,9

Durch die Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in C+Y-Medien mit verschiedenen Acetat-Konzentrationen.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in den jeweiligen C+Y-Medien bis zu einer OD_{600} von 0,4.

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

Tab. 7.9: Der Einfluss von Acetat in Kombination von genetisch modifiziertem Pyruvat-metabolismus auf die CiaR-Aktivität (*S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 spxB::ermB pta::cat ackA::aphIII*)

Stamm	Acetatkonzentration [mmol/l]	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung	Verändertes C+Y / C+Y Standard
RKL374	0	P_{htrA}	22 \pm 4 (3)	0,63
RKL378		$P_{spr0931}$	17 \pm 6 (3)	0,61
RKL374	12,5	P_{htrA}	35 \pm 13 (5)	
RKL378		$P_{spr0931}$	28 \pm 7 (4)	
RKL374	50	P_{htrA}	54 \pm 9 (4)	1,54
RKL378		$P_{spr0931}$	56 \pm 8 (3)	2

Durch die Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in C+Y-Medien mit verschiedenen Acetat-Konzentrationen.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in den jeweiligen C+Y-Medien bis zu einer OD_{600} von 0,8.

Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

In Tab. 7.10 sind die Ergebnisse der β -Galaktosidaseassays von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* in BHI- und BHI_{Acetat}-Medium bei OD_{600} von 0,4 dargestellt (vgl Kapitel 4.2.9).

Tab. 7.10: Der Einfluss von Acetat in BHI-Medium auf die CiaR-Aktivität

Genetik	Stamm	Medium	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung	BHI _{Acetat} / BHI
<i>ciaRH</i> -wt	RKL43	BHI	P_{htrA}	439 \pm 36 (4)	
	RKL30		$P_{spr0931}$	561 \pm 61 (4)	
	RKL43	BHI _{Acetat}	P_{htrA}	173 \pm 4 (4)	0,39
	RKL30		$P_{spr0931}$	227 \pm 43 (4)	0,40
<i>ciaH::aad9</i>	RKL86	BHI	P_{htrA}	43 \pm 1 (3)	
	RKL81		$P_{spr0931}$	164 \pm 55 (3)	
	RKL86	BHI _{Acetat}	P_{htrA}	441 \pm 24 (3)	10,3
	RKL81		$P_{spr0931}$	1095 \pm 156 (3)	6,7

Durch die *cia*-regulierten Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ vermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9* nach Wachstum in BHI-Medium und BHI_{Acetat}-Medium. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Anzahl der jeweiligen Durchgänge ist in Klammern angegeben.

Tab. 7.11 zeigt Ergebnisse der β -Galaktosidaseassays von *S. pneumoniae*-Stämmen mit verschiedenen *ciaH*-Allelen in BHI- und BHI_{Acetat}-Medium bei OD₆₀₀ von 0,4 (vgl. Kapitel 4.3).

Tab. 7.11: Die CiaR-Aktivität in *S. pneumoniae*-Stämmen mit verschiedenen *ciaH*-Allelen in BHI-Medium und BHI_{Acetat}-Medium.

<i>ciaH</i> -Allel	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusion	β -Galaktosidaseaktivität (U) \pm Standardabweichung		<i>ciaH</i> -Allel / <i>ciaH</i> wt	BHI / BHI _{Acetat}
		BHI	BHI _{Acetat}		
<i>ciaH</i> -wt	P_{htrA}	439 \pm 36	173 \pm 4		2,53
	$P_{spr0931}$	561 \pm 61	227 \pm 43		2,47
<i>ciaH232</i>	P_{htrA}	316 \pm 20	71 \pm 4	0,72	4,45
	$P_{spr0931}$	445 \pm 15	88 \pm 8	0,79	5,06
<i>ciaH556</i>	P_{htrA}	507 \pm 27	130 \pm 10	1,15	3,9
	$P_{spr0931}$	690 \pm 38	179 \pm 16	1,23	3,85
<i>ciaH1057</i>	P_{htrA}	476 \pm 50	121 \pm 3	1,08	3,93
	$P_{spr0931}$	703 \pm 78	192 \pm 27	1,25	3,66
<i>ciaHTpVT</i>	P_{htrA}	777 \pm 37	496 \pm 80	1,77	1,56
	$P_{spr0931}$	888 \pm 74	758 \pm 100	1,58	1,17
<i>ciaH306</i>	P_{htrA}	3278 \pm 100	4256 \pm 267	7,47	0,77
	$P_{spr0931}$	3008 \pm 397	3924 \pm 508	5,36	0,77

Durch die Promotoren P_{htrA} und $P_{spr0931}$ vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae*-Stämmen mit verschiedenen *ciaH*-Allelen in BHI-Medium und BHI_{Acetat}-Medium. Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI- und BHI_{Acetat}-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Standardabweichungen sind angegeben.

Im Folgenden sind Sequenzen von *ciaR* und *spxB* dargestellt; die aufgetretene Änderung im jeweiligen Gen in der nach dem Wachstum in C+Y-Medium isolierten Einzelkolonie des Stammes *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 htrA::lox72 ackA::aphIII* ist gesondert markiert (vgl. Kapitel 4.2.5).

```

tctcatgtaa aatgcagaga gttgagtttt ttttaaggca aatttggtat aatagtttta
ataaggagga gtttctcatg ataaaaatct tattggttga ggatgaccta ggtctgtcaa
>>.....ciaR.....>
      m i k i l l v e d d l g l s
attcagtatt tgacttttta gacgattttg cggatgttat gcaggatttt gatggagaag
>.....ciaR.....>
      n s v f d f l d d f a d v m q v f d g e
aaggtctcta cgaagctgag agtgggtgtct atgacttgat tttgetggat ttgatgttcc
>.....ciaR.....>
      e g l y e a e s g v y d l i l l d l m l
cagaaaaaaaa tggtttccaa gtcttaaaag aattgcgtga aaagggaatt acgacaccag
>.....ciaR.....>
      p e k n g f q v l k e l r e k g i t t p
ttctgattat gactgccaag gaaagtttgg atgacaaggg acatggattt gaactgggag
>.....ciaR.....>
      v l i m t a k e s l d d k g h g f e l g
cggatgatta tctgacccaa cttttctacc tagaagaact taaaatgcgg attcaggccc
>.....ciaR.....>
      a d d y l t k p f y l e e l k m r i q a
ttctcaaacg ttcaggggaag tttaatgaaa acaccttgac ttatgggaat atcgtggtta
>.....ciaR.....>
      l l k r s g k f n e n t l t y g n i v v
atztatcaac caataccggt aaagttgaag atactcctgt cgaattgctg gggaaagagt
>.....ciaR.....>
      n l s t n t v k v e d t p v e l l g k e
tcgatttact agtttatttc cttcaaaatc aaaatgtgat tttgcctaag acgcagattt
>.....ciaR.....>
      f d l l v y f l q n q n v i l p k t q i
ttgaccgtct atggggattt gatagtgata caacgatttc ggttgctgaa gtctatgttt
>.....ciaR.....>
      f d r l w g f d s d t t i s v v e v y v
caaaagtccg taagaaatta aaggaacca cttttgcaga gaatttgcaa accttgcgta
>.....ciaR.....>
      s k v r k k l k g t t f a e n l q t l r
gtgttgggta tcttttaaaa gatgttcagt aaacttaaaa aaacatggta tgcggatgac
>.....ciaR.....>>
      s v g y l l k d v q -

```

Abb. 7.1: Sequenz von *ciaR* in einer nach Wachstum in C+Y-Medium isolierten mittelgroßen Einzelkolonie von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 htrA::lox72 ackA::aphIII pPP2-spr0931 (RKL387)*. Gezeigt ist die Sequenz von *ciaR*, wobei die in der Einzelkolonie von RKL387 deletierten Bereiche von *ciaR* rot markiert und durchgestrichen sind.

```

tgtaaaatgc agagagttga gtttttttta aggcaaattt ggtataatag ttttaataag
gaggagtttc tcatgataaa aatccttattg gttgaggatg acctaggtct gtcaaattca
>>.....ciaR.....>
    m i k i l l v e d d l g l s n s
gtatttgact ttttagacga ttttgccgat gttatgcagg tatttgatgg agaagaaggt
>.....ciaR.....>
    v f d f l d d f a d v m q v f d g e e g
ctctacgaag ctgagagtgg tgtctatgac ttgattttgc tggatttgat gttgccagaa
>.....ciaR.....>
    l y e a e s g v y d l i l l d l m l p e
aaaaatgggt tccaagtctt aaaagaattg cgtgaaaagg gaattacgac accagttctg
>.....ciaR.....>
    k n g f q v l k e l r e k g i t t p v l
attatgactg ccaaggaaag tttggatgac aaggacatg gatttgaact gggagcggat
>.....ciaR.....>
    i m t a k e s l d d k g h g f e l g a d
gattatctga ccaaaccctt ctacctagaa gaacttaaaa tgcggattca ggcccttctc
>.....ciaR.....>
    d y l t k p f y l e e l k m r i q a l l
aaacgttcag ggaagtttaa tgaaaacacc ttgacttatg ggaatatcgt ggtaattta
>.....ciaR.....>
    k r s g k f n e n t l t y g n i v v n l
tcaaccaata cgttaaagt tgaagatact cctgtcgaat tgctggggaa agagttcgat
>.....ciaR.....>
    s t n t v k v e d t p v e l l g k e f d
ttactagttt atttccttca aaattaaaaat gtgattttgc ctaagacgca gatttttgac
>.....ciaR.....>
    l l v y f l q n - n v i l p k t q i f d
cgtctatggg gatttgatag tgatacaacg atttcggttg tcgaagtcta tgtttcaaaa
>.....ciaR.....>
r l w g f d s d t t i s v v e v y v s k
gtccgtaaga aattaaagg aaccactttt gcagagaatt tgcaaaccct gcgtagtggt
>.....ciaR.....>
v r k k l k g t t f a e n l q t l r s v
gggtatcttt taaaagatgt tcagtaaact taaaaaaca tggtatgcgg atgactttag
>.....ciaR.....>>
g y l l k d v q

```

Abb. 7.2: Sequenz von *ciaR* in einer nach Wachstum in C+Y-Medium isolierten mittelgroßen Einzelkolonie von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 htrA::lox72 ackA::aphIII pPP2-ccnA (RKL388)*. Das Stoppcodon ist rot markiert. Die nachfolgenden in der Annotation dargestellten Aminosäuren, die nicht translatiert werden, sind durchgestrichen.


```

cattatgact caagggaaaa ttactgcac tgcagcaatg cttaacgtat tgaaaacatg
>>.....spxB.....>
  m t q g k i t a s a a m l n v l k t

ggcgtagat acaatctacg gtatcccatc aggaacactc agctcattga tggacgcttt
>.....spxB.....>
w g v d t i y g i p s g t l s s l m d a

ggctgaagac aaagatatcc gcttcttaca agttcgccac gaagagacag gtgctcttgc
>.....spxB.....>
l a e d k d i r f l q v r h e e t g a l

agcggttatg caagctaaat tcggcggctc aatcggggtt gcagttggtt caggtggctc
>.....spxB.....>
a a v m q a k f g g s i g v a v g s g g

                                tat
aggtgcgact cacttgatta acggtgttta cgatgcagct atggatgaca ctccattcct
>.....spxB.....>
p g a t h l i n g v y d a a m d d t p f
                                y

agcgatcctt ggatcacgtc cagttaacga attgaacatg gatgctttcc aagagcttaa
>.....spxB.....>
l a i l g s r p v n e l n m d a f q e l

ccaaaacca atgtacaacg gtatcgctgt ttacaacaaa cgtgtagctt acgctgagca
>.....spxB.....>
n q n p m y n g i a v y n k r v a y a e

attgcaaaa gtaattgacg aagcctgccg tgctgcaatt tctaaaaaag gtccagctgt
>.....spxB.....>
q l p k v i d e a c r a a i s k k g p a

tgttgaaatt ccagtaaact tcggtttcca agaaatcgac gaaaactcat actacggttc
>.....spxB.....>
v v e i p v n f g f q e i d e n s y y g

aggttcatac gaacgctcat tcatcgctcc tgctttgaac gaagttgaaa tcgacaaagc
>.....spxB.....>
s g s y e r s f i a p a l n e v e i d k

tgttgaaatc ttgaacaatg ctgaacgcc agttatctat gctggatttg gtgggttaa
>.....spxB.....>
a v e i l n n a e r p v i y a g f g g v

agctggtgaa gtgattactg aattgtcacg taaaatcaaa gcaccaatca tcacaactgg
>.....spxB.....>
k a g e v i t e l s r k i k a p i i t t

taaaaacttt gaagctttcg aatggaacta tgaaggtttg acaggttctg cttaccgtgt
>.....spxB.....>
g k n f e a f e w n y e g l t g s a y r

tggttgaaaa ccagccaacg aagtggctct tgaagcagac acagttcttt tccttggttc
>.....spxB.....>
v g w k p a n e v v f e a d t v l f l g

aaacttcgca tttgctgaag tttacgaagc attcaagaac actgaaaaat tcatacaagt
>.....spxB.....>
s n f a f a e v y e a f k n t e k f i q

```

```

cgatatcgac ccttacaac ttggtaaacg tcatgccctt gacgcttcaa tccttggtga
>.....spxB.....>
v d i d p y k l g k r h a l d a s i l g

tgctggtcaa gcagctaaag ctatccttga caaagtaaac ccagttgaat caactccatg
>.....spxB.....>
d a g q a a k a i l d k v n p v e s t p

gtggcgtgca aacgttaaga acaaccaaaa ctggcgtgat tacatgaaca aactcgaag
>.....spxB.....>
w w r a n v k n n q n w r d y m n k l e

taaaactgag ggtgaattgc aattgtatca agtttacaat gcaatcaaca aacatgctga
>.....spxB.....>
g k t e g e l q l y q v y n a i n k h a

tcaagacgct atctactcaa tcgacgtagg taacactact caaacatcta ctgctcact
>.....spxB.....>
d q d a i y s i d v g n t t q t s t r h

tcacatgaca cctaagaata tgtggcgtac atctccgctc tttgcgacaa tgggtattgc
>.....spxB.....>
l h m t p k n m w r t s p l f a t m g i

ccttcctggt ggtatcgtg ctaagaaaga caatccagat cgccaagtat ggaacatcat
>.....spxB.....>
a l p g g i a a k k d n p d r q v w n i

                                tac
gggtgatgga gcattcaaca tgtgctaccc agacgttata acaaacgttc aatacgacct
>.....spxB.....>
m g d g a f n m c y p d v i t n v q y d
                                Y

tccagttatc aaccttgtct tctcaaatgc tgagtacggc ttcacatcaaga acaaatacga
>.....spxB.....>
l p v i n l v f s n a e y g f i k n k y

agatacaaac aaacacttgt ttggtgtaga cttcacaac gctgactacg ctaaaattgc
>.....spxB.....>
e d t n k h l f g v d f t n a d y a k i

ggaagctcaa ggagctggtg gattcacagt tgaccgtatc gaagacatcg atgcagttgt
>.....spxB.....>
a e a q g a v g f t v d r i e d i d a v

tgcagaagct gttaaattga acaagaagg taaaactggt gtcacatgatg ctgcacatcac
>.....spxB.....>
v a e a v k l n k e g k t v v i d a r i

tcaacaccgt ccacttccag tagaagtact tgaattggat caaaacttc actcagaaga
>.....spxB.....>
t q h r p l p v e v l e l d p k l h s e

agctatcaaa gccttcaagg aaaaatacga agcagaagaa ctgctaccat tccgtctctt
>.....spxB.....>
e a i k a f k e k y e a e e l v p f r l

cttgaagaa gaaggattgc aatcacgocg aattaataa ttcctctcgc cgaaaatcaa
>.....spxB.....>>
f l e e e g l q s r a i k -

```

Abb. 7.3: Sequenz von *spxB* in den nach Wachstum in C+Y-Medium isolierten großen Einzelkolonien von *S. pneumoniae* R6 *ciaH::aad9 htrA::lox72 ackA::aphIII pPP2-spr0931* und *pPP2-ccnA* (RKL387, RKL388).
Dargestellt ist die Sequenz von *spxB*. Die jeweiligen Punktmutationen und Aminosäuresubstitutionen sind rot dargestellt bzw. unterstrichen.

Publikationen

Publikationen des Autors, die Gegenstand vorliegender Arbeit sind:

Müller, M., Marx, P., Hakenbeck, R., Brückner, R. (2011). Effect of new alleles of the histidine kinase gene *ciaH* on the activity of the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Microbiology* 157, 3104-3112.

Weitere Publikationen des Autors, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind:

Marx, P., Nuhn, M., Kovacs, M., Hakenbeck, R., 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.

Halfmann, A., Schnorpfeil, A., Müller, M., Marx, P., Günzler, U., Hakenbeck, R., Brückner, R. (2011). Activity of the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Mol Microbiol Biotechnol* 20, 96-104.

Vielen Dank!

Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck danke ich für die tolle Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen und das stetige Interesse.

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

Ein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Reinhold Brückner. Vielen Dank für die ausgezeichnete Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen, die bedeutsamen Ideen zu dieser Arbeit und nicht zuletzt die vielen hilfreichen Ratschläge, auch über das Fachliche hinausgehend.

Danke auch an Dr. Miriam Kranz, Dr. Alex Halfmann, Ulrike Günzler, Katharina Peters und Dr. Márta Kovács für die Bereitstellung von Konstrukten und Stämmen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, sowie Dr. Dalia Denapaite für die Hilfe mit dem Gewirr der Genomanalyse.

Wolfgang Jeblick von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Neuhaus danke ich für die freundliche Bereitstellung des Luminometers.

Für die angenehme und nie langweilige Laboratmosphäre danke ich allen Kolleginnen und Kollegen der letzten Jahre: Abderrahim, Alexander, Andreas, Anett, Anette, Anke, Anne, Annika, Barbara, Beatrice, Bernhard, Brigitte R., Brigitte S., Carsten, Cathrin, Christian, Christine, Christoph, Dalia, Daniel, Hendrik, Katharina, Katja, Katya, Kerstin, Manuela, Marcel W., Marina, Markus, Márta, Martin B., Martin R., Melanie F., Michael, Michèle, Miriam, Nadja, Nathalie, Ilka, Ines, Inga, Irma, Jennifer G., Jennifer, L., Jessica, Julia B., Julia G., Julia S., Patrick G., Patrick M., Peter, Petra, Rafael L., Rafael W., Ralf, Regine, Reinhold, Sabrina, Sandra, Sebastian, Thorsten, Tina, Tugce, Ulrike G., Ulrike K., Verena, Yasmin, Yvonne.

Ein besonderer Dank geht hierbei an Anke Schnorpfeil, Katharina Peters und Marina Meiers für die äußerst lustige Zeit im Herbst 2011 und den gemeinsamen Kampf gegen die Treppen des Betzenbergs.

Ich danke Thomas und Christine Wobedo und Lukas Kowol für den etwas anderen Blick in diese Arbeit.

Ein unbeschreiblicher Dank geht an meine Eltern und meine Familie für ihre unermüdliche Unterstützung und den Rückhalt in den letzten Jahren, an guten und weniger schönen Tagen.

Lebenslauf

Hochschulbildung

Feb 2009 bis Feb 2013	TU Kaiserslautern Promotion in Biologie am Lehrstuhl für Mikrobiologie
Apr 2003 bis Dez 2008	TU Kaiserslautern Studium der Biologie, (Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Phytopathologie, Biochemie) Thema der Diplomarbeit: „Identifizierung kleiner nicht-kodierender RNAs, deren Expression von dem Zwei-Komponentensystem CiaRH abhängt“
Okt 2002 bis März 2003	TU Kaiserslautern Studium der Biophysik

Zivildienst

2001 bis 2002	Marienkrankenhaus in St. Wendel
---------------	---------------------------------

Schulbildung

1998 bis 2001	Allgemeine Hochschulreife, Cusanus Gymnasium St. Wendel
1992 bis 1998	Mittlere Reife, Kreisrealschule St. Wendel
1988 bis 1992	Grundschule Furschweiler

Berufliche Tätigkeiten

Feb 2009 bis Mai 2012	TU Kaiserslautern wissenschaftlicher Mitarbeiter, Lehrstuhl für Mikrobiologie
-----------------------	--

