

**Die kleinen nicht kodierenden csRNAs im
CiaR-Regulon von *Streptococcus pneumoniae*:
Ihre Rolle in der β -Laktamresistenz und Kompetenz**

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

von

Dipl.-Biol. Anke Laux

Datum der wissenschaftlichen Aussprache
24.01.14

Vorsitzender der Promotionskommission: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn
1. Berichterstatter: Herr PD. Dr. Reinhold Brückner
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. John A. Cullum

Kaiserslautern, 2014

D386

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Betreuung von PD Dr. Reinhold Brückner durchgeführt.

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

Kaiserslautern,_____

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Zusammenfassung	9
2 Einleitung	12
2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
2.2 Die natürliche Kompetenz von <i>S. pneumoniae</i>	14
2.3 Zwei-Komponenten Systeme	16
2.4 Das Zwei-Komponenten System CiaRH und sein Einfluss auf die Resistenz, Kompetenz und Virulenz in <i>S. pneumoniae</i>	19
2.5 Kleine regulatorische RNAs in Bakterien	23
2.6 Die csRNAs in <i>S. pneumoniae</i>	29
2.7 Die Serinprotease HtrA	32
2.8 β -Laktamresistenz in <i>S. pneumoniae</i>	34
2.9 Zielsetzung dieser Arbeit	36
3 Material und Methoden	38
3.1 Material.....	38
3.1.1 Bakterienstämme	38
3.1.2 Plasmide	47
3.1.3. Oligonukleotide	49
3.1.4. Nährmedien	51
3.2 Methoden	55
3.2.1 Kultivierung und Stammkonservierung	55
3.2.2 Transformation von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	56
3.2.3 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	57
3.2.4 Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>S. pneumoniae</i>	58
3.2.5 Isolierung von Gesamt RNA aus <i>S. pneumoniae</i>	59
3.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	62
3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	63
3.2.8 Restriktion von DNA mittels Endonukleasen	65
3.2.9 Reaktion mit T4-DNA-Polymerase.....	65
3.2.10 Phosphorylierung von Oligonukleotiden und PCR-Produkten.....	65
3.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten	66
3.2.12 Agarose-Gelelektrophorese.....	66
3.2.13 Sequenzierung von DNA	67
3.2.14 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	67
3.2.15 Bestimmung der β -Lactam Suszeptibilität von <i>S. pneumoniae</i>	75

3.2.16 Analyse von Expressionsignalen in <i>S. pneumoniae</i>	75
3.2.17 Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität	77
3.2.18 Microarray-gestützte Transkriptomanalyse.....	80
3.2.19 Konstruktion des Translation-Probe Plasmid pTP4	85
3.2.20 Konstruktion der mutierten <i>comC</i> -Translationsfusionen.....	86
3.2.21 Konstruktion der Stämme mit verändertem <i>comC</i>	88
3.2.22 Konstruktion der Stämme mit ektopische Expression der csRNAs.....	89
3.2.23 Konstruktion des Integrationsvektor pSW2	90
3.2.24 Inaktivierung des Proteasegens <i>htrA</i>	92
3.2.25 Deletion einzelner csRNAs mittels Cheshire-Kassette.....	92
3.2.26 Integration eines Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems	94
4 Ergebnisse	96
4.1 Der Einfluss einzelner csRNAs auf den CiaRH System vermittelten Resistenzphänotyp	96
4.1.1 Auswirkungen einzelner csRNAs auf die β -Laktam Suszeptibilität.....	97
4.1.2 Effekt der <i>htrA</i> Deletion auf den csRNA vermittelten Resistenzanstieg	100
4.2 Der Einfluss einzelner csRNAs auf die Entwicklung der natürlichen Kompetenz in	
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH202</i>	102
4.2.1 Auswirkungen einzelner csRNAs auf die natürliche Kompetenz.....	104
4.2.2 Effekt der <i>htrA</i> Deletion auf den csRNA vermittelten Kompetenzverlauf	107
4.2.3 Kontrolle der verwendeten <i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH202</i> Derivate	111
4.3 Das <i>ciaH202</i> -Allel unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems .	115
4.3.1 Untersuchung der Aktivität von pTEX <i>ciaH202</i>	116
4.3.2 Auswirkungen des Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems auf die β -Laktam	
Suszeptibilität	118
4.3.3 Auswirkungen des Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems auf die Entwicklung	
der natürlichen Kompetenz.....	121
4.4 Der Einfluss der csRNAs und HtrA auf die Entwicklung der natürlichen Kompetenz in	
<i>S. pneumoniae</i> R6	127
4.4.1 Untersuchung der P _{comX} Expression in brain heart infusion und todd hewitt broth	127
4.4.2 Untersuchung der P _{comC} und P _{cib} Expression in brain heart infusion	135
4.5 Die Regulation von <i>comC</i> – ein möglicher Grund für den CiaRH vermittelten	
Kompetenzblock	139
4.5.1 Regulation der <i>comC</i> mRNA durch die csRNAs in <i>S. pneumoniae</i> R6 und	
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH202</i>	139
4.5.2 Komplementarität der csRNAs mit der <i>comC</i> mRNA	143
4.5.3 Untersuchung der <i>comC8</i> Mutation im hyperaktiven CiaRH-Hintergrund	149
4.5.4 Untersuchung der <i>comC8</i> Mutation im CiaRH Wildtyp Hintergrund	150

4.5.5 Veränderungen in csRNA1 und csRNA4 und deren Auswirkungen auf die Entwicklung der natürlichen Kompetenz	153
4.6 Identifikation des β -Laktamresistenz spezifischen Zielgenes mittels globaler Transkriptomanalyse	164
4.6.1 Globale Transkriptomanalyse von <i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH202</i>	164
4.6.2 Globale Transkriptomanalyse von <i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaH202</i> Δ <i>ccnA-E pCcnD</i>	175
5 Diskussion	179
5.1 Die Rolle der csRNAs und HtrA in der β -Laktamresistenz	179
5.1.1 Additive oder redundante Wirkung der csRNAs?	179
5.1.2 Identifizierung des β -Laktam spezifischen Zielgens der csRNAs	182
5.2 Die Rolle der csRNAs und HtrA während der Kompetenzentwicklung	182
5.2.1 Additive oder redundante Wirkung der csRNAs?	192
5.2.2 Zeitliche Koordination der Kompetenzentwicklung	195
5.2.3 <i>ComC</i> - das Kompetenz spezifische Zielgen der csRNAs	197
5.2.4 Komplementarität der csRNAs mit der <i>comC</i> mRNA	198
5.2.5 Durch die csRNAs vermittelte Kompetenzregulation – ein Überblick.....	203
5.3 Überblick über die CiaRH vermittelte Regulation in <i>S. pneumoniae</i>	208
5.4 Ausblick	211
6 Literaturverzeichnis.....	213
7 Anhang.....	230

Publikationen

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAA	N,N-Methylenbisacrylamid
BHI	Brain-Heart-Infusion
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
CSP	competence stimulating peptide
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
His	Histidin
HK	Histidinkinase
Kb	Kilobasen
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Lauria-Bertani
μ	mikro
m	milli
M	Molar, Mol pro Liter
mA	milli-Ampère
Mw	Molekulargewicht
min	Minuten
n	nano
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
OD ₂₈₀	Optische Dichte bei 280 nm
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffer saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pPP	Pneumo Promotor Probe
pmol	Picomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Sensordomäne

SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Tab.	Tabelle
TCS	Zwei-Komponenten System (two component-system)
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
THB	Todd-Hewitt Broth
THY	Todd Hewitt Broth + Hefeextrakt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Tryptic Soy Broth
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Schon bei seiner Entdeckung konnte eine Verbindung des Zwei-Komponenten Systems CiaRH mit der natürlichen Kompetenzentwicklung und der β -Laktamresistenz in *S. pneumoniae* beobachtet werden. Mutationen in der Histidinkinase CiaH bewirken eine sogenannte Hyperaktivierung dieses Systems, welche zu einem vollständigen Verlust der Kompetenz und einem Anstieg der β -Laktamresistenz führen. Der über das CiaRH System vermittelte Kompetenzphänotyp ist dabei abhängig von der Serinprotease HtrA und den csRNAs. Die Serinprotease HtrA reduziert hierbei, durch Proteolyse, die Menge des Kompetenz spezifische Peptid CSP.

In dieser Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass die csRNAs ihre negative Wirkung auf die Kompetenz ausüben, indem sie *comC* post-transkriptionell reprimieren. Wahrscheinlich wird hierbei die Initiation der Translation inhibiert, wobei die Stabilität der mRNA zusätzlich verringert werden könnte. *ComC* kodiert für das CSP Vorläuferpeptid. Daher üben die csRNAs noch vor der proteolytischen Wirkung von HtrA einen negativen Effekt auf die CSP Produktion aus. Anhand von *comC*-Translationsfusionen in *S. pneumoniae* Stämmen mit und ohne csRNAs, sowie in dem Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel konnte eindeutig gezeigt werden, dass die csRNAs negativ auf die *comC*-Translation wirken.

Mittels weiterer *comC*-Translationsfusionen, in Stämmen mit einzelnen csRNAs, ließ sich eine additive Wirkung der einzelnen csRNAs auf die *comC*-Translation nachweisen. Das bedeutet, dass eine csRNA alleine nicht in der Lage ist die Kompetenz zu reprimieren. Eine Kombination aus csRNA1, csRNA2 und csRNA3 allerdings ist sogar ohne die Anwesenheit von HtrA in der Lage, die Kompetenzentwicklung vollständig zu unterdrücken.

Der Effekt der csRNAs auf die *comC*-Translation hat Auswirkungen auf die sich entwickelnde Kompetenz, was anhand von β -Galaktosidasemessungen des frühen Kompetenzpromotors P_{comX} gezeigt wurde. Hier konnte allerdings ein stark positiver Effekt der csRNA4 und csRNA5 auf diesen Promotor beobachtet werden. Weitere Versuche zeigten, dass dieser Effekt auch auf den frühen Kompetenzpromotor P_{comC} , aber nicht auf den späten Kompetenzpromotor P_{cib} zu beobachten ist.

Hierbei scheint es sich um einen Regulationsmechanismus der csRNAs zu handeln, welcher die CSP-Produktion erhöht, ohne die Expression der Gene, die für die DNA Aufnahme und den Einbau verantwortlich sind, zu verändern. Der einerseits negative Effekt aller csRNAs auf die *comC*-Translation und andererseits positive Effekt der csRNA4 und csRNA5 sprechen dafür, dass die csRNAs an der Feinabstimmung der Kompetenzentwicklung beteiligt sind. Tatsächlich lassen sich Unterschiede im Zeitverlauf der Stämme mit einzelnen csRNAs erkennen. Vor allem kann ein Kompetenzpeak, wie im Wildtyp beobachtet, nicht mehr im csRNA-Deletionsstamm nachgewiesen werden.

Die csRNAs scheinen die Kompetenzentwicklung bis zu einem gewissen Grad zu reprimieren. Ist aber der Schwellenwert überschritten, wirkt ein Teil positiv und trägt somit dazu bei, dass die Kompetenzentwicklung ohne Einschränkungen abläuft.

Des Weiteren konnten, durch gezielte Mutationen in der *comC* mRNA, Bereiche in dieser identifiziert werden, welche für die Bindung der csRNAs an die mRNA essentiell sind. Hierzu gehört zum einen der Bereich zwischen der Shine-Dalgarno Sequenz und dem Startkodon sowie der Bereich direkt nach dem Startkodon AUG. Zum anderen gibt es Hinweise darauf, dass Mutationen, welche die Stabilität der mRNA beeinflussen könnten, die Regulation durch die csRNAs aufheben.

Anhand einer komplementären Veränderung der csRNA4 konnte der negative Effekt dieser csRNA auf die Translation der veränderten *comC* mRNA wieder hergestellt werden.

Die hier erbrachten Ergebnisse konnten einen weiteren kompetenzregulierenden Faktor identifizieren. Außerdem ergaben sich einige Hinweise, die dazu beitragen können, in weiteren Studien die komplexe Regulation der Kompetenzentwicklung besser zu verstehen.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem, ebenfalls schon bei der Entdeckung des CiaRH Systems beschriebenen, Anstieg der β -Laktamresistenz. Für diesen, durch ein hyperaktives CiaRH System vermittelten Anstieg konnte, wie schon bei der Kompetenz, ein wesentlicher Effekt der csRNAs nachgewiesen werden. Eine Deletion aller csRNAs in einem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System bewirkt einen Zusammenbruch der Resistenz auf Wildtyp Niveau. Im Gegensatz zur Kompetenz konnte hier aber kein deutlicher Effekt der Serinprotease HtrA beobachtet werden.

Wie schon bei der Kompetenz lag das Augenmerk dieser Arbeit auf dem Effekt der einzelnen csRNAs auf den Anstieg der β -Laktamresistenz. Hier konnte eine größtenteils additive Wirkung der csRNAs nachgewiesen werden. Allerdings wurden Stämme isoliert, in welchen die β -Laktamresistenz um das 10-fache im Vergleich zu dem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System anstieg. Hierbei handelt es sich um Stämme, die csRNA4 oder csRNA5 enthalten. Da eine starke Instabilität in diesen Stämmen zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass es hier zu Zusatzmutationen kam, welche den Resistenzanstieg bewirken. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass der beobachtete Resistenzanstieg nur im Zusammenhang mit csRNA4 vermittelt wird. Falls es hier zu Zusatzmutationen im Genom kam, wäre deren vermittelter Resistenzanstieg von csRNA4 abhängig.

Da im Falle der β -Laktamresistenz die computerbasierte Zielgensuche keinen geeigneten Kandidaten erbrachte und keines der bekannten csRNA regulierten Gene die Resistenz beeinflusst, wurde hier eine globale Transkriptomanalyse zur Zielgensuche durchgeführt.

Anhand dieser globalen Transkriptomanalyse konnten zwei neue potenzielle CiaR regulierte Gene, *pavB* und *spr0091*, identifiziert werden.

Des Weiteren konnten zwei Gene, *spr0264* und *oxiT*, identifiziert werden, deren Translation negativ durch die csRNAs reguliert wird. Hier konnte gezeigt werden, dass der UTP Metabolismus der Zelle betroffen ist. Hierrüber könnte die Menge an UDP verändert werden, welches zur Aktivierung von

Vorläuferstufen der Zellwandbiosynthese benötigt wird. Ob diese beiden Transporter an dem Anstieg der Resistenz beteiligt sind, wurde bisher nicht untersucht.

Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten globalen Transkriptomanalysen stellen allerdings eine gute Basis zur weiteren Identifikation von möglichen potenziellen csRNA Zielgenen dar. Hierüber könnte eventuell auch das β -Laktam spezifische Zielgen identifiziert werden. Das der deutliche Effekt der csRNAs, sekundär auf ein schon bekanntes β -Laktamresistenzgen zurückzuführen ist, ist dabei durchaus denkbar.

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Regulationen der csRNAs bezüglich der Kompetenz- und β -Laktamresistenz konnten einen großen Beitrag zum besseren Verständnis dieser Regulationsmechanismen in *S. pneumoniae* leisten. Des Weiteren bilden die hier ermittelten Ergebnisse eine gute Basis für weitere Experimente.

2 Einleitung

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Bakterium handelt es sich um *Streptococcus pneumoniae*, ein weltweit verbreiteter Krankheitserreger, der Lungen-, Mittelohr- und Hirnhautentzündung sowie Endokarditis verursachen kann (Mitchell, 2003).

Erstmals wurde *S. pneumoniae* 1981 von Louis Pasteur und George Miller Sternberg unabhängig voneinander entdeckt und beschrieben (Pasteur, 1981; Sternberg, 1981).

Morphologisch bildet *S. pneumoniae* kleine Kokken ($\varnothing \sim 0,5 - 1,5 \mu\text{m}$), die in kurzen Ketten oder als Diplokokken angeordnet sind, woher auch der frühere Name *Diplococcus pneumoniae* herrührt.

Systematisch gehört *S. pneumoniae* zur Gattung Streptococcus, der Familie Streptococcaceae und der Ordnung Lactobacillales, den Milchsäurebakterien. Bei der Gattung Streptococcus handelt es sich um aerotolerante, anaerobe, gram-positive Milchsäurebakterien mit niedrigem GC-Gehalt (~40%).

Sie können in Gegenwart von Sauerstoff leben, ihn jedoch nicht zum Wachstum nutzen, da ihnen einige Enzyme der Atmungskette fehlen.

Ihre Energie gewinnen sie durch Substratkettenphosphorylierung, wobei Hexosen über homofermentative Milchsäuregärung abgebaut werden. Daher haben Streptokokken einen komplexen Bedarf an Nährstoffen und stellen einen hohen Anspruch an das Medium, welches neben einer Kohlenstoffquelle auch Aminosäuren, Peptide, Purine, Pyrimidine und Vitamine enthalten muss (Hardie & Whiley, 1995).

Der Nasen- und Rachenraum von Menschen ist das natürliche Habitat der Pneumokokken, den sie kommensal besiedeln. Bei Menschen mit schwachem oder noch nicht voll entwickeltem Immunsystem kann *S. pneumoniae* als opportunistisches Pathogen Krankheitssymptome verursachen (Mitchell, 2003). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Pneumokokken auch andere wildlebende Säugetiere besiedeln können (Chi *et al.*, 2007; Denapaité & Hakenbeck, 2011; van der Linden *et al.*, 2009).

Um *S. pneumoniae* von anderen Streptokokken zu unterscheiden, stehen mehrere Methoden zur Verfügung, welche auf speziellen physiologischen und morphologischen Eigenschaften basieren. Das Hämolyseverhalten stellt eine klassische Möglichkeit zur Unterscheidung der einzelnen Arten von Streptokokken dar (Brown, 1919). Heutzutage werden vor allem molekularbiologische Methoden wie DNA-DNA-Hybridisierung, 16S rRNA-Sequenzanalysen oder MLSA (multilocus sequence analysis) zur Klassifizierung eingesetzt (Zbinden *et al.*, 2012; Kawamura *et al.*, 1995; Kilian *et al.*, 2008; Jensen & Kilian, 2012).

S. pneumoniae gehört zu den α -hämolytischen Bakterien, was bedeutet, dass sie auf Blut-Agar das enthaltene Hämoglobin der Erythrozyten zu Methämoglobin umwandeln. Da aber die Membran der Erythrozyten intakt bleibt, lysieren diese nicht vollständig, wodurch sich grün-bräunliche Höfe um die Kolonien bilden, welche auf Blut-Agar leicht zu identifizieren sind. Die α -Hämolyse bei

S. pneumoniae unterscheidet sich zum einen von Streptokokken, die die Fähigkeit zur echten Hämolyse besitzen und 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.

Des Weiteren lysiert *S. pneumoniae* in Gegenwart von Gallensalzen (Neufeld et al., 1928) und zeigt eine Sensitivität gegen Optochin (Bowers & Jeffries, 1955). Das Optochin, ein Makrolid, interagiert mit der membranlokalisierten F1F0-ATPase, wodurch das Wachstum von *S. pneumoniae* gehemmt wird.

Bis heute zählt *S. pneumoniae* zu den bedeutendsten Krankheitserregern und wird jährlich für über eine Million Todesfälle verantwortlich gemacht (Ramos-Montanez et al., 2010).

Den wichtigsten Virulenzfaktor von Pneumokokken stellt die Polysaccharidkapsel dar, welche wie eine Schutzhülle vor den Immunreaktionen des Wirts schützt und zudem die Anheftung an die Wirtszelle ermöglicht. Die Polysaccharidkapsel kann ebenfalls als Unterscheidungsmerkmal von Pneumokokken dienen, da diese eine hohe Variabilität aufweist. Hierüber können die Pneumokokken in Serotypen und Serogruppen (Bentley et al., 2006) eingeteilt werden, wobei bis jetzt 92 Serotypen beschrieben sind (Cornick & Bentley, 2012).

Der in dieser Arbeit für experimentelle Untersuchungen verwendete Stamm *S. pneumoniae* R6 ist ein unkapselter, avirulenter Nachfahre des von Griffith verwendeten *S. pneumoniae* D39.

Griffith verwendete 1928 diesen Stamm für seine Versuche zur Transformation von Kapselphänotypen, wodurch *S. pneumoniae* eine große Bedeutung in der Molekularbiologie erlangte (Griffith, 1928). Griffith konnte zeigen, dass wenn er pathogene bekapselte Pneumokokken, die vorher abgetötet wurden, gemeinsam mit lebenden apathogenen Pneumokokken ohne Kapsel in Mäuse injizierte, diese überraschenderweise starben. Aus ihrem Blut konnte Griffith lebende bekapselte Pneumokokken isolieren. Hierdurch konnte er zeigen, dass die Information zur Kapselbildung und damit die Pathogenität an die lebenden Pneumokokken weitergegeben (transformiert) werden. Diese Versuche griffen Oswald Avery, Colin Macleod und Maclyn McCarty auf und konnten im Jahre 1944 die Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger der genetischen Information identifizieren (Avery et al., 1995). Die Möglichkeit von Bakterien, DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen wird als natürliche Kompetenz bezeichnet.

2.2 Die natürliche Kompetenz von *S. pneumoniae*

Seit der Entdeckung der Transformierbarkeit von *S. pneumoniae*, also der Fähigkeit DNA aus der Umgebung aufzunehmen und diese ins eigene Genom einzubauen, wurde auf diesem Gebiet viel Forschung betrieben um den als Kompetenz bezeichneten Zustand und dessen Regulation besser zu verstehen. *S. pneumoniae* entwickelt, medienabhängig, natürliche Kompetenz während der exponentiellen Wachstumsphase. Die Kompetenz-Phase endet mit Beginn des stationären Wachstums. Die Transformierbarkeit ist dabei nicht nur abhängig von der Wachstumsphase, sondern auch von extra- und intrazellulären Bedingungen, wie z.B. der Temperatur, dem pH-Wert und der Sauerstoffkonzentration (Tomasz & Hotchkiss, 1964; Chen & Morrison, 1987; Echenique *et al.*, 2000). Die Induktion der Kompetenz in *S. pneumoniae* wird durch ein autokatalytisches (Tomasz & Mosser, 1966) Quorum Sensing System gesteuert (Abbildung 2.1). Das Vorläufer-Peptidpheromon CSP, welches durch das Gen *comC* kodiert ist (Håvarstein *et al.*, 1995), wird über den ABC-Transporter ComAB prozessiert und exportiert (Hui *et al.*, 1995). Hierbei wird das N-terminale Leader-Peptid entfernt und das reife CSP in die Umgebung abgegeben. Das CSP interagiert mit dem Zwei-Komponenten System ComDE und nach Erreichen eines Schwellenwertes wird die Kompetenzentwicklung induziert (Håvarstein *et al.*, 1995; Pestova *et al.*, 1996). Die Histidinkinase ComD wird durch das Binden von CSP stimuliert und autophosphoryliert durch ATP. Der Phosphatrest wird von ComD an den Response Regulator ComE übertragen, wodurch dieser aktiviert wird und die Expression verschiedener Gene, darunter auch *comCDE* und *comAB*, reguliert (Ween *et al.*, 1999).

Die Gene des ComE-Regulons werden aufgrund der direkten Antwort nach CSP Induktion als „frühe Kompetenzgene“ bezeichnet (Peterson *et al.*, 2004). Innerhalb dieses Regulons befinden sich unter anderem die Gene *comX1* und *comX2*, sowie *comW* und *comM* (Lee & Morrison, 1999). Die Gene *comX1* und *comX2* kodieren für einen alternativen Sigmafaktor, ComX, der die Expression von weiteren Genen reguliert, die für die DNA-Aufnahme, Prozessierung und Integration essentiell sind (Peterson *et al.*, 2004; Claverys *et al.*, 2009). Hierbei wird ComX durch ComW aktiviert und stabilisiert (Sung & Morrison, 2005). Durch ComX wird somit das CSP induzierte Quorum Sensing System mit der Kompetenzentwicklung verknüpft (Luo *et al.*, 2003). Die Gene, deren Expression von ComX abhängig ist, werden im Gegensatz zu den Genen die direkt auf CSP Zugabe reagieren, als „späte Kompetenzgene“ bezeichnet (Peterson *et al.*, 2004). Diese Gene besitzen ein konservierte -10 Sequenzmotiv, welche als com-box oder cin-box bezeichnet wird (TACGAATA). Die Sequenz unterscheidet sich von der -10-Region der $\sigma 70$ -Promotoren und stellt eine typische Erkennungssequenz eines alternativen Sigmafaktors dar.

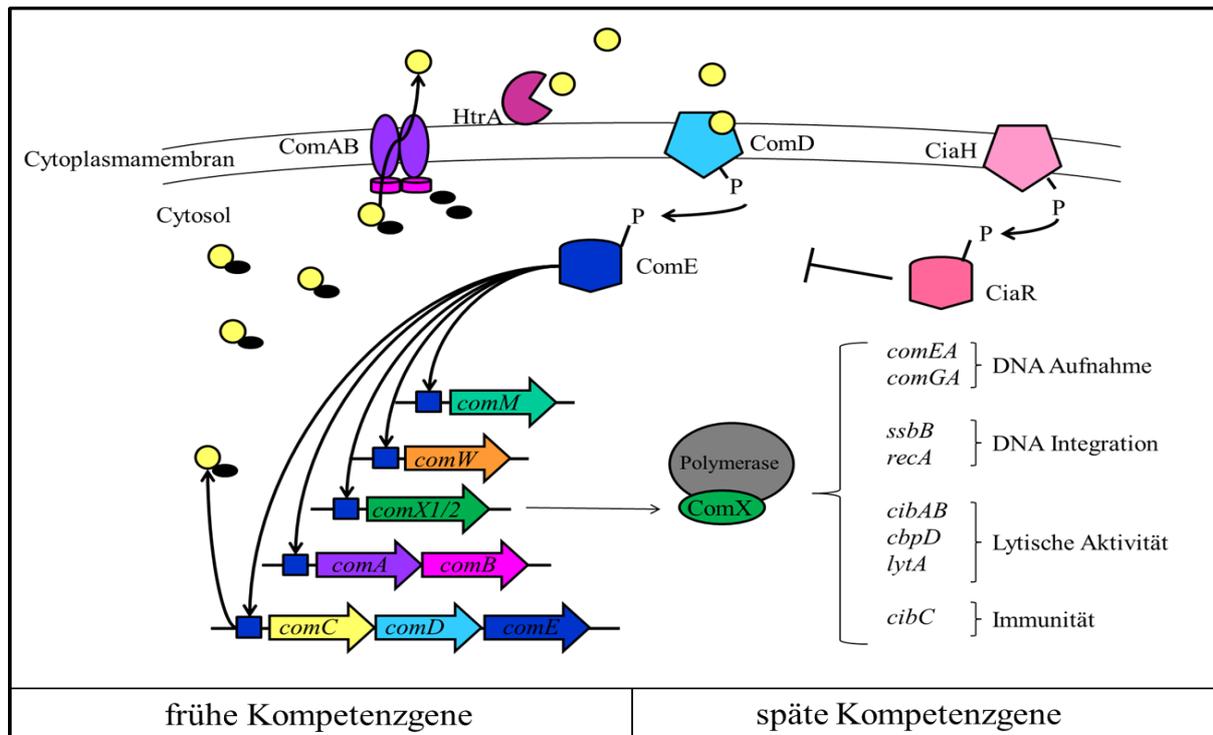


Abbildung 2.1: Kompetenz Regulation in *S. pneumoniae*.

Entwicklung der natürlichen Kompetenz in *S. pneumoniae*. Dargestellt ist das Peptid-Pheromon CSP, dessen Vorläufer (gelb/schwarz) durch ComAB prozessiert und in die Umgebung abgegeben wird. CSP bindet an die Histidinkinase ComD, welche dadurch autophosphoryliert wird. Dieses Phosphat wird auf den Response Regulator ComE übertragen, welcher durch eine Konformationsänderung als Transkriptionsfaktor die Expression der „frühen“ Kompetenzgene steuert. Unter diesen Genen befindet sich auch *comX*, welches für einen alternativen Sigmafaktor kodiert, der die Expression der „späten“ Kompetenzgene kontrolliert. Das Zwei-Komponenten System CiaRH und die Serinprotease HtrA haben einen reprimierenden Effekt auf die Kompetenzinduktion.

Weitere späte Kompetenzgene kodieren für Proteine mit lytischer Aktivität oder Immunitätsproteine. Die späten Kompetenzgene *lytA*, *cbpD* und *cibAB*, welche für das Hauptautolysin von *S. pneumoniae*, eine Mureinhydrolase und ein Zwei-Peptid Bacteriocin kodieren, wurden als bedeutsam für die Allolyse identifiziert (Guiral *et al.*, 2005; Kausmally *et al.*, 2005; Hävarstein *et al.*, 2006). Bei der Allolyse, auch „Fraticide“ oder „Brudermord“ genannt, handelt es sich um die Lyse nicht kompetenter Zellen durch kompetente Zellen innerhalb einer Kultur (Steinmoen *et al.*, 2003). Die kompetenten Zellen werden hierbei selbst durch die Immunitätsproteine ComM und CibC geschützt. ComM wird durch ein frühes Kompetenzgen, CibC durch ein spätes Kompetenzgen exprimiert, welches in einem Operon mit *cibAB* lokalisiert ist. Auch gibt es noch viele Gene mit unbekannter Funktion. Anhand zweier Transkriptomstudien konnten insgesamt 124 (Peterson *et al.*, 2004) bzw. 105 Gene (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004) identifiziert werden, die durch CSP Zugabe induziert werden. Das Kompetenzregulon umfasst einen großen Teil des Genoms und wird durch unterschiedliche Bedingungen reguliert, daher scheint es sich hierbei um einen zentralen physiologischen Zustand zu handeln. Innerhalb der 91 Gene, die in beiden Studien vorkamen, gehörten 17 zu den frühen und 60 zu den späten Kompetenzgenen (Claverys *et al.*, 2006). Die meisten dieser Gene sind für eine funktionelle Transformierbarkeit verzichtbar, haben also offenbar andere physiologische Funktionen.

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). Eines der beschriebenen Zwei-Komponenten Systeme ist das CiaRH System, welches negativ auf die Kompetenz wirkt (Müller *et al.*, 2011) (Abbildung 2.1). Eine stärkere Aktivierung von CiaRH führt zum Verlust der natürlichen Transformierbarkeit (Guenzi *et al.*, 1994), wohingegen die Inaktivierung von CiaRH zu Kompetenzentwicklung unter verschiedensten kompetenzinhibierenden Bedingungen führt. Hierzu zählen z.B. bestimmte Kompetenz inhibierende Medien, wie Todd Hewitt Broth (THB) oder Brain Heart Infusion (BHI), ein niedriger pH-Wert, verringerte Sauerstoffkonzentrationen oder Maleat anstatt Phosphat als Pufferkomponente (Giammarinaro *et al.*, 1999; Echenique *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003; Tsui *et al.*, 2010). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Serinprotease HtrA, welche durch das CiaRH System reguliert wird, die Kompetenz reprimiert, indem sie das Kompetenz stimulierende Peptidpheromon CSP schneidet (Cassone *et al.*, 2012).

2.3 Zwei-Komponenten Systeme

Bakterien verwenden sogenannte Zwei-Komponenten Systeme um schnell auf Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren zu können. Für das Überleben ist es essentiell, den Stoffwechsel, die Zellintegrität oder diverse Abwehrmechanismen auf chemische oder physikalische Veränderungen aus der Umgebung einzustellen. Hierbei kann es sich um Veränderungen in Temperatur, pH-Wert, Verfügbarkeit von Nährstoffen oder der Anwesenheit von Schadstoffen, wie Antibiotika handeln (Laub & Goulian, 2007; Mascher, 2006). Die Möglichkeit, die Genexpression auf Grund von externen Stimuli zu ändern, ist über Zwei-Komponenten Systeme gegeben (Cheung & Hendrickson, 2010). Des Weiteren sind die Kommunikation mit Artgenossen und das Erkennen von Organismen anderer Gattungen über Quorum-Sensing-Signale durch Zwei-Komponenten Systeme ermöglicht. Auch die Regulation der Virulenz eines pathogenen Organismus ist über Zwei-Komponenten Systeme gegeben (Gao & Stock, 2009). Die Anzahl, der in einem Bakterium vorkommenden Zwei-Komponenten-Systeme hängt davon ab, inwieweit das Bakterium auf Umwelteinflüsse reagieren muss. Das intrazellulär lebende *Mycoplasma genitalium* muss auf keine Umwelteinflüsse reagieren und besitzt daher kein Zwei-Komponenten-System (Fraser *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu muss sich das bodenbewohnende Bakterium *Myxococcus xanthus* auf ständig ändernde Bedingungen einstellen und besitzt dafür 272 Zwei-Komponenten-Systeme (Shi *et al.*, 2008). *S. pneumoniae*, dessen natürliches Habitat der menschliche Nasen- und Rachenraum darstellt, besitzt 13 Zwei-Komponenten Systeme und einen einzelnen Response Regulator (Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000). Zwei-Komponenten-Systeme konnten bis jetzt in Eubakterien, in denen sie als erstes beschrieben wurden (Nixon *et al.*, 1986), in Archaeobakterien und manchen Eukaryoten, aber nicht in Tieren nachgewiesen

werden. Daher bieten sie sich als potentielle Ziele für neue Antibiotika an (West & Stock, 2001), wodurch das Interesse an der Funktionsweise dieser Systeme stark stieg. Typische Zwei-Komponenten-Systeme bestehen aus einer, in der Membran verankerten Histidinkinase, die einen bestimmten Reiz wahrnimmt, und einem, im Cytoplasma lokalisierten Response Regulator, der die physiologische Antwort erzeugt (Abbildung 2.2). Die Histidinkinase besitzt meist eine extrazelluläre, variable N-terminale Sensor Domäne (SD), welche als Sensor fungiert (Cheung & Hendrickson, 2010) und eine C-terminale Autokinase Domäne (KD). Die Detektion eines chemischen oder physikalischen Reizes durch die Sensor Domäne führt zur Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes in der intrazellulären C-terminalen Domäne. Im Gegensatz zur N-terminalen Sensor Domäne, welche eine hohe Variabilität innerhalb der verschiedenen Zwei-Komponenten Systeme aufweist, ist die C-terminale Autokinase Domäne gut konserviert. Sie ist cytoplasmatisch lokalisiert und wird in die DHp-Domäne (dimerization und histidine phosphotransfer), in der der konservierte Histidinrest liegt, und die katalytisch aktive CA-Domäne (catalytic and ATP-binding), welche die ATP-abhängige Phosphorylierung katalysiert, unterteilt (Huynh *et al.*, 2013). In den meisten Fällen liegen Histidinkinasen als Homodimer vor, wobei die Phosphorylierungsreaktion sowohl *cis* als auch *trans* ablaufen kann, das bedeutet DHp- und CA-Domäne können zum selben oder anderen Monomer der Histidinkinasen gehören (Yang Y. & Inouye, 1991). Der Struktur der DHp-Domäne wird dabei eine wichtige aber nicht alleinige Rolle der Phosphorylierungsart zugesprochen (Casino *et al.*, 2010). Der energiereich an das Histidin gebundene Phosphatrest wird auf einen konservierten Aspartatrest in der N-terminalen Receiver-Domäne (RD) des Response Regulators übertragen (Kofoid & Parkinson, 1988). Durch diese Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung der C-terminalen Effektor Domäne (ED) des Response Regulators, die in dieser aktiven Form ihre physiologische Funktion ausüben kann.

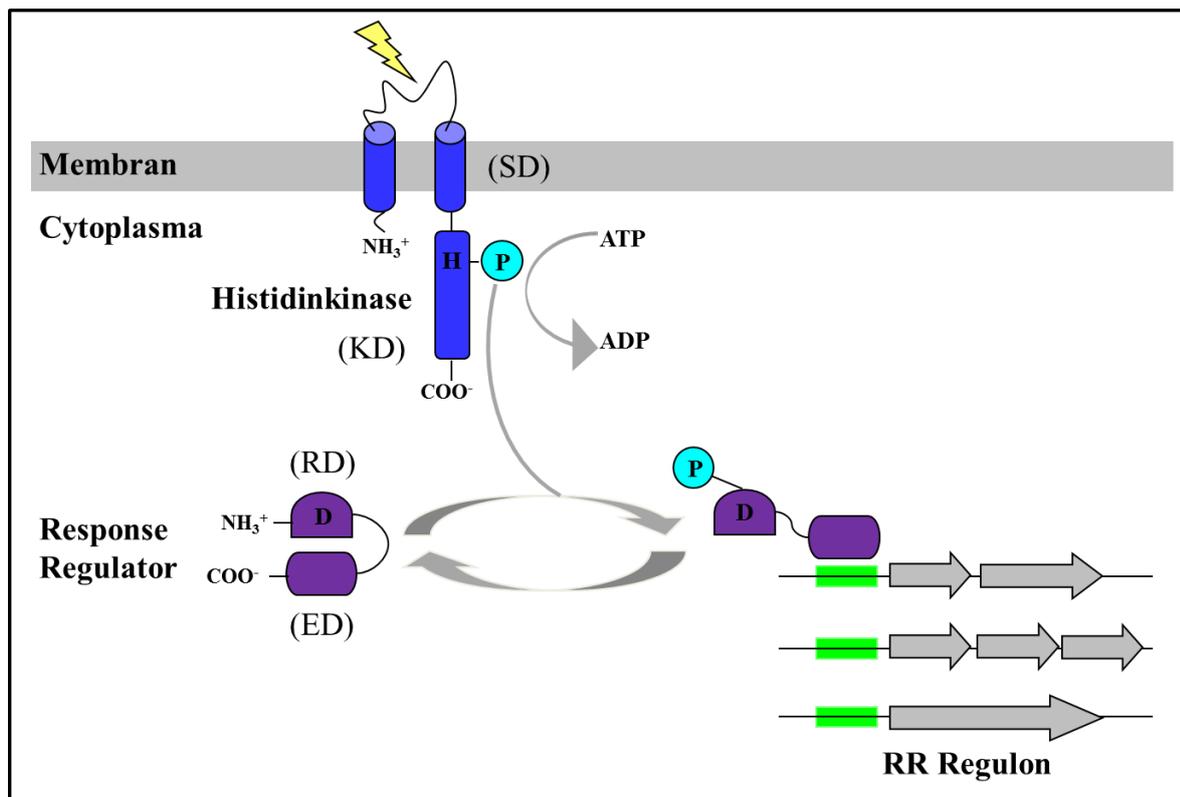


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion eines klassischen Zwei-Komponenten Systems.

Die Sensor Domäne (SD) der membranständigen Histidinkinase nimmt einen Reiz (gelb) wahr, worauf es intrazellulär zu einer ATP-abhängigen Phosphorylierung eines konservierten Histidinrests in der cytoplasmatischen Autokinase Domäne (KD) kommt. Das energiereich gebundene Phosphat (P) wird auf ein konserviertes Aspartat (D) der Receiver Domäne (RD) des Response Regulators übertragen, dessen Effektor Domäne (ED) daraufhin in ihre aktive Konformation übergeht. Dadurch wird die Transkription bestimmter Gene gesteuert, indem die Effektor Domäne an eine bestimmte Erkennungssequenz (grün) im Promotorbereich bindet.

Die Receiver Domänen der meisten Response Regulatoren sind konserviert, wohingegen die Effektor Domänen starke Diversitäten aufweisen (Galperin, 2010). Die meisten Response Regulatoren von Bakterien interagieren mit DNA und wirken als Transkriptionsfaktor auf bestimmte Gene, welche die zelluläre Antwort auf den jeweiligen Reiz vermitteln. Allerdings konnten auch Response Regulatoren identifiziert werden, die enzymatisch aktiv, Protein-Protein bindend oder RNA bindend sind. Auch Response Regulatoren ohne Effektor Domäne konnten identifiziert werden (Gao & Stock, 2009). Durch Dephosphorylierung des Response Regulators ändert dieser wieder seine Konformation in die inaktive Form, was zur Abschaltung des Systems führt. Diese Dephosphorylierung kann entweder durch eine Autophosphataseaktivität des Response Regulators selbst, durch Dephosphorylierung mittels einer bifunktionalen Histidinkinase oder durch andere Phosphatasen katalysiert werden (Stock *et al.*, 2000). Es kommt zur hydrolytischen Abspaltung der Phosphatgruppe in Anwesenheit von Metallionen wie z.B. Mg^{2+} (Lukat *et al.*, 1992; Needham *et al.*, 1993). Hierdurch wird ein effizientes Abschalten des Systems gewährleistet, was für die Funktionalität eines Zwei-Komponenten Systems, ein Signal differenziert wahr zu nehmen, essentiell ist. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung

des gesamten Signaltransduktions Systems kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Die Autophosphorylierung der Histidinkinase kann z.B. durch weitere Proteine beeinflusst werden, welche den Stimulus auf die Sensor Domäne übertragen (Mitrophanov & Groisman, 2008; Buelow & Raivio, 2010). Auch Proteine, die direkt mit der Histidinkinase oder dem Response Regulator interagieren, beeinflussen den Phosphorylierungsgrad. Hierbei ist es möglich, dass die Aktivität der Effektor Domäne direkt betroffen ist (Mitrophanov & Groisman, 2008; Jung *et al.*, 2012). Das Phosphorelaysystem stellt eine weitere Möglichkeit der Regulation dar. Hierbei verläuft die Signaltransduktion über weitere Phosphotransferreaktionen, durch zusätzliche Response Regulatoren oder Phosphotransferproteine, die wiederum selbst reguliert werden können (Laub & Goulian, 2007; Mitrophanov & Groisman, 2008). Auf diese Weise werden andere Signale und Regulationswege in ein Zwei-Komponenten System integriert. Auch muss die Detektion eines Signals nicht immer mit einer Erhöhung des Phosphorylierungsgrad des Response Regulators einhergehen. Es gibt Response Regulatoren, die schon ohne eine Phosphorylierung durch die Histidinkinase phosphoryliert vorliegen und deren Aktivität durch die Phosphatase Aktivität der Histidinkinase erniedrigt wird, wenn diese ein Signal wahrnimmt (Castelli *et al.*, 2000). Unabhängig von der Aktivität der Histidinkinase können energiereiche Metabolite, wie z.B. Acetylphosphat die Phosphorylierung des Response Regulators bewirken, wodurch der Stoffwechselstatus auch einen Einfluss auf das Zwei-Komponenten System nehmen kann (Wolfe, 2005; Wolfe, 2010).

2.4 Das Zwei-Komponenten System CiaRH und sein Einfluss auf die Resistenz, Kompetenz und Virulenz in *S. pneumoniae*

Das CiaRH System wurde als erstes Zwei-Komponenten System und als erste nicht PBP-Resistenzdeterminante im Zuge einer Charakterisierung von Labormutanten von *S. pneumoniae* R6 identifiziert (Guenzi *et al.*, 1994). Bei CiaRH handelt es sich um einen pleiotropen Regulator, der mit vielen Phänotypen in *S. pneumoniae* in Verbindung gebracht wird. Eine Aktivierung des CiaRH Systems führt zum einen zur Blockierung der natürlichen Kompetenz (siehe 2.2) (Guenzi *et al.*, 1994; Zähler *et al.*, 1996; Giammarinaro *et al.*, 1999; Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Peterson *et al.*, 2004; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Sebert *et al.*, 2005) und zum anderen zur Erhöhung der β -Lactamresistenz (Guenzi *et al.*, 1994; Zähler *et al.*, 2002), wodurch auch der Name geprägt ist Cia (ompetence induction and altered cefotaxim susceptibility).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein aktiviertes CiaRH System vor der Lyse durch Zellwand-Inhibitoren (Fosfomycin, D-Cycloserin, Bacitracin, Piperacillin, Vancomycin), Detergenzien (Desoxycholat, Triton) oder Säure schützt (Giammarinaro *et al.*, 1999; Mascher *et al.*, 2006; Pinas *et al.*, 2008; Moscoso *et al.*, 2010). Die Inaktivierung des CiaRH Systems führt dagegen zu einer verkürzten Stationärphase und einer verfrühten Autolyse (Mascher *et al.*, 2006). Ein weiterer Phänotyp der Inaktivierung ist die verminderte Fähigkeit den Nasopharynx und die Lunge zu

besiedeln (Trappetti *et al.*, 2011). Auch der schlechtere Übergang der Bakterien ins Blut konnte beobachtet werden. Daher scheint das CiaRH System ebenfalls bedeutsam für die Virulenz von *S. pneumoniae*-Stämmen zu sein (Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a). Des Weiteren hat das CiaRH System einen negativen Einfluss auf die Bakteriocinproduktion von *S. pneumoniae* (Dawid *et al.*, 2009). Eine stärkere Aktivierung des CiaRH Systems, ein sogenanntes hyperaktives CiaRH System kommt durch Mutationen in der Histidinkinase *ciaH* zu stande, welche in Labormutanten aber auch klinischen Isolaten identifiziert werden konnten (Müller *et al.*, 2011). Im Falle des CiaRH Systems handelt es sich nicht um ein essentielles Zwei-Komponenten System, da eine Inaktivierung von Sensorkinase und Response Regulator möglich ist (Guenzi *et al.*, 1994; Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000). Unbekannt ist bislang das Signal, welches von CiaH detektiert wird. Als Stimulus wurden einige Substanzen und Bedingungen wie z.B Ca^{2+} , Phosphat oder O_2 diskutiert (Echenique *et al.*, 2000; Giammarinaro *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Zellwand spezifische Antibiotika wie Penicillin (Rogers *et al.*, 2007) und Vancomycin (Haas *et al.*, 2005) zu einer Aktivierung des Systems führen. In diesem Zusammenhang wurden die durch diese Antibiotika verursachten Zellwandschäden als ein mögliches Signal von CiaH diskutiert (Hakenbeck *et al.*, 1999; Zähner *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2007). Da alle diskutierten Signale wie Ca^{2+} , Phosphat, β -Lactame und Zellwandschäden als direkter Stimulus nicht nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass es sich um indirekte Effekte handelt. In *S. mutans* dagegen konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} die Aktivität von CiaRH reprimiert (He *et al.*, 2008). Hierbei handelt es sich aber auch nicht um den direkten Stimulus, da dieser erst von dem kleinen Peptid CiaX, welches in einem Operon mit *ciaR* und *ciaH* kodiert ist, erkannt wird und diese Information an CiaH weitergeleitet wird. Da CiaX in *S. pneumoniae* fehlt, muss es sich hier um einen anderen Mechanismus handeln. Neben dem Signal selbst, ist auch der Mechanismus, wie der Stimulus die Aktivität von CiaH beeinflusst nicht abschließend geklärt. Untersuchungen der Aktivität des CiaRH Systems in verschiedenen Medien zeigten, dass es sich bei CiaH um eine bifunktionale Kinase handelt. Das bedeutet, sie kann als Kinase und Phosphatase agieren (Halfmann *et al.*, 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, auch in Abwesenheit von CiaH eine Aktivität von CiaR in C+Y-Medium zu verzeichnen ist. Ein potenzielles Signal könnte daher sowohl die Kinase- als auch die Phosphataseaktivität der Histidinkinase verändern.

Die Gene, welche für die Histidinkinase *ciaH* und den Response Regulator *ciaR* kodieren, werden in einem Operon transkribiert, wobei *ciaH* stromabwärts von *ciaR* liegt und mit diesem um acht Basenpaare überlappt (Guenzi *et al.*, 1994; Giammarinaro *et al.*, 1999).

Die Histidinkinase CiaH besitzt zwei putative Transmembrandomänen zwischen denen eine extrazelluläre Domäne, die möglicherweise als Sensor fungiert, liegt. In Richtung C-Terminus schließt sich der cytoplasmatische Bereich, mit der DHP-Domäne und CA-Domäne an. Der konservierte Histidinrest liegt in der DHP-Domäne an Position 226. Auf Grund des Aufbaus ihrer extrazellulären Sensor Domäne wird die Histidinkinase CiaH der EnvZ-Familie zugeordnet (Zähner *et al.*, 2002). Der

Response Regulator CiaR mit der „winged helix-turn helix“ DNA-Bindedomäne der OmpR-Familie (Lange *et al.*, 1999). Er ist cytoplasmatisch lokalisiert und fungiert als Transkriptionsregulator.

In unterschiedlichen Transkriptomstudien wurden mehrere Gene identifiziert, deren Expression vom CiaRH System abhängt (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Mascher *et al.*, 2006; Sebert *et al.*, 2002). Da diese Studien in unterschiedlichen Stämmen, Medien und Microarray Techniken durchgeführt wurden, gab es einige Unstimmigkeiten.

Inzwischen wurde das CiaR Bindemotiv und darüber hinaus die CiaR-regulierten Promotoren identifiziert (Halfmann *et al.*, 2007b). Hierbei handelt es sich um einen direkten Repeat mit der Konsensussequenz TTTAAG-N5-TTTAAG, der in den meisten Fällen ca. 10 bp upstream der -10-Region lokalisiert ist. CiaR kontrolliert direkt 15 Promotoren, die die Transkription von 24 Genen steuern. Diese sind in 5 Operons und 10 monocistronischen Einheiten organisiert. Von diesen 15 Promotoren werden 14 positiv und einer negativ reguliert. Im Falle des negativ regulierten Promotors liegt die DNA-Bindestelle auf dem komplementären Strang innerhalb des transkribierten Genbereiches. Innerhalb der CiaR regulierten Gene unterscheidet man zwischen dem sogenannten Kernregulon mit Genen, deren Expression strikt von CiaR abhängt, und denen bei deren Transkription weitere Faktoren eine Rolle spielen (Halfmann *et al.*, 2007b). Zu den am stärksten von CiaR regulierten Genen gehören die Promotoren, die die Expression von fünf kleinen RNAs, *htrA*, *parB* und *spr0931* steuern. Hierbei werden *htrA* und *parB* in einem Operon transkribiert, welches in der Nähe des Replikationsursprungs liegt. *HtrA* (high temperature requirement A) kodiert für eine Serinprotease, die an der Zelloberfläche lokalisiert vorliegt (Sebert *et al.*, 2005). Ihr wird eine bedeutende Rolle bei der Virulenz, als auch bei der Kompetenz von *S. pneumoniae* (siehe 2.2; 2.7) zugesprochen (Ibrahim *et al.*, 2004a; Ibrahim *et al.*, 2004b; Kowalko & Sebert, 2008; Cassone *et al.*, 2012). *ParB* zeigt Homologie zu Segregationsproteinen, für die gezeigt werden konnte, dass sie bei der Replikation an der Aufteilung von Plasmiden oder dem Chromosom auf die Tochterzellen beteiligt sind (Leonard *et al.*, 2005; Minnen *et al.*, 2011). In *S. pneumoniae* ist wenig über die Funktion von ParB bekannt, wohingegen in *S. mutans* ein Einfluss auf die Kompetenz beobachtet wurde (Ahn *et al.*, 2005). Über die Funktion von *spr0931* ist bisher nichts bekannt. Es liegt offensichtlich extrazellulär oder membranassoziiert vor (Halfmann *et al.*, 2007b).

Zu den schwach CiaR abhängigen Genen gehören einige Gene, die an der Zellwandmodifikation beteiligt sind. Hierzu gehören das *licI*-Operon mit den Genen *licABC-tarIJ* und das *dlt*-Operon. Die Enzyme, welche vom *licI*-Operon kodiert werden, sind in *S. pneumoniae* essentiell. Sie sind für die Cholinaufnahme in die Zelle sowie für das Anhängen von Phosphorylcholin an die Teichonsäuren verantwortlich. Die Expression des *licI*-Operons ist nicht strikt CiaR abhängig. Es wird von zwei Promotoren reguliert, wobei der nicht von CiaR regulierte Promotor konstitutiv aktiv ist. Zudem scheint der von CiaR regulierte Promotor von einem zusätzlichen Regulator kontrolliert zu werden (Denapaite *et al.*, 2012). Die Enzyme TarI und TarJ sind an der Synthese von aktiviertem Ribitol (CDP-Ribitol) beteiligt. CDP-Ribitol ist eine Vorstufe bei der Teichonsäure- und

Kapselpolysaccharidsynthese (Kharat & Tomasz, 2006; Baur *et al.*, 2009; Denapaite *et al.*, 2012). Für die D-Alanylierung der Teichonsäuren sind die Genprodukte des *dlt*-Operons verantwortlich (Kovács *et al.*, 2006; Denapaite *et al.*, 2012). Obwohl das *dlt*-Operon innerhalb von Microarray Studien als CiaR reguliert beschrieben wurde (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Mascher *et al.*, 2003), zeigte sich bei Promotorfusionen nur bei einer Hyperaktivierung des CiaRH Systems eine CiaR abhängige Genexpression (Denapaite *et al.*, 2012). In *S. pneumoniae* R6 ist dieses Operon nicht funktionell. Aufgrund einer Mutation in *dltA* kommt es hier zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation, weshalb der Stamm R6 kein D-Alanin in seinen Teichonsäuren besitzt (Kovács *et al.*, 2006; Denapaite *et al.*, 2012).

Des Weiteren gehören einige Gene, die am Zuckerstoffwechsel beteiligt sind zum CiaR-Regulon, wie das *man*- und das *mal*-Operon. Die Gene *manLMN* werden von dem einzigen, durch CiaR negativ regulierten Promotor kontrolliert und kodieren für ein Phosphotransferasesystem (PTS) der Mannose Klasse, welches aber auch wegen einer niedrigen Substratspezifität Glucose, N-Acetylglucosamin, Glucosamin und Galactose transportiert (Abranches *et al.*, 2003; Bidossi *et al.*, 2012). Zudem ist es an der Katabolitrepession beteiligt, einem System zur Adaption von Milchsäurebakterien an sich ändernde Zuckerquellen (Abranches *et al.*, 2003). Die Gene des *malMP*-Operons kodieren für eine Amylomaltase (MalM) und eine Maltosephosphorylase (MalP), also für Enzyme, die für die Maltose- und Maltodextrinverwertung notwendig sind (Puyet & Espinosa, 1993; Nieto *et al.*, 2001).

In einzelnen Transkriptionseinheiten lokalisierte sind die Gene *axe*, *ppmA* und *spr0782*. Bei dem Genprodukt des Acetylerasogens (*axe*) handelt es sich vermutlich um eine Deacetylase, deren Substrat ein Polysaccharid sein könnte (Halfmann *et al.*, 2007b) und die möglicherweise an der Cefotaximresistenz beteiligt ist (Mascher, 2001). Das Peptidyl-Prolylisomerasogen (*ppmA*), ist offenbar an der Virulenz beteiligt (Overweg *et al.*, 2000). Die Funktion des Genprodukts von *spr0782* ist unbekannt.

Ein weiteres von CiaR reguliertes Operon ist das *ciaRH*-Operon selbst. Die Expression des Promotors von *ciaR* wird durch CiaR schwach positiv reguliert, wodurch es zu einer Autoregulation kommt. Diese Autoregulation ist nicht die einzige Feedback-Regulation des CiaRH Systems. Es konnte gezeigt werden, dass die Kompetenz, welche negativ von CiaRH beeinflusst wird, eine positive Wirkung auf die Aktivität des CiaRH Systems hat (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2011). Eine weitere Feedback-Regulation scheint über einige Genprodukte des CiaR-Regulons zu laufen, z.B bewirkt die Inaktivierung von *htrA*, den kleinen regulatorischen RNAs oder des *manLMN*-Operons eine leichte Steigerung der Aktivität, die Inaktivierung von *ppmA* dagegen führt zu einer Abnahme der Aktivität (Müller *et al.*, 2011).

Die 5 stärksten, strikt von CiaR regulierten Promotoren steuern die Expression von kleinen, nicht kodierenden, regulatorischen RNAs (csRNAs = „cia-dependent small RNAs“) (Halfmann *et al.*, 2007b). Diese sind an dem Autolysephänotyp von CiaRH beteiligt und spielen eine Rolle bei der Kompetenz und der Cefotaxim Suszeptibilität von *S. pneumoniae* (Müller, 2011; Tsui *et al.*, 2010).

2.5 Kleine regulatorische RNAs in Bakterien

Im Gegensatz zu den klassischen RNA Vertretern in der Zelle, den rRNAs, mRNAs und tRNAs, sind sRNAs („small RNAs“) erst seit relativ kurzer Zeit bekannt. Zurzeit ist davon auszugehen, dass etwa 10-20% der bakteriellen Gene für regulatorische RNAs kodieren, die eine Vielfalt von physiologischen Aufgaben übernehmen (Romby & Charpentier, 2010). Der erste Vertreter dieser Regulatoren, die MicF-RNA, wurde in *E. coli* bereits 1984 beschrieben (Coleman *et al.*, 1984).

Kleine regulatorische RNAs (sRNAs) sind die größte bekannte Klasse post-transkriptioneller Regulatoren in Bakterien. Ihr Regulationsmechanismus erlaubt es Bakterien ihre Physiologie an sich verändernde Umweltbedingungen anzupassen (Waters & Storz, 2009; Brantl, 2009; Storz *et al.*, 2011). sRNAs können in mehrere Gruppen eingeteilt werden.

Manche sRNAs sind in der Lage Proteine zu binden, wobei drei Untergruppen unterschieden werden: die 6S RNA welche mit der RNA Polymerase interagiert, sRNAs, welche an Proteine binden, die an der Regulation der Translation beteiligt sind und sRNAs, die mit Enzymen interagieren (Brantl, 2009). Die Interaktion von sRNAs und Regulatorproteinen wurde unter anderem an CsrA, einem Regulator der Kohlenstoffspeicherung und der sRNA CsrB in *E. coli* untersucht. CsrA ist ein 61 aa-langes Protein, welches unter anderem die Glukoneogenese inhibiert. Hierbei bindet CsrA an die mRNAs der verantwortlichen Gene, deren Translation dadurch gehemmt wird. Die Sekundärstruktur der 366 bp langen sRNA bildet 15 kurze Haarnadelschleifen. In 12 dieser Schleifen befindet sich das Sequenzmotiv AGGA, woran der CsrA-Regulator mit sehr hoher Affinität bindet (Liu *et al.*, 1997). Hierdurch kommt es zur Titration des CsrA-Regulators, was dazu führt, dass dieser seine eigentliche Funktion nicht mehr ausüben kann. Die Translation der von ihm reprimierten Gene erfolgt (Babitzke & Romeo, 2007).

Des Weiteren sind sRNAs bekannt, welche an der Riboregulation beteiligt sind z.B. RNA Thermometer und Riboswitches, die Signale aus der Umgebung wahrnehmen können (Narberhaus, 2010; Breaker, 2012).

Die größte Gruppe der identifizierten sRNAs besteht aus nicht-kodierenden regulatorischen RNAs, die zwischen 50 und 500 Nukleotiden groß sind und durch Basenpaarung mit der mRNA agieren (Gimpel *et al.*, 2012; Schnorpfel *et al.*, 2013). Dabei können die *cis*- und *trans*-kodierte RNAs inhibierend oder aktivierend auf die Translation, die RNA-Stabilität oder die RNA-Degradation wirken. Kleine RNAs welche inhibierend auf die Translation wirken, binden meist die Ribosomenbindestelle und blockieren darüber den Zugang des Ribosoms. Aktivierende sRNAs binden upstream der Ribosomenbindestelle innerhalb der kodierenden Sequenz oder innerhalb des untranslatierten 3'-Ende der mRNA (Opdyke *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2007; Vecerek *et al.*, 2007; Bouvier *et al.*, 2008; Pfeiffer *et al.*, 2009; Holmqvist *et al.*, 2010). *Cis*-kodierende RNAs sind vollständig komplementär zu ihrer Ziel mRNA und können daher eine komplette Duplex mit der mRNA ausbilden.

Die meisten bekannten *cis*-kodierte RNA-Gene befinden sich auf Plasmiden, Phagen und Transposons. Diese Gene liegen auf dem entgegengesetzten DNA-Strang im selben DNA-Abschnitt wie ihr Zielgen. Die Target-mRNAs werden als sense-RNAs und die kleinen RNAs als antisense-RNAs bezeichnet (Brantl, 2007). Die kleinen RNAs agieren als Inhibitor der Translation, mindern oder stören die Transkriptionsrate oder bewirken die Degradation der mRNA. Bei der Inhibierung der Translation binden sie an die Ribosomenbindestelle oder/und das Startcodon. Das Ausbilden von Sekundärstrukturen, welche den Zugang zur Ribosomenbindestelle verhindern, ist eine weitere Möglichkeit (del Solar *et al.*, 1997; Okibe *et al.*, 2010) die Translation zu inhibieren. Das binden der sRNA kann ebenfalls zum Ausbilden einer Transkriptions-Terminatorschleife führen, wodurch die Transkription stoppt (Le Chatelier *et al.*, 1996). Des Weiteren ist es möglich, dass der sRNA-mRNA Komplex von RNAsen erkannt und degradiert wird (Jahn *et al.*, 2012).

Trans-kodierte RNAs sind nur teilweise komplementär, bilden nur partiell Duplexe und haben auch meist mehrere Zielgene (Gottesman, 2005; Thomason *et al.*, 2012; Gimpel *et al.*, 2012). Die Gene der *trans*-kodierte sRNAs befinden sich in Intergenregionen. Da bei *trans*-kodierte RNAs nur ein Teil der sRNA für die Bindung an die mRNA benötigt wird, gestaltet sich die Bestimmung potenzieller Zielgene wesentlich schwieriger (Pichon & Felden, 2008; Tjaden *et al.*, 2006; Tjaden, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass nur wenige Nukleotide innerhalb des Duplexbereiches wichtig für die partielle Bindung sind (Kawamoto *et al.*, 2006; Balbontin *et al.*, 2010; Papenfort *et al.*, 2012).

Des Weiteren konnten auch *trans*-kodierende sRNAs identifiziert werden, welche eine doppelte Funktion aufweisen. Zum einen agieren sie über Basenpaarung als sRNA, werden aber ebenfalls translatiert (Morfeldt *et al.*, 1995; Mangold *et al.*, 2004; Boisset *et al.*, 2007; Wadler & Vanderpool, 2007).

Trans-kodierende sRNAs sind an vielen biologischen Prozessen beteiligt, wobei sie meist die Feinabstimmung von metabolischen Prozessen regulieren, was erklärt, warum ein Phänotyp für die meisten sRNAs weder durch Deletion noch Überexpression zu beobachten ist (Gaballa *et al.*, 2008). Der Großteil der *trans*-kodierenden sRNAs agiert als Inhibitor der Translation oder hat einen Effekt auf die RNA-Stabilität. Nur wenige sRNAs sind bis jetzt bekannt, die aktivierend auf die Translation wirken. Die Inhibierung der Translation kommt entweder bei direkter Interaktion mit der Ribosomenbindestelle, durch das Ausbilden von Strukturveränderungen downstream der Ribosomenbindestelle oder durch das Blockieren der Ribosomen Standby Sites zu stande (de Smit & van Duin, 2003; Brantl, 2009). Die Kombination aus Translationsinhibition und Degradation ist nicht sehr stark verbreitet.

Die bekannten regulatorischen Prinzipien sind, anhand schon verifizierter Regulationsmechanismen von kleinen *trans*-kodierenden RNAs in Abbildung 2.3 A-D dargestellt.

Die Expression der OxyS-sRNA wird durch H₂O₂ während oxidativem Stress induziert. OxyS bindet an die *fhlA*-mRNA, welche für einen transkriptionellen Aktivator des Formiat-Metabolismus kodiert,

und blockiert deren Ribosomenbindestelle, wodurch die Translation des Regulators reprimiert wird (Abbildung 2.3 A oben) (Argaman & Altuvia, 2000).

Die Inhibition der Translation durch strukturelle Änderungen downstream der Ribosomenbindestelle ist bis jetzt nur an einem Beispiel beschrieben. Die sRNA SR1 aus *B. subtilis* interagiert mit der *ahrC* mRNA, welche für einen Transkriptionsaktivator des Arginin Katabolit Operons kodiert. Die Bindung von SR1 induziert Veränderungen in den komplementären Regionen aber auch direkt downstream der *ahrC* Ribosomenbindestelle, wodurch das Ribosom am Binden gehindert wird (Abbildung 2.3 A unten) (Heidrich *et al.*, 2007).

Eine Kombination aus Translationsinhibierung und Degradation der mRNA kann anhand der RNAIII aus *S. aureus* verdeutlicht werden. RNAIII hat mehrere Zielgene, darunter auch das Oberflächen Adhesin Protein Spa. Für alle bisher bekannten Zielgene konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus RNAIII/mRNA, welcher die Ribosomenbindestelle bedeckt, das Erkennen durch RNaseIII begünstigt und somit den Abbau fördert (Abbildung 2.3 B) (Huntzinger *et al.*, 2005). In einer anderen Studie an der sRNA MicC aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus sRNA/mRNA und Hfq zum einen die Stelle definiert, an welcher die RNaseE schneidet und diese zusätzlich aktiviert, indem eine Monophosphatgruppe am 5'-Ende präsentiert wird (Frohlich *et al.*, 2012). Hfq ist ein Protein mit dem viele sRNAs assoziiert sind. Es fördert die Interaktion zwischen sRNA und mRNA und wirkt als RNA-Chaperon. In den meisten gram positiven Bakterien ist die Rolle von Hfq nicht eindeutig geklärt (Bohn *et al.*, 2007). In Enterokokken, Laktokokken, Laktobacillen und Streptokokken sind keine Hfq-Homologe im Genom zu finden (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Möglicherweise wird hier die Funktion von Hfq durch andere, bislang unbekannte Proteine übernommen oder die regulatorischen RNAs dieser Bakterien können ohne einen Hilfsfaktor ihre Funktion ausüben.

RNAIII aus *S. aureus* hat nicht nur einen inhibierenden Effekt auf die mRNA, sondern wirkt im Fall der *hla* mRNA, welche für ein α -Hämolyisin kodiert, aktivierend auf die Translation. In Abwesenheit der sRNA bildet die mRNA eine Stammschleife in der die Ribosomenbindestelle liegt, die dadurch für das Ribosom nicht zugänglich ist. Durch das Binden der sRNA an einen der Stränge wird die Stammschleife aufgelöst und die Ribosomenbindestelle zugänglich gemacht (Abbildung 2.3 C) (Morfeldt *et al.*, 1995).

Ein weiterer Prozess, welcher die Translation verstärkt, ist die Stabilisierung der mRNA. Die FasX sRNA aus *S. pyogenes* bindet upstream der Ribosomenbindestelle an die *ska* mRNA, wodurch ein Duplex entsteht, welcher die mRNA vor Abbau schützt und gleichzeitig die Translation ermöglicht (Abbildung 2.3 D) (Ramirez-Peña *et al.*, 2010).

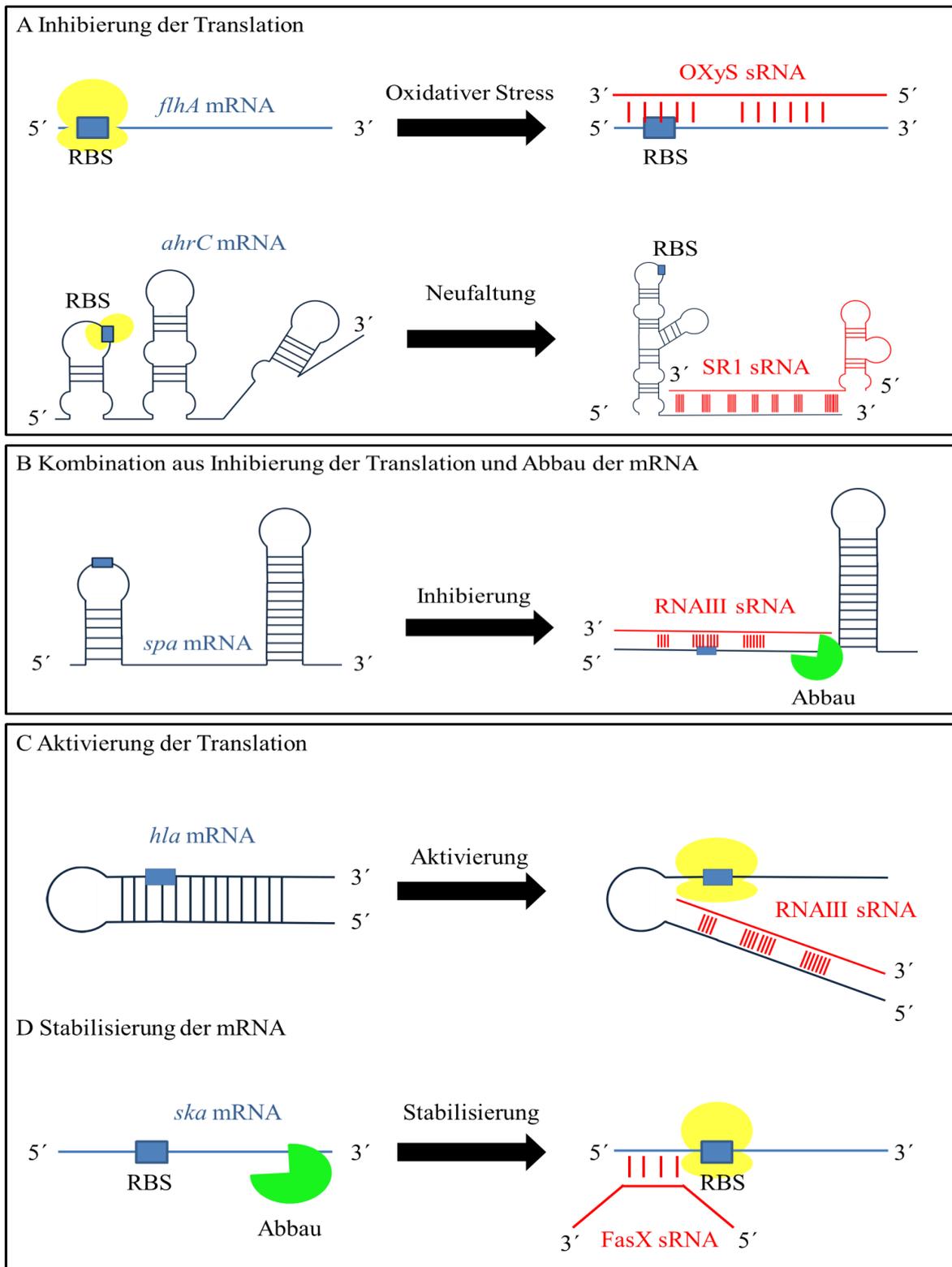


Abbildung 2.3: Überblick über Regulationsmechanismen von *trans*-kodierten sRNAs.

Die mRNAs sind jeweils in blau dargestellt, die sRNAs in rot. Die Ribosomenbindestelle (RBS) ist markiert und das gebundene Ribosom in gelb dargestellt. RNAsen, die die RNA abbauen sind grün markiert. A: Inhibierung der Translation durch direktes Binden an der RBS (oben) oder durch Bildung von Sekundärstrukturen (unten). B: Kombination aus Inhibieren der Translation und Degradieren der mRNA. C: Aktivierung der Translation durch freilegen der RBS. D: Stabilisierung der mRNA und dadurch vermittelter Schutz vor Abbau.

Anhand der RNAIII von *S. aureus* konnte somit gezeigt werden, dass eine sRNA auf verschiedene mRNAs unterschiedlich wirken kann. Im Fall von *spa* inhibierend für die Translation mit gekoppeltem Abbau und auf die *hla* mRNA aktivierend auf die Translation. Des Weiteren ist es möglich, dass mehrere kleine RNAs an der Regulation eines Gens beteiligt sind. Dies konnte anhand von vier identifizierten sRNAs in *V. cholerae*, welche an der Regulation der Quorum Sensing vermittelten Virulenz und Biofilmbildung beteiligt sind, nachgewiesen werden (Lenz *et al.*, 2004). Diese vier RNAs, Qrr1 bis Qrr4 bezeichnet, sind ähnlich zueinander und werden bei niedrigen Zelldichten exprimiert. Die Regulation der Expression der sRNAs unterliegt dem transkriptionellen Aktivator LuxO. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von LuxO wird von zwei unterschiedlichen Quorum Sensing Systemen gesteuert. LuxO liegt phosphoryliert bei niedriger Zelldichte vor und aktiviert dadurch die Expression der sRNAs. Die sRNAs wiederum hemmen die Translation der *hapR* mRNA, welche für den Hauptregulator kodiert. Dieser wiederum hemmt die Expression von Virulenzgenen, Gene der Biofilmbildung und Gene des TypIII-Sekretionssystems. Bei niedriger Zelldichte werden diese Gene daher exprimiert. LuxO wirkt auch als Aktivator auf die Gene der Luciferase und verschiedene Proteasen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die sRNAs die Translation einer Diguanylatecyclase (DGC) aktivieren. Diese Aktivierung führt zur c-di-GMP Akkumulation und Biofilmbildung (Zhao X. *et al.*, 2013). Somit verursacht die Interaktion derselben sRNA mit zwei unterschiedlichen mRNAs eine c-di-GMP abhängige Biofilmbildung durch verschiedene Mechanismen, einmal durch negative Regulation von HapR und andernfalls durch positive Regulation einer Diguanylatecyclase.

In *V. cholerae* wirken die kleinen RNAs redundant. Nur die Inaktivierung aller vier RNAs führte zum Verlust der Quorum Sensing-Antwort. Ein etwas anderer Effekt zeigt sich in *V. harveyi*, indem noch eine fünfte sRNA identifiziert wurde. Hier konnte ein additiver Effekt dieser sRNAs auf die Regulation der Quorum Sensing-Antwort nachgewiesen werden.

In gram positiven Bakterien, zu denen auch die Streptokokken gehören, ist im Gegensatz zu den relativ gut untersuchten gram negativen Bakterien wie z.B. *E. coli* wenig über sRNAs und deren assoziierten Proteinen bekannt (Le Rhun & Charpentier, 2012).

Durch *in silico* Studien und Genomanalysen konnten einige sRNAs in Streptokokken identifiziert werden, welche an regulatorischen Netzwerken der Adaption, der Physiologie, der Pathogenität, des Metabolismus und der Virulenz beteiligt sind. Die Identifizierung von sRNAs im Genom gestaltet sich schwierig, da die meisten Programme zur Identifizierung von sRNAs in gram negativen Bakterien entwickelt wurden. Viele in Streptokokken bekannte sRNAs wurden durch Microarray Analysen, Deep RNA-Sequenzierung oder Transkriptionales Mapping identifiziert. Hierbei ist anzumerken, dass es nur wenige Übereinstimmungen zwischen den neuen Methoden der sRNA Identifizierung und den bioinformatischen Methoden gibt. Generell können die in Streptokokken identifizierten RNAs in 5 Klassen aufgeteilt werden: 1) *cis*-kodierte sRNAs, 2) *trans*-kodierte sRNAs die an mRNA binden,

3) *trans*-kodierte sRNAs die an sRNAs binden, 4) sRNAs die Teil des Ribonukleoprotein Komplexes sind, 5) CRISPR RNAs, die in ähnliche DNA eingebaut werden.

Sechs sRNAs wurden identifiziert, die eine Rolle in der Virulenz von *S. pyogenes* spielen (FasX, Pel, RivX, 4,5S RNA, tracrRNA und crRNAs).

Die ca. 200 Nukleotide lange sRNA FasX wird in der späten exponentiellen Wachstumsphase exprimiert. Die Transkription von FasX steht unter der Kontrolle des Response Regulators FasA, welcher zusammen mit FasX und zwei weiteren Histidinkinasen FasB und FasC in einem Operon kodiert ist (Kreikemeyer *et al.*, 2001). FasX agiert als *trans*-kodierte sRNA, welche upstream der Ribosomenbindestelle an die mRNA von *ska* bindet und diese stabilisiert (Abbildung 2.3). *Ska* kodiert für die Streptokinase, einem bedeutenden Pathogenitätsfaktor von *S. pyogenes* (Le Rhun & Charpentier, 2012).

Pel (ca. 450 nt), eine weitere an der Virulenz beteiligte sRNA, kontrolliert die Expression von Virulenzfaktoren. Diese sRNA gehört zu den bifunktionalen sRNAs. Sie agiert als regulatorische RNA kodiert aber ebenfalls für ein Protein. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die untranslatierte RNA und nicht das translatierte Produkt SagA die Expression von Virulenzfaktoren beeinflusst (Mangold *et al.*, 2004). Wie genau Pel die Virulenz beeinflusst ist nicht klar. Es wird vermutet, dass die Zielgene der Pel sRNA eher Regulatoren von weiteren Genen sind, statt einer direkten Regulation von Virulenzgenen.

Eine weitere an der Virulenz beteiligte RNA ist RivX. Hierbei handelt es sich um ein Prozessierungsprodukt des *rivRX* Transkripts. Diese RNA löst einen positiven Effekt auf die Mga-regulierten Gene aus, welche einen wichtigen Regulator der Virulenz darstellt (Roberts & Scott, 2007).

Die Expression aller drei oben beschriebenen sRNAs (FasX, Pel, RivX) wird durch Regulator Proteine reguliert, wobei die Expression von FasX und Pel auf Signalmoleküle reagiert.

Die 4,5S sRNA (oder scRNA = small cytoplasmic RNA) reguliert die Expression und Sekretion von Virulenzfaktoren in *S. pyogenes*. Hierbei handelt es sich um die RNA Komponente des Signalerkennungspartikel (SRP), einem konservierten Ribonukleoprotein, welches kotranslational Polypeptide zum Sekretionsapparat bringt.

In *S. pneumoniae* konnten bis jetzt nahezu 100 sRNAs identifiziert werden, von denen allerdings nur etwa 70 durch Northern Blot Analyse bestätigt wurden (Halfmann *et al.*, 2007b; Kumar *et al.*, 2010; Tsui *et al.*, 2010; Acebo *et al.*, 2012; Mann *et al.*, 2012). Über die physiologische Rolle dieser sRNAs ist wenig bekannt. Ein Beispiel hierfür stellen die in *S. pneumoniae* D39 identifizierten sRNAs Spd-sr17 und Spd-sr37 dar. Für diese konnte gezeigt werden, dass weder eine Deletion, noch eine Überexpression der sRNAs zu Veränderungen im Wachstum, in der Stressantwort, in der globalen Transkription, noch in der Virulenz führt (Tsui *et al.*, 2010).

Für die sRNA, snr206 dagegen wurde beschrieben, dass diese an der Kompetenzentwicklung beteiligt ist. Als mögliches Target wurde die Histidinkinase ComD des Zwei-Komponenten Systems ComDE

diskutiert (Acebo *et al.*, 2012). Dieses Zwei-Komponenten System ist essentiell für die Initiierung der Kompetenzentwicklung (Håvarstein *et al.*, 1995). Mehrere sRNAs in *S. pneumoniae* konnte mit der Virulenz in Verbindung gebracht werden. Außerdem konnten in verschiedener sRNA Deletionsmutanten unterschiedliche Proteinprofile identifiziert werden (Mann *et al.*, 2012). Allerdings konnte hier keine direkte regulatorische Verbindung zwischen den sRNAs und ihren potentiellen Target nachgewiesen werden.

Die Expression der fünf ersten, in *S. pneumoniae* identifizierten sRNAs, wird durch den Response Regulator CiaR reguliert (Halfmann *et al.*, 2007b).

2.6 Die csRNAs in *S. pneumoniae*

Die stärksten CiaR-aktivierten Promotoren steuern die Expression von fünf kleinen *trans*-kodierte, regulatorischen RNAs, den csRNAs („cia-dependent small RNAs“). Die csRNAs waren die ersten kleinen regulatorischen RNAs, die in *S. pneumoniae* identifiziert wurden (Halfmann *et al.*, 2007b). Mittels Promotor Identifizierung konnten in allen veröffentlichten Streptokokken-Genomen CiaR regulierte csRNAs nachgewiesen werden (Marx *et al.*, 2010). Alle in dieser Studie untersuchten Streptokokken besitzen zwischen 2 und 6 csRNAs, welche zwischen 51 und 202 nt groß sind. Dies deutet darauf hin, dass csRNAs als Bestandteil des CiaR-Kernregulons in allen Streptokokken vertreten sind (Marx *et al.*, 2010). In neueren Studien konnte dieses Ergebnis bestätigt werden und alle csRNAs mittels hochauflösendem Genom Tiling Arrays in *S. pneumoniae* TIGR4 identifiziert werden (Kumar *et al.*, 2010). Allerdings konnten durch diverse andere Verfahren, welche für die Identifizierung von sRNAs verwendet werden, meist nur ein Teil der csRNAs in Streptokokken nachgewiesen werden.

Durch eine Transkriptions-Sequenzierung des gesamten Genoms von *S. pneumoniae* TIGR4 konnte z.B. nur csRNA 5 nachgewiesen werden (Mann *et al.*, 2012). Hierbei könnte das Problem darin liegen, dass kleine Transkripte unter 200 nt isoliert und sequenziert wurden. csRNA1-4 sind unter 100 nt groß, weshalb es schwierig sein könnte diese anzureichern. csRNA5 ist mit 151 nt die Größte der csRNAs und kann daher leichter isoliert werden. In einer weiteren Studie konnte mittels Deep Sequencing des RNomes nur csRNA3 und csRNA5 nachgewiesen werden (Acebo *et al.*, 2012). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein Problem der starken Sequenzähnlichkeit der csRNAs. So unterscheiden sich csRNA1-4 nur durch ein paar Basen, wodurch es der Software, welche die Sequenzen zu einer Referenz anordnet, nicht möglich ist, zwischen diesen 4 csRNAs zu unterscheiden. Durch eine bioinformatische Suche mit anschließender Northern Blot Analyse konnte nur csRNA1 nachgewiesen werden (Tsui *et al.*, 2010).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse machen deutlich, wie schwierig die Identifizierung und Verifizierung von sRNAs ist.

Die in *S. pneumoniae* R6 identifizierten fünf csRNAs liegen in intergenen Regionen und sind nicht-kodierend. *In silico*-Berechnungen sagen für die csRNAs eine 3'- und eine 5'-Stammschleife, sowie einen dazwischenliegenden ungepaarten Bereich voraus. In diesen ungepaarten Regionen tragen alle fünf csRNAs Bereiche, die zur Shine-Dalgarno-Sequenz (Shine & Dalgarno, 1974) und dem Start Codon komplementär sind, welche durch 6 Basen getrennt sind (CAU-N6-CUCC) (Abbildung 2.4). Dies spricht dafür, dass sie mit den Translationsinitiationsregionen von mRNAs interagieren und deren Translation beeinflussen (Halfmann *et al.*, 2007b).

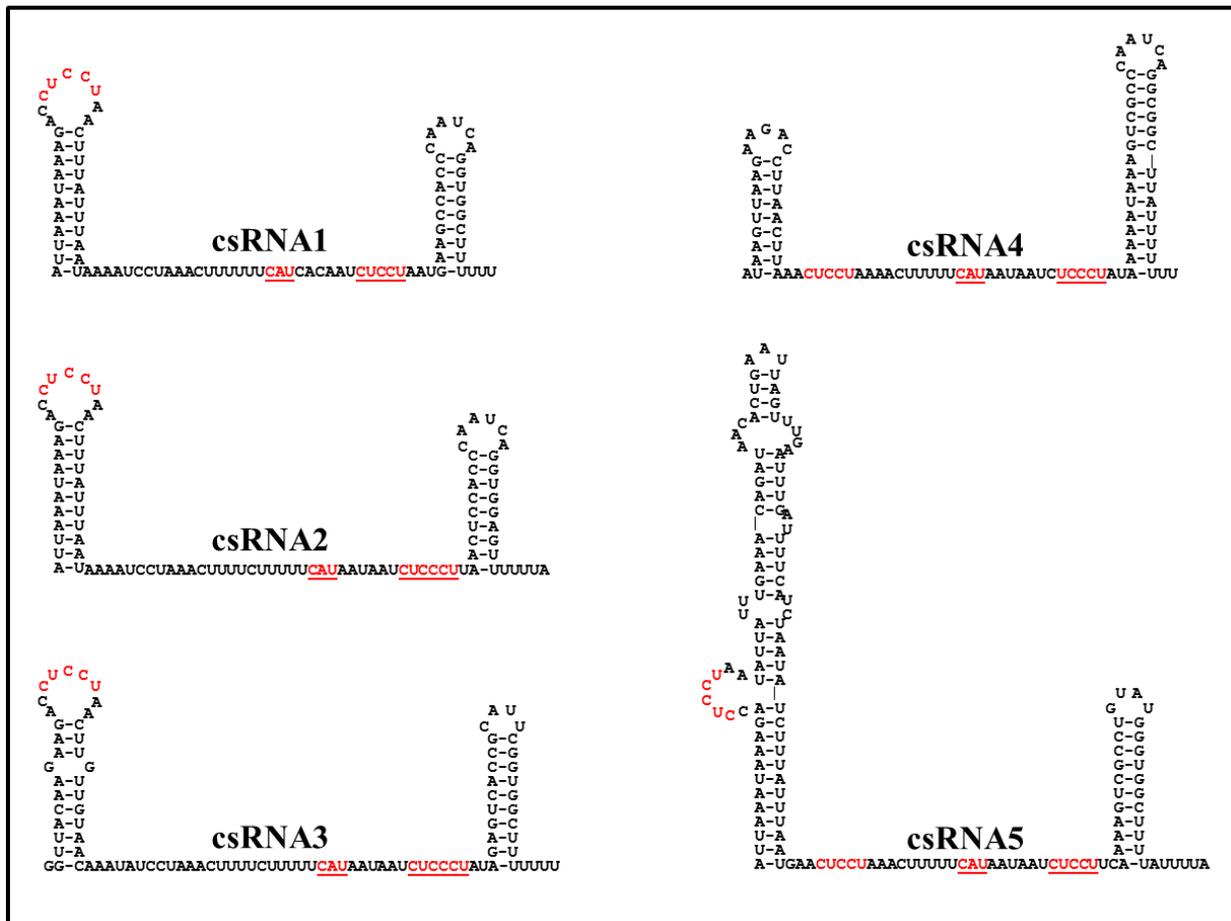


Abbildung 2.4: Sekundärstrukturen der csRNAs nach Zuker (Zuker, 2003)

Die Sekundärstrukturen der csRNAs1-5 mit den 3' und 5'-Stammschleifen und der dazwischenliegenden ungepaarten Region sind dargestellt. In rot markiert sind die Anti-Shine-Dalgarno und Anti-Aug Sequenzen.

Für alle csRNAs konnten unterschiedliche Transkript-Größen identifiziert werden. Für csRNA1 konnten zwei Längen von 92 und 93 Basen, für csRNA2 die Längen 96, 97 und 98 Basen und für csRNA3 Längen von 98, 100 und 101 Basen nachgewiesen werden. Der größte Anteil an csRNA1, csRNA2 bzw. csRNA3 besaß jedoch eine Länge von 93, 97 bzw. 100 Basen (Halfmann *et al.*, 2007b). Alle drei csRNAs enthalten eine weitere Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz in der ersten Stammschleife. Die Gene *ccnA* und *ccnB*, welche für csRNA1 bzw. csRNA2 kodieren, liegen direkt hintereinander.

Upstream von *ccnA* liegt das Gen *spr0237* und downstream von *ccnB* das Gen *ruvB*. Das Gen *ccnC*, welches für *csRNA3* kodiert, liegt zwischen den Genen *purA* upstream und *spr0022* downstream.

Für *csRNA4* konnte die Länge nicht eindeutig bestimmt werden. Es konnten sieben verschiedenen Längen identifiziert werden, welche zwischen 87 und 95 Basenpaaren liegen. An Stelle einer zweiten Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz in der ersten Stammschleife besitzt diese *csRNA* eine zusätzliche Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz in der ungepaarten Region. Upstream von *ccnD*, dem Gen von *csRNA4* liegt das Gen *spr0239* und downstream das Gen *uppS*.

Die größte der *csRNAs* ist *csRNA5*. Für sie wurden die Längen 147, 148, 149 und 151 Basen bestimmt. Der größte Anteil an *csRNA5* besitzt jedoch eine Länge von 148 Basen. Diese *csRNA* enthält, die in *csRNA1*, 2 und 3 beschriebene Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz in der ersten Stammschleife und zusätzlich die in *csRNA4* beschriebene Anti-Shine-Dalgarno innerhalb der ungepaarten Region. Upstream von *ccnE*, dem Gen von *csRNA5* liegt das Gen *spr0218* und downstream das Gen *gpmB*.

Durch einen Sequenzvergleich (Abbildung 2.5) konnte gezeigt werden, dass die einzelnen *csRNAs* viele ähnliche Bereiche zu einander aufweisen. Sogar bei der viel größeren *csRNA5* konnte gezeigt werden, dass der *csRNA5*-„Grundstamm“ starke Ähnlichkeit zu den anderen *csRNA*-Stämmen zeigt. Allerdings befindet sich eine Insertion von mehr als 50 bp zwischen den beiden Armen der 5′-„Grundstammschleife“. Die 5′-Stammschleifen zeigen bei allen *csRNAs* zwei ähnliche Blöcke, welche nur durch eine unterschiedliche Base getrennt werden. Die ungepaarten Regionen der *csRNAs* sind ebenfalls durch ähnliche Sequenzen geprägt. Die Sequenzen der Terminatorstrukturen am 3′-Ende sind ebenfalls sehr ähnlich zueinander. Besonders der zweite Arm besteht aus einer fast identischen Sequenzabfolge.

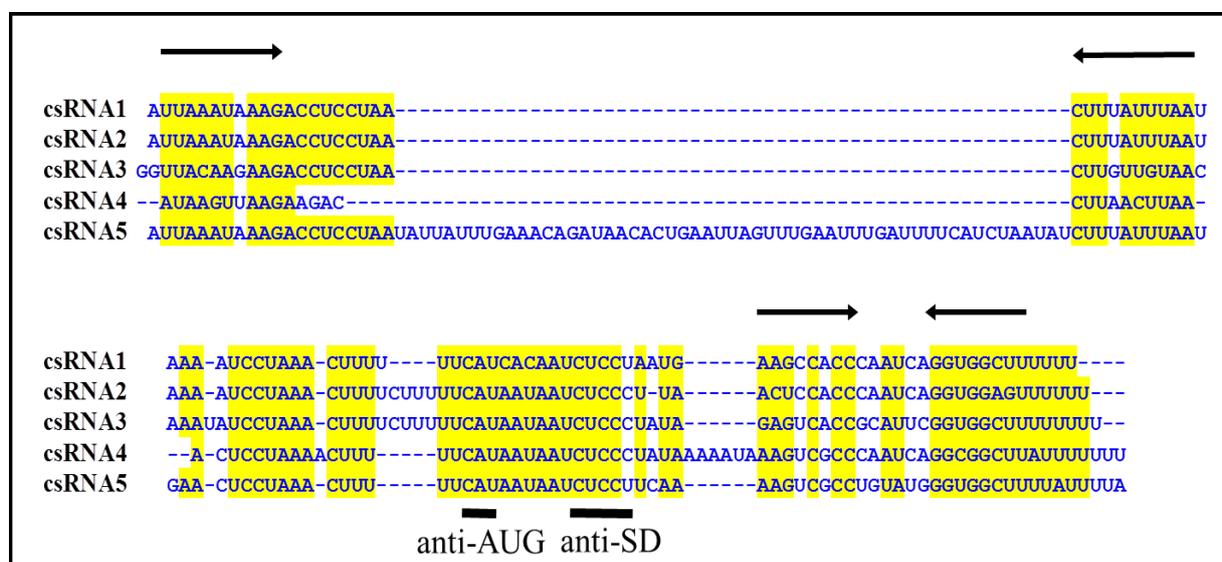


Abbildung 2.5: Sequenzvergleich der *csRNAs* mittels Multalign (Corpet, 1988). Die Basenabfolge der *csRNAs* ist dargestellt. Die Bereiche, in welchen vier von fünf Basen identisch sind, sind gelb hinterlegt. Die Anti-Shine-Dalgarno- und anti-AUG-Sequenzen sind schwarz unterstrichen. Die Basen, welche die Bindung der beiden Stammschleifen eingehen sind mit schwarzen Pfeilen markiert (Halfmann *et al.*, 2007b).

Aufgrund der großen Homologie, die die csRNAs untereinander aufweisen, ist eine redundante Funktion vorstellbar.

Nur wenige regulatorische Ziele der csRNAs sind bislang identifiziert worden, allerdings konnte gezeigt werden, dass die csRNAs einen pleiotropen Effekt auf die Physiologie haben.

Für csRNA4 und csRNA5 konnte gezeigt werden, dass sie die Stationärphasen-Autolyse beeinflussen (Halfmann *et al.*, 2007b) und, dass eine csRNA5-Deletionsmutante nicht mehr in der Lage ist, Lungengewebe zu infizieren (Mann *et al.*, 2012). Auch konnte ein negativer Effekt der csRNA1 auf die Kompetenz beobachtet werden, allerdings konnte *comC* (siehe 2.2), obwohl es Hinweise darauf gibt (Kovács, 2009; Tsui *et al.*, 2010), nicht eindeutig als Zielgen der csRNA1 verifiziert werden (Tsui *et al.*, 2010). In neueren Studien konnten mithilfe von Translationsfusionen Gene identifiziert werden, welche von den csRNAs reguliert werden (Schnorpfeil *et al.*, 2013). Hierbei handelt es sich um die Gene spr0081, spr0371, spr0551, spr1097 und spr0159. Mithilfe der NCBI Datenbank, welche nach konservierten Domänen sucht, wurden diese Gene als Transporter (spr0081, spr0371, spr0551, spr1097) bzw. ein Protein mit DNA-Bindedomäne (spr0159) beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass keines dieser Gene an der β -Laktamresistenz oder der Autolyse beteiligt ist.

Es konnte klar gezeigt werden, dass die csRNAs an der β -Laktamresistenz, der Autolyse und der Kompetenz beteiligt sind (Müller, 2011). Allerdings ist weiterhin unbekannt, welche der, durch die csRNAs regulierten Gene, dabei eine Rolle spielen.

Im Bezug auf die Kompetenz ist diese Zielgen Bestimmung besonders schwierig, da die Kompetenz von vielen Bedingungen abhängig ist und auch schon gezeigt werden konnte, dass die Serinprotease HtrA, welche auch durch CiaR-reguliert wird, einen negativen Effekt auf die Kompetenz hat (siehe 2.2) (Cassone *et al.*, 2012).

2.7 Die Serinprotease HtrA

HtrA (high temperature requirement A) zählt zu einer weit verbreiteten Familie von Hitzeschock induzierten trypsinähnlichen Serinproteasen. Homologe von HtrA kommen in gram negativen und gram positiven Bakterien, in Pflanzen und Säugetieren vor. Alle diese Homologe besitzen protolytische Aktivität. Die physiologische Rolle und der Aufbau sind aber teilweise etwas unterschiedlich (Kim & Kim, 2005).

Diese Proteasen sind oftmals extrazellulär bzw. im Periplasma lokalisiert und übernehmen dort in vielen Fällen die Funktion der Proteinqualitätskontrolle. Im Gegensatz zu Proteasen wie ClpXP, ClpAP oder HsIUV, die die Qualitätskontrolle im Cytoplasma übernehmen, arbeiten die HtrA-Proteasen ATP-unabhängig (Kim & Kim, 2005). Bezüglich der Domänenstruktur zeigen alle HtrA-Proteasen einen ähnlichen Aufbau. Am N-Terminus befindet sich ein kurzer hydrophober Bereich, der als Signalpeptid oder Membrananker fungieren kann, gefolgt von der Proteasedomäne und einer

oder mehreren PDZ-Domänen (post-synaptic density protein, disc large, zo-1 protein). Die PDZ-Domänen, welche in ihrer Anzahl variieren können, sind am C-terminalen Ende der HtrA-Serinproteasen lokalisiert. HtrA von *S. pneumoniae* besitzt, wie die Homologe der meisten gram positiven Bakterien, nur eine PDZ-Domäne, während viele HtrA-Homologe gram negativer Bakterien zwei PDZ-Domänen enthalten (Jones *et al.*, 2001). Die PDZ-Domänen sind stark negativ geladen. Daher wird vermutet, dass eine Ionenbindung zwischen der PDZ-Domäne und den negativ geladenen Phospholipiden, HtrA mit der Membran assoziiert. An der HtrA-Protease DegP in *E. coli*, konnte gezeigt werden, dass diese den Membrandruck nicht beeinflusst.

Des Weiteren sind diese weit verbreiteten Struktur motive an der Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind. Es wird vermutet, dass die PDZ-Domänen an der Substratbindung von HtrA beteiligt sind und bei der Interaktion der HtrA-Untereinheiten während der Oligomerisierung eine Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Oligomerisierungszustand, welcher durch Ligandenbindung an die PDZ stimuliert wird, wiederum einen regulatorischen Einfluss auf die Enzymaktivität hat (Jiang *et al.*, 2008; Krojer *et al.*, 2010).

Die drei konservierten katalytisch aktiven Aminosäuren, ein Histidin, ein Serin und ein Aspartat, liegen in der Protease-Domäne von HtrA (Skorko-Glonek *et al.*, 1995).

Die Proteine der HtrA-Familie besitzen sowohl Protease-, als auch Chaperonaktivität. Der Wechsel zwischen diesen beiden Funktionen ist hierbei von der Temperatur abhängig (Spiess *et al.*, 1999). Die Proteaseaktivität von HtrA-Homologen wurde experimentell durch den proteolytischen Abbau von β -Casein nachgewiesen (Lipinska *et al.*, 1990).

In *S. pneumoniae* ist HtrA, welches mit den csRNAs zu den am stärksten durch CiaR regulierten Promotoren gehört (siehe 2.4), an der Kompetenz, der Virulenz, der Bacteriocinproduktion und dem Wachstum unter Stressbedingungen beteiligt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von HtrA den Kompetenzdefekt, der durch eine Hyperaktivierung von CiaH (CiaH-T230P) verursacht wird, teilweise aufheben kann (Sebert *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2011). Zum anderen wurde in anderen Studien ein inhibitorischer Effekt von HtrA auf die Kompetenz beobachtet (Ibrahim *et al.*, 2004b). In neueren Studien konnte nun gezeigt werden, dass HtrA das Kompetenz stimulierende Peptid CSP abbaut und dadurch negativ auf die Kompetenzentwicklung wirkt (Cassone *et al.*, 2012). Andere falsch gefaltete Proteine können die Aktivität von HtrA an CSP vermindern, woraus sich schließen lässt, dass HtrA allgemein falsche und unvollständig gefaltete Proteine als Substrat erkennt. Hierbei könnte es sich um einen generellen Mechanismus handeln, bei dem HtrA mittels der Proteinqualitätskontrolle die Frequenz von biosynthetischen Fehlern, welche zu falsch gefalteten Proteinen führen, registriert und daraufhin die Kompetenzinhibition reduziert. Die Erkennung des Substrats läuft hierbei über die Exposition ungeordneter hydrophober Bereiche, die sich normalerweise im Innern eines Proteins befinden (Kolmar *et al.*, 1996). Des Weiteren konnte eine Präferenz für nicht-polare Reste nachgewiesen werden (Cassone *et al.*, 2012). In einem Serotyp 6A-

S. pneumoniae-Stamm wurde ein negativer Einfluss von HtrA auf die Produktion des Zwei-Peptid-Bacteriocins Pneumocin MN beobachtet (Dawid *et al.*, 2009). Die Expression der Gene dieses Bacteriocins (*blpMN*) wird von einem Zwei-Komponenten System reguliert, welches durch das Peptidpheromon BlpC stimuliert wird. Ein Abbau von BlpC durch HtrA wurde als mögliche Ursache für den Einfluss von HtrA auf Pneumocin MN diskutiert. Allerdings konnte in einer neueren Studie gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen HtrA-vermittelte Störung der Peptid Synthese und Sekretion von Pneumocin MN handelt (Kochan & Dawid, 2013). In den pathogenen *S. pneumoniae*-Stämmen D39 und TIGR4 führt die Deletion von *htrA* zu einem kompletten Verlust der Virulenz in D39 und einer starken Reduktion der Virulenz in TIGR4 (Ibrahim *et al.*, 2004a; Ibrahim *et al.*, 2004b). Hierbei kommt es ebenfalls zu einem deutlich verlangsamten Wachstum dieser Stämme bei höheren Temperaturen (40°C) und einer geringeren Widerstandsfähigkeit gegen oxidativen Stress.

Auch in anderen Bakterien konnten Substrate der HtrA-Proteasen identifiziert werden. In *S. pyogenes* gibt es Hinweise dafür, dass HtrA an der Prozessierung der Virulenzfaktoren SpeB und Streptolysin S (SLS) beteiligt ist (Lyon & Caparon, 2004). Allerdings konnte durch weitere Studien gezeigt werden, dass der Effekt auf die Cystein-Protease SpeB nur indirekt ist (Cole *et al.*, 2007).

In *E. coli* wird das Colicin A Lyseprotein, sowie die α -Amylase MalS durch DegP neu gefaltet oder abgebaut (Cavard *et al.*, 1989; Spiess *et al.*, 1999).

In *Lactococcus lactis*, einem Milchsäurebakterium hat HtrA eine prozessierende Funktion bei einigen exportierten Proteinen. Die Muramidase AcmA wird durch HtrA in zwei kleinere aktive Formen gespalten, die zwar nach wie vor die Zellwand anderer Bakterien degradieren können, aber nicht mehr die von *L. lactis* selbst. HtrA von *L. lactis* ist ebenfalls in der Lage, das Pro-Peptid der Nuclease NucA von *Staphylococcus aureus* abzuspalten (Poquet *et al.*, 2000).

2.8 β -Laktamresistenz in *S. pneumoniae*

β -Laktamantibiotika wie z.B. Penicillin sind als Therapeutikum bei der Bekämpfung pathogener Bakterien weit verbreitet. In den letzten Jahrzehnten entwickelten sich jedoch in vielen Bakterien, darunter auch in Pneumokokken, vielfältige Resistenzmechanismen, die die Wirksamkeit der Antibiotika verringern oder aufheben. Die ersten in *S. pneumoniae* identifizierten Mutationen, die zu einer erhöhten Resistenz führten, waren Mutationen in den Targets der β -Laktamantibiotika den Penicillin-bindenden Proteinen (PBPs) (Laible und Hakenbeck, 1987).

PBPs sind Enzyme der Zellwandsynthese. Durch ihre Transpeptidase- und Transglycosylaseaktivität verknüpfen sie die Untereinheiten des Peptidoglykans und bewirken dadurch eine Vernetzung, die die Stabilität der Zellwand garantiert. Da β -Laktamantibiotika ein Strukturanalogen des natürlichen Substrats, dem D-Alanin-D-Alanylrest der Pentapeptidkette der Peptidoglykanuntereinheiten sind, binden diese ebenfalls kovalent an das katalytisch aktive Serin der PBPs. Hierdurch wird die Transpeptidierung der Mureinstränge unterbunden. Durch die fehlende Quervernetzung kommt es zur

Instabilität der Zellhülle, was letztlich zur Lyse führen kann (Tipper & Strominger, 1965). *S. pneumoniae* besitzt sechs verschiedene PBPs, die bezüglich ihres Molekulargewichts und ihren enzymatischen Aufgaben unterschieden werden.

Neben der PBP-vermittelten β -Laktam-Resistenz wurden in *S. pneumoniae*-Stämmen PBP-unabhängige Mechanismen der β -Laktam-Resistenz beschrieben (Hakenbeck *et al.*, 1999). Mutationen in den Genen *ciaH* und *cpoA* führen zu einer erhöhten Resistenz gegen β -Lactame und gleichzeitig zu einer Reduktion der natürlichen Kompetenz (Guenzi *et al.*, 1994; Grebe *et al.*, 1997; Mascher *et al.*, 2006). Die Mutationen in der Glycosyltransferase CpoA, welche mit Piperacillin selektioniert wurden, resultierten zusätzlich in einer Reduktion der PBP1a-Menge. Daher auch der Name *cpoA*, für „regulator of competence and PonA“, wobei *ponA* die ältere Bezeichnung von *pbp1a* ist. Veränderungen in der Histidinkinase CiaH des Zwei-Komponenten Systems CiaRH (siehe 2.4) konnten mithilfe von Cefotaxim und Piperacillin selektioniert werden.

Vor kurzem konnte die Aminosäure-Ligase MurE, welche an der Peptidoglykanbiosynthese beteiligt ist, als neue Resistenzdeterminante identifiziert werden (Todorova, 2010). Das Enzym MurM, welches die Anheftung der ersten Aminosäure der Interpeptidbrücke katalysiert, ist als einzige Nicht-PBP-Resistenzdeterminante in klinischen Isolaten bekannt (Filipe *et al.*, 2002; Smith & Klugman, 2001). *MurM* befindet sich in einem Operon mit *murN*. Beide Genprodukte sind an der Zellwandbiosynthese beteiligt, wo sie die Quervernetzung der Peptidketten katalysieren. In hochresistenten *S. pneumoniae*-Stämmen führt die Inaktivierung des *murMN*-Operons zu einer Reduktion der verzweigten Muropeptide und zu einem Verlust der Penicillin-Resistenz (Filipe *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2000)

In einigen klinischen Isolaten wurden Mosaik-*MurM*-Gene identifiziert und deren Beitrag zur Entwicklung der Penicillin-Resistenz untersucht (Filipe *et al.*, 2002; Smith & Klugman, 2001; Weber *et al.*, 2000). Trotz der Anwesenheit niedrig-affiner PBPs führt die Deletion von *murM* zu einem sensitiven Phänotyp (Weber *et al.*, 2000; Filipe *et al.*, 2002).

Innerhalb einer Proteomanalyse Penicillin resistenter *S. pneumoniae* Stämmen konnte das Gen *pstS* identifiziert werden. Die Inaktivierung von *pstS*, welches für eine Untereinheit des Phosphat-ABC-Transporters kodiert, führte zu einer Erhöhung der Penicillin Suszeptibilität (Soualhine *et al.*, 2005).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Sekundäremutationen, die die Toleranz für Oxidanzien erhöhen, die Ausbildung von primären Mutation (PBPs) fördern (Fani *et al.*, 2011). Auch Mutationen in den Genen *pgdA*, *amiE* und *srtA*, welche für eine Peptidoglykan-N-Acetylglucosamin Deacetylase, einen ABC-Transporter und eine Sortase kodieren, wurden mit der Resistenz gegen das Cephalosporin Cefotaxime in Verbindung gebracht (Fani *et al.*, 2013). Generell lässt sich anmerken, dass die meisten Gene, welche mit der Resistenz gegen β -Lactame in Verbindung stehen, für Enzyme kodieren, die entweder direkt an der Peptidoglykanbiosynthese oder an Vorläuferprozessen beteiligt sind.

2.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Das CiaRH System wurde als erstes Zwei-Komponenten System und erste nicht PBP-Resistenzdeterminante im Zuge einer Charakterisierung von Labormutanten von *S. pneumoniae* R6 identifiziert (Guenzi *et al.*, 1994). Bei CiaRH handelt es sich um einen pleiotropen Regulator, der mit vielen Phänotypen in *S. pneumoniae* in Verbindung gebracht wird. Eine Hyperaktivierung des CiaRH Systems, welche durch Mutationen in der Histidinkinase *ciaH* vermittelt wird (Müller *et al.*, 2011), führt zu einem zur Blockierung der natürlichen Kompetenz (Guenzi *et al.*, 1994; Zähler *et al.*, 1996; Giammarinaro *et al.*, 1999; Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Peterson *et al.*, 2004; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Sebert *et al.*, 2005) und zum anderen zur Erhöhung der β -Laktamresistenz (Guenzi *et al.*, 1994; Zähler *et al.*, 2002), wodurch auch der Name Cia (competence induction and altered cefotaxim susceptibility) geprägt ist.

Über das CiaR Bindemotiv konnten bisher 15 Promotoren identifiziert werden, deren Expression von CiaR reguliert wird. Die 5 stärksten, strikt von CiaR regulierten Promotoren steuern die Expression von kleinen, nicht kodierenden, regulatorischen RNAs (csRNAs = „cia-dependent small RNAs“) (Halfmann *et al.*, 2007b). Kleine regulatorische RNAs sind die größte bekannte Klasse post-transkriptioneller Regulatoren in Bakterien. Ihr Regulationsmechanismus erlaubt es Bakterien ihre Physiologie an sich verändernde Umweltbedingungen anzupassen (Waters & Storz, 2009; Brantl, 2009; Storz *et al.*, 2011).

Dass die csRNAs unter anderem eine bedeutende Rolle in der Kompetenzentwicklung und der Cefotaxim Suszeptibilität in *S. pneumoniae* spielen, konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Müller, 2011; Tsui *et al.*, 2010). So führt eine Deletion aller csRNAs in einem hyperaktiven CiaRH genetischen Hintergrund zu einem vollständigen Verlust dieser CiaRH vermittelten Phänotypen (Müller, 2011). Im Zuge dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, ob diese Effekte additiv durch alle csRNAs vermittelt werden, oder eventuell eine bestimmte csRNA für die Vermittlung eines Phänotyps verantwortlich ist. Hierzu werden die csRNAs einzeln, mithilfe von Plasmiden, in den Wildtyps *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$ und in den Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* $\Delta ccnA-E$, der das hyperaktive *ciaH202*-Allel trägt, eingebracht. In diesen Stämmen soll anschließend die β -Laktamresistenz und Kompetenzentwicklung innerhalb unterschiedlicher Bedingungen analysiert werden.

Für ein weiteres CiaR-reguliertes Gen, die Serinprotease HtrA konnte ebenfalls ein Effekt auf die β -Laktamresistenz und die Kompetenzentwicklung in *S. pneumoniae* nachgewiesen werden (Ibrahim *et al.*, 2004b; Sebert *et al.*, 2005; Müller, 2011).

Im Gegensatz zu den csRNAs zeigt ist der Effekt einer *htrA* Deletion auf die β -Laktamresistenz lediglich im Wildtyp Hintergrund. Es wird vermutet, dass dieser Effekt durch die Aktivierung des

CiaRH Systems durch die *htrA* Deletion ausgelöst wird. Die im Wildtyp erhöhte Resistenz bei Abwesenheit von HtrA würde daher auf andere CiaR-regulierte Gene zurückgehen, vermutlich auf die csRNAs.

Auch konnte die Serinprotease HtrA schon früh, wie die csRNAs, mit der Kompetenzentwicklung in *S. pneumoniae* in Verbindung gebracht werden (Sebert *et al.*, 2002). Wegen der Lokalisation an der Zelloberfläche wurde ein protolytischer Abbau der Histidinkinase ComD diskutiert, welcher aber nicht bestätigt wurde (Sebert *et al.*, 2005). Tatsächlich konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass das extrazelluläre Kompetenz stimulierende Peptid CSP durch HtrA abgebaut wird und darüber der negativ Effekt auf die Kompetenzentwicklung vermittelt wird (Cassone *et al.*, 2012).

Da auf beide in dieser Arbeit untersuchten Phänotypen die csRNAs sowie die Serinprotease *htrA* einen Effekt ausüben, sollte auch die Auswirkung einer Kombination aus einer *htrA* Deletion mit einzelnen csRNAs genauer untersucht werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit soll die Suche nach B-Laktamresistenz- und Kompetenz-spezifischen Zielgenen der csRNAs vorangetrieben werden.

Aufgrund ihres Aufbaus mit Anti-Shine-Dalgarno Sequenz und Anti-AUG ist es naheliegend, dass die csRNAs post-transkriptionell die Regulation ihrer Zielgene negativ beeinflussen und darüber die unterschiedlichen Phänotypen bedingen. Einige Zielgene der csRNAs konnten bereits identifiziert werden (Schnorpfeil *et al.*, 2013). Hierbei handelt es sich um 4 Transporter und ein Protein mit DNA-Bindedomäne. Allerdings konnte keines dieser Zielgene mit der β -Laktamresistenz oder Kompetenz in Verbindung gebracht werden. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit potenzielle Zielgene der csRNAs, welche in Verbindung mit der β -Laktamresistenz und der Kompetenz stehen könnten,

mittels bioinformatischen- und Microarray- Analysen identifiziert werden. Um eine post-transkriptionelle Regulation der potenziellen Zielgene nachzuweisen, sollten *lacZ*-Translationsfusionen angefertigt und deren Aktivität mittels β -Galaktosidaseassays bestimmt werden.

In Bezug auf den Kompetenzphänotyp konnte bereits ein negativer Effekt der csRNA1 beobachtet werden, allerdings konnte *comC*, obwohl es Hinweise darauf gibt (Kovács, 2009; Tsui *et al.*, 2010), nicht eindeutig als Zielgen der csRNA1 verifiziert werden (Tsui *et al.*, 2010). Um eine mögliche Bindung der csRNAs an die *comC* mRNA zu untersuchen sollten zum einen Veränderungen in die mRNA eingebracht werden, welche die Hybridisierung an die csRNAs beeinträchtigen. Der Effekt dieser Veränderungen auf die post-transkriptionelle Regulation der *comC* mRNA sollte ebenfalls mithilfe von *lacZ*-Translationsfusionen untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

In Tabelle 3.1 bzw. Tabelle 3.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsstämme sowie die daraus hergestellten *Streptococcus pneumoniae* bzw. *Escherichia coli* Stämme aufgeführt.

Tabelle 3. 1: Die in dieser Arbeit verwendeten *Streptococcus pneumoniae* Stämme

<i>RKL-Nummer</i>	<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Referenz</i>
	<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44, Δ(lac)U169, (Φ80 lacZΔM15), endA1, gyrA46, hsdR17, recA1, relA1, thi-1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6 R6 <i>ciaR::aad9</i>	wildtyp, kapselfrei, kompetent <i>ciaR::aad9, Spc^R</i>	Ottolenghi & Hotchkiss, 1962 Mascher <i>et al.</i> , 2003
RKL242	R6 <i>ciaH::aad9</i>	<i>ciaH::aad9, Spc^R</i>	Zähner, 1999
RKL162	R6 <i>htrA::aphIII</i>	<i>htrA::aphIII, Kan^R</i>	Schäfer, 2007
RKL341	R6 Strep ^R R6 <i>ciaH202</i> Strep	<i>rpsL41</i> <i>ciaH C706A G1237A, Sm^R</i>	Salles <i>et al.</i> , 1992 Müller <i>et al.</i> , 2011
	R6 <i>ciaH202</i> $\Delta ccnCDEAB$ (Cheshire-KO)	RKL229, <i>ciaH C706A G1237A, Sm^R</i> R	Müller, 2011
RKL192	R6 <i>ciaH202 htrA::aphIII</i> Strep ^R	RKL162, <i>htrA::aphIII</i>	Müller, 2011
RKL508	R6 pPP2 <i>comX</i>	<i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>	Kaysen, 2012
RKL509	RKL229, pPP2 <i>comX</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72; \Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72$ <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>	Kaysen, 2012
RKL362	R6 <i>htrA::ahpIII</i> $\Delta ccnCDEAB$ (Cheshire-KO)	RKL229, <i>htrA::aphIII</i> ,	Müller, 2011
RKL86	R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>vegM</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{vegM}-lacZ</i>	Halfmann 2008
RKL43	R6 PP2 <i>htrA</i>	<i>bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>	Halfmann 2008
RKL86	R6 <i>ciaH::aad9</i> PP2 <i>htrA</i>	<i>ciaH::aad9, Spc^R</i> <i>bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ</i>	Halfmann 2008
RKL507	R6 pTP3-P _{vegT3} - <i>comC</i>	R6 <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC''lacZ;</i>	Kaysen, 2011
RKL559	R6 <i>ciaH::aad9;</i> pTEX <i>ciaH202;</i> PP2 <i>htrA</i>	<i>ciaH::aad9, bgaA::tetM-P_{htrA}-lacZ; bgaA tmp-P_{tet}-ciaH202-spr0568</i>	Huber, 2012
RKL123	R6 pTP3-P _{vegT} - <i>comC</i> R6 <i>ciaH::janus</i>	<i>bgaA::tetM-P_{vegT}-comC''lacZ</i> R6 <i>ciaH::janus; Sm^S, Kan^R</i>	Kovács, 2009 Schmitt, 2006

Tabelle 3.2: In dieser Arbeit hergestellten *S. pneumoniae* Stämme

<i>RKL-Nummer</i>	<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>
-------------------	--------------	----------------

RKL229	R6 34512 ($\Delta ccnCDEAB$; Cheshire-Ko)	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72$
RKL326	R6 <i>comC-M</i>	<i>bgaA::tetM-T4comC-met-lacZ</i>
RKL327	RKL229 <i>comC-M</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72,$ <i>bgaA::tetM-T4comC-met-lacZ</i>
RKL328	R6 <i>comC8</i>	<i>bgaA::tetM-T4comC-lmut1-lacZ</i>
RKL329	RKL229 <i>comC8</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72,$ <i>bgaA::tetM-T4comC-l-mut1-lacZ</i>
RKL330	RKL162 <i>comC</i>	<i>ciaH C706A G1237A, Str^R</i> <i>,bgaA::tetM-T4comC-lacZ</i>
RKL331	RKL162 <i>comC8</i>	<i>ciaH C706A G1237A, Str^R</i> <i>,bgaA::tetM-T4comC-lmut1-lacZ</i>
RKL332	R6 <i>comC13</i>	<i>bgaA::tetM-T4comC-lmut2-lacZ</i>
RKL333	R6 <i>comC-L</i>	<i>bgaA::tetM-T4comC-stem-loop1-lacZ</i>
RKL334	RKL229 <i>comC-L</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72,$ <i>bgaA::tetM-T4comC-stem-loop1-lacZ</i>
RKL335	RKL229 p <i>CcnA</i> ;	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72,$ <i>bgaA tmp-ccnA-spr0568</i>
RKL336	RKL229 p <i>CcnB</i> ;	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72,$ <i>bgaA tmp-ccnB-spr0568</i>
RKL337	RKL229 p <i>CcnC</i> ;	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72,$ <i>bgaA tmp-ccnC-spr0568</i>
RKL338	RKL229 p <i>CcnD</i> ;	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72,$ <i>bgaA tmp-ccnD-spr0568</i>
RKL339	RKL229 p <i>CcnE</i> ;	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72,$ <i>bgaA tmp-ccnE-spr0568</i>
RKL712	RKL229 ($\Delta ccnCDEAB$; Cheshire-Ko) T3 <i>comC</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72$ <i>bgaA::tetM-T3comC-lacZ</i>
RKL342	RKL341 p <i>CcnA</i> (RK34512 <i>ciaH202</i>) p <i>CcnA</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72$ <i>ciaH C706A G1237A, Str^R</i> <i>bgaA'' : tmp-pccnA-'spr0568</i>
RKL343	RKL341 p <i>CcnB</i> (RK34512 <i>ciaH202</i>) p <i>CcnB</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72$ <i>ciaH C706A G1237A, Str^R</i> <i>bgaA'' : tmp-pccnB-'spr0568</i>
RKL344	RKL341 p <i>CcnC</i> (RK34512 <i>ciaH202</i>) p <i>CcnC</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72$ <i>ciaH C706A G1237A, Str^R</i> <i>bgaA'' : tmp-pccnC-'spr0568</i>
RKL345	RKL341 p <i>CcnE</i> (RK34512 <i>ciaH202</i>) p <i>CcnE</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72;$ $\Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72$ <i>ciaH C706A G1237A, Str^R</i>

RKL346	RKL162(R6 <i>ciaH</i> ^{C202}) <i>comC::janus</i>	<i>bgaA''</i> : <i>tmp-pccnE</i> -spr0568 <i>ciaH</i> C706A G1237A, Januskassette in <i>comC</i> , Str ^S , Kan ^R
RKL347	RKL162(R6 ^{<i>ciaHC202</i>}) <i>comC8</i>	<i>ciaH</i> C706A G1237A, <i>comC::comC-l-mut1</i> , Str ^R
RKL554	RKL347 <i>ciaH::janus</i>	<i>comC::comC-l-mut1</i> , Januskassette in <i>ciaH</i>
RKL555	RKL554 <i>ciaRH</i> wt	<i>comC::comC-l-mut1</i> , <i>ciaH</i> wt (R6)
RKL556	RKL555 pPP2 <i>comX</i>	<i>comC::comC-l-mut1</i> , <i>bgaA::tetM-comX'-lacZ</i>
RKL626	RKL342 R6 <i>ciaH</i> ^{C202} <i>htrA::ahpIII</i> 34512 (Δ <i>ccnCDEAB</i> ; Cheshire-KO) p <i>CcnA</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>htrA::ahpIII</i> <i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA''</i> : <i>tmp-pccnA</i> -spr056
RKL627	RKL343 R6 <i>ciaH202</i> <i>htrA::ahpIII</i> 34512 (Δ <i>ccnCDEAB</i> ; Cheshire-KO) p <i>CcnB</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>htrA::ahpIII</i> <i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA''</i> : <i>tmp-pccnA</i> -spr056
RKL628	RKL344 R6 <i>ciaH202</i> <i>htrA::ahpIII</i> 34512 (Δ <i>ccnCDEAB</i> ; Cheshire-KO) p <i>CcnC</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>htrA::ahpIII</i> <i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA''</i> : <i>tmp-pccnB</i> -spr056
RKL629	RKL631 R6 <i>ciaH202</i> <i>htrA::ahpIII</i> 34512 (Δ <i>ccnCDEAB</i> ; Cheshire-KO) p <i>CcnD</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>htrA::ahpIII</i> <i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA''</i> : <i>tmp-pccnC</i> -spr056
RKL630	RKL351 R6 <i>ciaH202</i> <i>htrA::ahpIII</i> 34512 (Δ <i>ccnCDEAB</i> ; Cheshire-KO) p <i>CcnE</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>htrA::ahpIII</i> <i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA''</i> : <i>tmp-pccnD</i> -spr056
RKL631	RKL341 (RK34512 <i>ciaH202</i>) p <i>CcnD</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA''</i> : <i>tmp-pccnE</i> -spr056
RKL632	RKL631 (RK34512 <i>ciaH202</i>) p <i>CcnD</i> T3 <i>comC</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA''</i> : <i>tmp-pccnD</i> -spr0568 <i>bgaA::tetM-T3comC-lacZ</i>
RKL633	RKL345 (RK34512 <i>ciaH202</i>) p <i>CcnE</i> T3 <i>comC</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA''</i> : <i>tmp-pccnC</i> -spr0568 <i>bgaA::tetM-T3comC-lacZ</i>
RKL634	RKL631 p <i>CcnD</i> : <i>ery</i> (RK34512 <i>ciaH202</i>) p <i>CcnD</i> : <i>ery</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA''</i> : - <i>ermAB</i> -spr0568

RKL635	RKL634 <i>ery::pCcnB</i> (RK34512 <i>ciaH202</i>) <i>ery::pCcnB</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$ <i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA</i> '' :- <i>tmp-pccnB</i> -spr0568
RKL665	RKL162 T3 <i>comC</i>	<i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC-lacZ</i>
RKL666	RKL341 T3 <i>comC</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$ <i>ciaH</i> C706A G1237A, Str ^R <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC-lacZ</i>
RKL667	RKL335 T3 <i>comC</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA tmp-ccnA-spr0568</i> <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC-lacZ</i>
RKL668	RKL336 T3 <i>comC</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA tmp-ccnB-spr0568</i> <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC-lacZ</i>
RKL669	RKL337 T3 <i>comC</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA tmp-ccnC-spr0568</i> <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC-lacZ</i>
RKL670	RKL338 T3 <i>comC</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA tmp-ccnD-spr0568</i> <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC-lacZ</i>
RKL671	RKL339 T3 <i>comC</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA tmp-ccnE-spr0568</i> <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC-lacZ</i>
RKL672	RKL229 p <i>VccnA</i> ;	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA tmp-vegT3-ccnA-spr0568</i>
RKL673	RKL229 p <i>VccnB</i> ;	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA tmp-vegT3-ccnB-spr0568</i>
RKL674	RKL229 p <i>VccnC</i> ;	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$ $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA tmp-vegT3-ccnC-spr0568</i>
RKL675	RKL229 p <i>VccnD</i> ;	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA tmp-vegT3-ccnD-spr0568</i>
RKL676	RKL229 p <i>VccnE</i> ;	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA tmp-vegT3-ccnE-spr0568</i>
RKL677	R6 <i>htrA::aphIII pPP2comX</i>	<i>htrA::aphIII</i> <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL679	RKL362 pPP2 <i>comX</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL680	R6 $\Delta 2345$	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$, $\Delta ccnB::ermAM$
RKL681	R6 $\Delta 1345$	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$, $\Delta ccnA::ermAM$
RKL682	R6 $\Delta 1245$	$\Delta ccnD::lox72$;

RKL683	R6 Δ1235	<i>ΔccnE::lox72, ΔccnAB::lox72</i> <i>ΔccnC::lox72, ΔccnE::lox72;</i> <i>ΔccnAB::lox72</i>
RKL684	R6 Δ1234	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnAB::lox72</i>
RKL685	R6 Δ123	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnAB::lox72</i>
RKL686	R6 Δ345	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnE::lox72</i>
RKL687	R6 Δ45	<i>ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72</i>
RKL688	RKL680 <i>ΔhtrA</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnE::lox72, ΔccnB::ermAM,</i> <i>htrA::aphIII</i>
RKL689	RKL681 <i>ΔhtrA</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnE::lox72, ΔccnA::ermAM,</i> <i>htrA::aphIII</i>
RKL690	RKL682 <i>ΔhtrA</i>	<i>ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72,</i> <i>ΔccnAB::lox72, htrA::aphIII</i>
RKL691	RKL683 <i>ΔhtrA</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnE::lox72;</i> <i>ΔccnAB::lox72, htrA::aphIII</i>
RKL692	RKL684 <i>ΔhtrA</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnAB::lox72, htrA::aphIII</i>
RKL693	RKL685 <i>ΔhtrA</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnAB::lox72;</i> <i>htrA::aphIII</i>
RKL694	RKL686 <i>ΔhtrA</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnE::lox72, htrA::aphIII</i>
RKL695	RKL687 <i>ΔhtrA</i>	<i>ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72,</i> <i>htrA::aphIII</i>
RKL696	RKL680 pPP2 <i>comX</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnE::lox72 ΔccnB::ermAM,</i> <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL697	RKL681 pPP2 <i>comX</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnE::lox72, ΔccnA::ermAM,</i> <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL698	RKL682 pPP2 <i>comX</i>	<i>ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72,</i> <i>ΔccnAB::lox72, bgaA::tetM-</i> <i>P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL699	RKL683 pPP2 <i>comX</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnE::lox72;</i> <i>ΔccnAB::lox72, bgaA::tetM-</i> <i>P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL700	RKL684 pPP2 <i>comX</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnAB::lox72, bgaA::tetM-</i> <i>P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL701	RKL685 pPP2 <i>comX</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnAB::lox72</i> <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL702	RKL686 pPP2 <i>comX</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnE::lox72, bgaA::tetM-</i> <i>P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL703	RKL687 pPP2 <i>comX</i>	<i>ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72,</i> <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL704	RKL688 pPP2 <i>comX</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnE::lox72, ΔccnB::ermAM,</i> <i>htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX}-</i> <i>comX''lacZ</i>
RKL705	RKL689 pPP2 <i>comX</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72;</i> <i>ΔccnE::lox72, ΔccnA::ermAM,</i> <i>htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX}-</i>

RKL706	RKL690 pPP2 <i>comX</i>	<i>comX''lacZ</i> $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$, $\Delta ccnAB::lox72$, <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL707	RKL691 pPP2 <i>comX</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL708	RKL692 pPP2 <i>comX</i>	$\Delta ccnC::lox72$, <i>ccnD::lox72</i> ; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL709	RKL693 pPP2 <i>comX</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL710	RKL694 pPP2 <i>comX</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$, <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i>
RKL711	RKL695 pPP2 <i>comX</i>	$\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$, <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{comX}-</i> <i>comX''lacZ</i>
RKL713	RKL696 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$ $\Delta ccnB::ermAM$, <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i> , <i>ciaH::aad9</i> , <i>Spc^R</i>
RKL714	RKL697 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$, $\Delta ccnA::ermAM$, <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i> , <i>ciaH::aad9</i> , <i>Spc^R</i>
RKL715	RKL698 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$, $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA::tetM-</i> <i>P_{comX}-comX''lacZ</i> , <i>ciaH::aad9</i> , <i>Spc^R</i>
RKL716	RKL699 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnE::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA::tetM-</i> <i>P_{comX}-comX''lacZ</i> , <i>ciaH::aad9</i> , <i>Spc^R</i>
RKL717	RKL700 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnAB::lox72$, <i>bgaA::tetM-</i> <i>P_{comX}-comX''lacZ</i> , <i>ciaH::aad9</i> , <i>Spc^R</i>
RKL718	RKL701 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnAB::lox72$ <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i> , <i>ciaH::aad9</i> , <i>Spc^R</i>
RKL719	RKL702 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$, <i>bgaA::tetM-</i> <i>P_{comX}-comX''lacZ</i> , <i>ciaH::aad9</i> , <i>Spc^R</i>
RKL720	RKL703 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$, <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i> , <i>ciaH::aad9</i> , <i>Spc^R</i>
RKL721	RKL704 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$, $\Delta ccnB::ermAM$, <i>htrA::aphIII</i> <i>bgaA::tetM-P_{comX}-</i> <i>comX''lacZ</i> , <i>ciaH::aad9</i> , <i>Spc^R</i>
RKL722	RKL705 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72$, $\Delta ccnD::lox72$; $\Delta ccnE::lox72$, $\Delta ccnA::ermAM$, <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{comX}-</i> <i>comX''lacZ</i> , <i>ciaH::aad9</i> , <i>Spc^R</i>

RKL723	RKL706 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnD::lox72; \Delta ccnE::lox72, \Delta ccnAB::lox72, htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R$
RKL724	RKL707 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72, htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R$
RKL725	RKL708 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72, ccnD::lox72; \Delta ccnAB::lox72, htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R$
RKL726	RKL709 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnAB::lox72, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R$
RKL727	RKL710 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72; \Delta ccnE::lox72, htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R$
RKL728	RKL711 <i>ciaH::aad9</i>	$\Delta ccnD::lox72; \Delta ccnE::lox72, htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R$
RKL729	RKL713 pTEX <i>ciaH202</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72; \Delta ccnE::lox72 \Delta ccnB::ermAM, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet-ciaH202} -spr0568$
RKL730	RKL714 pTEX <i>ciaH202</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72; \Delta ccnE::lox72, \Delta ccnA::ermAM, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet-ciaH202} -spr0568$
RKL731	RKL715 pTEX <i>ciaH202</i>	$\Delta ccnD::lox72; \Delta ccnE::lox72, \Delta ccnAB::lox72, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet-ciaH202} -spr0568$
RKL732	RKL716 pTEX <i>ciaH202</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnE::lox72; \Delta ccnAB::lox72, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet-ciaH202} -spr0568$
RKL733	RKL717 pTEX <i>ciaH202</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72; \Delta ccnAB::lox72, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet-ciaH202} -spr0568$
RKL734	RKL718 pTEX <i>ciaH202</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnAB::lox72 bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet-ciaH202} -spr0568$
RKL735	RKL719 pTEX <i>ciaH202</i>	$\Delta ccnC::lox72, \Delta ccnD::lox72; \Delta ccnE::lox72, bgaA::tetM-P_{comX-comX''lacZ}, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet-ciaH202} -spr0568$

RKL736	RKL720 pTEX <i>ciaH202</i>	<i>ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72, bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet}-ciaH202 -spr0568</i>
RKL737	RKL721 pTEX <i>ciaH202</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72, ΔccnB::ermAM, htrA::aphIII bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet}-ciaH202 -spr0568</i>
RKL738	RKL722 pTEX <i>ciaH202</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72, ΔccnA::ermAM, htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet}-ciaH202 -spr0568</i>
RKL739	RKL723 pTEX <i>ciaH202</i>	<i>ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72, ΔccnAB::lox72, htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet}-ciaH202 -spr0568</i>
RKL740	RKL724 pTEX <i>ciaH202</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnE::lox72; ΔccnAB::lox72, htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet}-ciaH202 -spr0568</i>
RKL741	RKL725 pTEX <i>ciaH202</i>	<i>ΔccnC::lox72, ccnD::lox72; ΔccnAB::lox72, htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet}-ciaH202 -spr0568</i>
RKL742	RKL726 pTEX <i>ciaH202</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnAB::lox72, bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet}-ciaH202 -spr0568</i>
RKL743	RKL727 pTEX <i>ciaH202</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72, htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet}-ciaH202 -spr0568</i>
RKL744	RKL728 pTEX <i>ciaH202</i>	<i>ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72, htrA::aphIII, bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ, ciaH::aad9, Spc^R, bgaA tmp-P_{tet}-ciaH202 -spr0568</i>
RKL745	RKL229 <i>comC::janus</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72; ΔccnAB::lox72, Januskassette in comC, Str^S, Kan^R</i>
RKL746	RKL745 <i>comC::comC8</i>	<i>ΔccnC::lox72, ΔccnD::lox72; ΔccnE::lox72; ΔccnAB::lox72, comC::comC-l-mut1</i>
RKL747	RKL554 $\Delta 4$	<i>comC::comC-l-mut1, 'bgaA::tetM-comX'-lacZ, ΔccnD::lox72</i>
RKL748	RKL747 pSW1- <i>CcnD-c8c</i>	<i>comC::comC-l-mut1, 'bgaA::tetM-comX'-lacZ, ΔccnD::lox72, tmp-pccnD-c8c-'spr056</i>

RKL749	RKL554 pSW1- <i>CcnD</i> -c8c	<i>comC::comC-l-mut1</i> , <i>'bga::tetM-comX'-lacZ</i> , , <i>tmp-pccnD-c8c-'spr056</i>
RKL750	RKL746 pPP2 <i>comX</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> , <i>comC::comC-l-mut1</i> , <i>'bga::tetM-comX'-lacZ</i>
RKL751	RKL750 pSW1- <i>CcnD</i> -c8c	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> , <i>comC::comC-l-mut1</i> , , <i>tmp-pccnD-c8c-'spr056</i>
RKL752	RKL 679 pSW1- <i>CcnD</i> -AA	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> , <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i> , , <i>tmp-pccnD-AA-'spr056</i>
RKL753	RKL 679 pSW1-PM1- <i>CcnA</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> , <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{comX}-comX''lacZ</i> , , <i>tmp-PM1-ccnA-'spr056</i>
RKL754	RKL688 pPP2 <i>cib</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> , Δ <i>ccnB::ermAM</i> , <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{cib}-cib''lacZ</i>
RKL755	RKL688 pPP2 <i>comC</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> , Δ <i>ccnB::ermAM</i> , <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{comC}-comC''lacZ</i>
RKL756	RKL692 pPP2 <i>cib</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> , <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{cib}-cib''lacZ</i>
RKL757	RKL692 pPP2 <i>comC</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> , <i>htrA::aphIII</i> , <i>bgaA::tetM-P_{comC}-comC''lacZ</i>
RKL762	RKL229 pTP3-P _{vegT3} - <i>comC</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC''lacZ</i> ,
RKL763	RKL762 p <i>VccnA</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC''lacZ</i> , <i>bgaA tmp-vegT3-ccnA-spr0568</i>
RKL764	RKL762 p <i>VccnB</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC''lacZ</i> , <i>bgaA tmp-vegT3-ccnB-spr0568</i>
RKL765	RKL762 p <i>VccnC</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC''lacZ</i> , <i>bgaA tmp-vegT3-ccnC-spr0568</i>
RKL766	RKL762 p <i>VccnD</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC''lacZ</i> , <i>bgaA tmp-vegT3-ccnD-spr0568</i>
RKL767	RKL762 p <i>VccnE</i>	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i>

RKL768	RKL229 pTP3-P _{vegT3} -comC	<i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC''lacZ</i> , <i>bgaA tmp-vegT3-ccnE-spr0568</i> Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i>
RKL769	RKL750 pCcnE	<i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC''lacZ</i> , Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> , <i>comC::comC-l-mut1</i> , <i>'bgaA::tetM-comX'-lacZ</i> ; <i>bgaA</i> <i>tmp-ccnE-spr0568</i>
RKL770	R6 pTP3-P _{vegT3} -comC8	R6 <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-</i> <i>comC8''lacZ</i> ;
RKL771	R6 pTP3-P _{vegT3} -comC8, <i>ccnD-C8c</i>	R6 <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-</i> <i>comC8''lacZ</i> ; <i>ccnD-C8c</i>
RKL772	RKL507 pSW1-CcnD-AA	R6 <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-</i> <i>comC''lacZ</i> ; <i>tmp-pccnD-AA-</i> <i>'spr056</i>
RKL773	RKL762 pSW1-CcnD-AA	Δ <i>ccnC::lox72</i> , Δ <i>ccnD::lox72</i> ; Δ <i>ccnE::lox72</i> ; Δ <i>ccnAB::lox72</i> <i>bgaA::tetM-P_{vegT3}-comC''lacZ</i> , <i>tmp-pccnD-AA-'spr056</i>

3.1.2 Plasmide

Tabelle 3.3 enthält die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit den jeweiligen Selektionsbedingungen. Alle Plasmide sind in *Escherichia coli* replikativ und in *Streptococcus pneumoniae* integrativ.

Tabelle 3.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Selektionsbedingung</i>	<i>Referenz</i>
pTP3 <i>comC</i>	pTP3 Derivat; besitzt <i>comC</i> -translations- <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Kovás, 2009
pTP4 <i>comC</i> -M	pTP3 Derivat; besitzt <i>comC</i> -M-translations- <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Diese Arbeit
pTP4 <i>comC</i> 8	pTP3 Derivat; besitzt <i>comC</i> 8-translations- <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Diese Arbeit
pTP4 <i>comC</i> 13	pTP3 Derivat; besitzt <i>comC</i> 13-translations- <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Diese Arbeit
pTP4 <i>comC</i> -L	pTP3 Derivat; besitzt <i>comC</i> -L-translations- <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Diese Arbeit
pPP2 <i>comX</i>	pPP2 Derivat; <i>PcomX-lacZ</i> fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracycline	Kaysen, 2012

pCcnA	Derivat von pSW1, in welches <i>ccnA</i> eingebracht wurde	3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i> Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Brunner, 2010
pCcnB	Derivat von pSW1, in welches <i>ccnB</i> eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Brunner, 2010
pCcnC	Derivat von pSW1, in welches <i>ccnC</i> eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Brunner, 2010
pCcnD	Derivat von pSW1, in welches <i>ccnD</i> eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Brunner, 2010
pCcnE	Derivat von pSW1, in welches <i>ccnE</i> eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Brunner, 2010
pVccnA	Derivat von pSW1, in welches P _{vegT} - <i>ccnA</i> eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Backes, 2010
pVccnB	Derivat von pSW1, in welches P _{vegT} - <i>ccnB</i> eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Kaysen, 2010
pVccnC	Derivat von pSW1, in welches P _{vegT} - <i>ccnC</i> eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Gartmann, 2010
pVccnD	Derivat von pSW1, in welches P _{vegT} - <i>ccnD</i> eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Hummes, 2010
pVccnE	Derivat von pSW1, in welches P _{vegT} - <i>ccnE</i> eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Vatter, 2010
pSW1		Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Schnorpfeil, 2010

pSW2		<i>pneumoniae</i> Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	Diese Arbeit
pTEX _{ciaH202}		Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	Huber, 2012
pEX-A-ccnD-c8c		Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i>	Eurofins MWG Operon
pEX-A-ccnD-AA		Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i>	Eurofins MWG Operon
pEX-A-PM1-ccnA		Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i>	Eurofins MWG Operon
pSW1-ccnD.c8c	Derivat von pSW1, in welches ccnD-c8c eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	Diese Arbeit
pSW1-ccnD-AA	Derivat von pSW1, in welches ccnD-AA eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	Diese Arbeit
pSW1-PM1-ccnA	Derivat von pSW1, in welches PM1-ccnA eingebracht wurde	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> Trimethoprim 15 µg/ml in <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	Diese Arbeit

3.1.3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit für Stammkonstruktionen, Sequenzierungen oder Analyse verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.4 bis Tabelle 3.10 aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in 1xTE-Puffer aufgenommen, so dass die erhaltene Stammlösung eine Konzentration von 100 pmol/µl enthielt. Diese Stammlösung wurde vor Gebrauch mit H₂O_{dest.} auf 10 pmol/µl verdünnt. Die Lagerung der Stamm- und Gebrauchslösung erfolgte bei -20°C.

In Tabelle 3.4 sind die Oligonukleotide zur Überprüfung der korrekten Integration der pSW1-Derivate in das Genom von *S. pneumoniae* R6 aufgelistet.

Tabelle 3.4: Oligonukleotide zur Deletion einzelner csRNAs im Genom von *S.*

<i>pneumoniae</i>	
Primername	Sequenz (5' → 3')

236F	GCTAAGGGGTACACGGATAGGAACTGAAGC
ccnAB-MluI	GGCACGCGTAGACCATCCTTAAATTTTGCTTAAG
ccnAB-NcoI	GGCCCATGGCTAAGAAATAGGTCTGTGGTCGCTTC
ruvK	CCGACGTCTGCTTAAGATTGACTCCC
purK	CGCTTGCAAGAAGAAGCTAAGGGCG
ccnC-MluI	GGCACGCGTCGACCTATCTTAAACAAATCTTAAAAATC
ccnC-NcoI	GGCCCATGGAGAGTCACCGCATTTCGGTGGCTTTTTTTG
dut	TCGGAACCAAGACAATCTCTCCTGGCG
uppS1	GGAGTATTATGCCCATGCTGAC
ccnD-MluI	GGCACGCGTCTCCCTAGCTTAAAGTTTCCTTAAG
ccnD-NcoI	GGCCCATGGAAAAATAAAGTCGCCCAATCAGGGCGGC
uppS7	GGAAATTGCTCAAACGTAATTCTCC
gpmB1	GACACCTATTTCTCTGATTG
ccnE-MluI	GGCACGCGTAAAAGTCGCCTGTATGGGTGGCTTTTATTTT
ccnE-NcoI	GGCCCATGGCATCTAATCTTAAATAGAACTTAAAATTTT
gpmB4	GGTCCAATAGTCATTCCATGG

Tabelle 3.5 zeigt die Oligonukleotide, welche zur Klonierung der Zielregion in die Plasmide pPP/pTP verwendet wurden. In Tabelle 3.6 sind die zur Überprüfung dieser Klonierungen eingesetzten Oligonukleotide aufgeführt.

Tabelle 3.5: Zur Klonierung in pPP/pTP und pSW1/pEXP1 verwendete Oligonukleotide

<i>Primername</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
pTP-Eco	AAACGTACGAATTC AAGCATAG
pTP-Eco-Bam	TTTGCACTTAAAGTTCGTATCCTAG
ermAM-BamHI-for	CCGCCGCGGATCCCCGCCGCAGCAAAGAATGGCGG
ermAM_rev	GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCTTTAGTAACGTGTAACCTTTCC

Tabelle 3.6: Oligonukleotide zur Überprüfung der Integration der pPP/pTP-Derivate in das *S. pneumoniae* Genom

<i>Primername</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
MCS_fwd_Kontr	GCGACATTCACGATTACTTGGC
274-lac	GGAAGGGCGATCGGTGCGGG
EII_fwd_Kontr	GATATCTGGCACTTGTCTATCACAGG
tetM_rev_kontr	TATCTTTCACGGGCATATAACGATGC
lacZ_fwd_kontr	CGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTG
bgaA_rev_Kontr	GGGATTGGTACTTATGGCCAATAACC

In Tabelle 3.7 sind die Oligonukleotide aufgelistet, die zur Amplifikation und Sequenzierung von *ciaRH* verwendet wurden.

Tabelle 3.7: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von *ciaRH*

<i>Primername</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
Cia_P1	GGATTAAGGCAGCCCTTGG
Cia_P3	GGTGTCTATGACTTGATTTTGCTGGCTTTGATGTTGCC

R1728	CCCATCATCTCTCCGAGC
CiaH_for	TCGGTTGTCTCGAAGTCTATGTTTCAAAGTC
CiaH_rev	AAGTTCAACGGTCTATTATCAAACG
CiaH_up_f	TGCAGTCTCGAAGCAGTTGTTCTTCAATACGG
CiaH_down_r	ATTGACCGCAACGAGCAATTCCTTACCAGC
CiaH_up_ff	CGGTATGGGAATCAAGGAAATTGCAGCACG
CiaH_down_rr	CCAAGAAGTCTAAGAAAGGCTTGATACGGTCC

Tabelle 3.8 zeigt die Oligonukleotide, die zur Deletion der Serinprotease *htrA*, Tabelle 3.9 welche die zur Konstruktion von *comC8* bzw. *comC12* verwendet wurden. Tabelle 3.10 zeigt die Oligonukleotide, welche für den Austausch des Wildtyp *comC* gegen *comC8* verwendet wurden. Die eingebrachten Mutationen sind rot hinterlegt.

Tabelle 3.8: Oligonukleotide zur Herstellung von Deletionsmutanten in *htrA*

<i>Primername</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
htrA-ko-6	GAACAATAACCGTCCCAAATCC
SpoOJ1	GAGATATTTTACCATAGATAGC

Tabelle 3.9: Oligonukleotide zur Konstruktion von veränderten *comC-lacZ*-Translationsfusionen

<i>Primername</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
comC-met-for	GTAAGTTAGCTTACAAGAAAAACATTTTAGGAGATTTTATTATG
comC-met-rev	GATCCATAATAAAATCTCCTAAAATGTTTTTCTTGTAAGCTAACTTAC
comC-l-mut1-for	GTAAGTTAGCTTACAAGAAAAACATTTTAGGAGTACAAAAATGAAA AACACAGTTAAATTGGAACAGTTTGTAGCTTTG
comC-l-mut1-rev	GATCCAAAGCTACAACTGTCCAATTTAACTGTGTTTTTCATTTTTTGT ACTCCTAAAATGTTTTTCTTGTAAGCTAACTTAC
comC-l-mut2-for	GTAAGTTAGCTTACAAGAAAAACATTTTGGTGATACAAAAATGAAA AACACAGTTAAATTGGAACAGTTTGTAGCTTTG
comC-l-mut2-rev2	GATCCAAAGCTACAACTGTCCAATTTAACTGTGTTTTTCATTTTTTGT ATCACCAAAATGTTTTTCTTGTAAGCTAACTTAC
comC-stem-loop1	ATAAATTAGCTTACAAGAAAAACATTTTAGGAGATTTTATTATGAAAA ACACAGTTAAATTGGAACAGTTTGTAGCTTTG
comC-stem-loop1_rev2	GATCCAAAGCTACAACTGTCCAATTTAACTGTGTTTTTCATAATAAAA TCTCCTAAAATGTTTTTCTTGTAAGCTAATTTAT

Tabelle 3.10: Oligonukleotide zur Konstruktion der *comC8* Variante im Genom

<i>Primername</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
ComC_fwd_kontr	GCTAAGTTTGAAATGATTGAGTTATCAGATG
ComC_rev_janus	CTTCTGCTTCAAAGCAATCTCTTTCTCC
Janus_mut1_fwd	GCTTACAAGAAAAACATTTTAGGAGTACAAAAATGAAAAACACAG TTAAATTGG
Janus_mut1_rev	CCAATTTAACTGTGTTTTTCATTTTTGTACTCCTAAAATGTTTTTCTT GTAAGC

3.1.4. Nährmedien

3.1.4.1 C+Y-Medium

Zur Anzucht der verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen wurde ein semisynthetisches Komplexmedium, das C+Y-Medium (Lacks & Hotchkiss, 1960) in dieser Arbeit verwendet. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 3.11 und Tabelle 3.12 aufgeführt. Die einzelnen Komponenten wurden getrennt autoklaviert oder sterilfiltriert, vor der Verwendung steril zusammen pipettiert und dunkel bei 4°C gelagert. Bei Bedarf wurde der pH des Komplexmediums mithilfe von 1M K₂HPO₄ und 1M KH₂PO₄ oder wenn nötig 25% Hefeextrakt zu einer Endkonzentration von 5% Hefe zugegeben.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung des C+Y-Mediums

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

Tabelle 3.12: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C+Y-Mediums

Komponenten	Menge
PreC	
Na-Acetat, wasserfrei	1,2 g
Casaminosäuren	5 g
L-Tryptophan	5 mg
L-Cystein	0,05 g
H ₂ O	ad 1 l
pH 7,5 einstellen mit NaOH, autoklavieren	
Supplement	
3 in 1 Saltsl	60 ml
20 % Glukose	120 ml
50 % Saccharose	6 ml
Adenosin (2 mg/ml)	120 ml
Uridin (2 mg/ml)	120 ml
alle Komponenten einzeln autoklavieren, Supplement steril zusammen pipettieren	
AdamsIII	
AdamsI	160 ml
AdamsII	40 ml
Asparagin	2 g
Cholinchlorid	0,2 g
0,1 M CaCl ₂	1,6 ml
H ₂ O	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern	
Phosphatpuffer, pH 8	
1 M KH ₂ PO ₄	53 ml

1 M K ₂ HPO ₄ autoklavieren	947 ml
3 in 1 Salts	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 g
CaCl ₂ , wasserfrei	0,5 g
0,1 M MnSO ₄	0,2 ml
H ₂ O	ad 1 l
autoklavieren	
AdamsI	
Biotin	0,15 mg
Nicotinsäure	150 mg
Pyridoxin-HCL (B6)	175 mg
Ca-Pantothenat	600 mg
Thiamin-HCl	160 mg
Riboflavin	70 mg
H ₂ O	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern	
AdamsII	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	500 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	200 mg
HCl _{konz.}	10 ml
H ₂ O	ad 1 l
sterilfiltrieren und in dunklen Gefäßen lagern	

3.1.4.2 Todd Hewitt Broth (THB)

In dieser Arbeit wurde der Kompetenzphänotyp von *S. pneumoniae* unter anderem in THB Medium untersucht. Das Fertigpulver, von der Firma Roth wurde nach Herstellerangaben angesetzt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

3.1.4.3 Brain Heart Infusion (BHI)

BHI wurde ebenfalls für einige Untersuchung des Kompetenzphänotyps von *S. pneumoniae* verwendet. Hierbei handelt es sich ebenso um ein Komplexmedium, welches von Becton, Dickinson and Company bezogen wurde und nach Herstellerangaben angesetzt, autoklaviert und bei 4°C gelagert wurde.

3.1.4.4 D-Blutagar

Zur Kultivierung von *S. pneumoniae* auf Festmedium wurde D-Agar (Tabelle 3.13) verwendet. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 48°C wurde dem Agar defibriertes Schafsblut (Oxoid GmbH, Wesel) mit einer Endkonzentration von 3 % zugegeben. Bei Bedarf wurde der Agar mit dem zur Selektion benötigten Antibiotika (Tabelle 3.14) versetzt.

Tabelle 3.13: Zusammensetzung des D-Agar

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
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}	ad 1 l

Tabelle 3.14: Verwendete Antibiotika

<i>Antibiotika</i>	<i>Stammlösung in</i>	<i>Verwendete Endkonzentration</i>
Trimethoprim	DMSO	15 µg/ml
Streptomycin	H ₂ Odest	200 µg/ml
Erythromycin	50% EtOH p.a	0,5 µg/ml
Kanamycin	H ₂ Odest	200 µg/ml
Tetracyclin	70% EtOH p.a	3 µg/ml
Anhydrotetracyclin	70% EtOH p.a /H ₂ O	variabel
Rifampin	DMSO	0,5 µg/ml
Ampicillin	H ₂ O	100 µg/ml
Spectinomycin	H ₂ Odest	40 µg/ml
Cefotaxim	H ₂ Odest	variabel

3.1.4.5 LB-Medium und LB-Agar

Für die Kultivierung von *Escherichia coli* wurde das Komplexmedium Luria Broth (LB) von der Firma Roth verwendet. Das Medium wurde nach Herstellerangaben angesetzt, autoklaviert und anschließend bei 4°C gelagert. Für die Kultivierung von *E. coli* auf Festmedium wurde LB-Agar, ebenfalls als Fertigpulver von der Firma Roth verwendet. Auch hier wurde nach Herstellerangaben vorgegangen, autoklaviert und bei 4°C gelagert. Dem Medium bzw. dem Agar wurden je nach Bedarf das zur Selektion benötigte Antibiotika (Tabelle 3.14) zugegeben.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung und Stammkonservierung

3.2.1.1 Wachstum in Flüssigmedium

S. pneumoniae Kulturen wurden in Flüssigmedium bei 37°C semianaerob, stehend im Wasserbad kultiviert. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte schüttelnd bei 37°C. Beimpft wurde das Medium entweder 1-4% aus einer Glycerinkultur oder von einer D-Agar-bzw. LB-Platte. Zum Verfolgen des Wachstums wurde die optische Dichte (OD) bei 600 nm mithilfe des Photometer (Ultrospec 500, Biochrom Ltd) bestimmt. Als Referenz dient nicht beimpftes Medium. Die Wachstumsrate μ und die Generationszeit g wurden über den linearen Bereich der halblogarithmisch aufgetragenen exponentiellen Wachstumsphase wie folgt ermittelt:

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

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

X = Zellzahl zum Zeitpunkt t

X_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt t_0

$t - t_0$ = Zeitdifferenz [min]

Zur Kultivierung auf Festmedium 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.

3.2.1.2 Stammkonservierung

Eine geeignete Methode zur Konservierung von *S. pneumoniae* und *E. coli* Stämmen ist das Anlegen von Glycerin Kulturen. Hierbei verhindert das Glycerin die Bildung von Eiskristallen in den Bakterien, indem es den Gefrierpunkt des enthaltenen Wassers herabsetzt. Hierfür wurden die Kulturen bis zu einer OD_{600} von 0,7 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde warmes Glycerin (99,5%) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (ERG) vorgelegt und mit der wachsenden Kultur so gemischt, dass das Glycerin in einer Endkonzentration von 20% vorlag. Die Mischung wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Sollte die Reinheit einer

Kultur überprüft werden, wurde diese mithilfe einer Impföse auf dem entsprechenden Agar ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

3.2.2 Transformation von *Streptococcus pneumoniae*

3.2.2.1 Herstellen von kompetenten *S. pneumoniae* Zellen

S. pneumoniae besitzt natürliche Kompetenz, was bedeutet, dass die Zellen innerhalb einer bestimmten Wachstumsphase in der Lage sind, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Das Maximum der Kompetenzentwicklung entwickelt *S. pneumoniae* in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase. Daher wurden zur Herstellung und Konservierung kompetenter Zellen Kulturen in C+Y-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,3 hochgezogen und als Glycerinkulturen in 200 µl Aliquots abgeerntet. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Bei Stämmen mit aktivierenden *ciaH202* Allel wurde das C+Y-Medium direkt von einem auf D-Blutagarplatten mit 0,02 µg/ml Cefotaxim gewachsenen Bakterienrasen angeimpft um das Akkumulieren von Mutanten zu minimieren. Zudem wurden die exponentiell wachsenden Kulturen direkt transformiert ohne vorheriges Anlegen einer Glycerinkultur.

3.2.2.2 Transformation von *S. pneumoniae*

Zur Transformation wurden die oben beschriebenen kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. 20µl dieser Zellen wurden 1:10 in C-Medium verdünnt und mit 50-500ng DNA versetzt. Handelte es sich um Stämme, in denen es aufgrund von genetischen Veränderungen zu einer unterdrückten Kompetenz kommt, wurde CSP (competence stimulating peptide) in einer Endkonzentration von 100 ng/ml dem Ansatz zugegeben. Bei einer Inkubation von 5 min bei 37°C konnte so die Kompetenz induziert werden (Håvarstein *et al.*, 1995). Anschließend wurden die Ansätze zur DNA-Aufnahme 30 min bei 30°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte zur phänotypischen Expression eine weitere Inkubation für 2 Stunden bei 37°C. 100 µl der Transformationsansätze wurden unverdünnt, in geeigneten Verdünnungen in Saline (0,9 % NaCl) auf mit dem benötigten Antibiotikum versetzten, selektiven D-Blutagar ausplattiert. Diese Platten wurden 12-24 h bei 37°C inkubiert. Erhaltene Einzelkolonien wurden auf frischen Selektiv-Agarplatten großflächig ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von diesen Kolonien wurde möglichst viel Zellmasse entnommen und in Flüssigkultur überführt. Diese Flüssigkulturen wurden nach dem Wachstum als Glycerinkulturen konserviert (Kap.3.2.1.2).

3.2.2.3 Bestimmung der Transformationseffizienz von *S. pneumoniae*

In dieser Arbeit wurde die Kompetenzentwicklung verschiedene *S. pneumoniae* Stämme über das gesamte exponentielle Wachstum beobachtet. Hierbei ist es wichtig, dass sich die Zellen zu Beginn des Versuchs in einem nicht kompetenten Zustand befinden. Um dies zu ermöglichen wurden

Vorkulturen verwendet, da die Kompetenzentwicklung bei *S. pneumoniae* pH abhängig ist (Tomasz & Mosser, 1966; Chen & Morrison, 1987). Hierzu wurden die zu untersuchenden Stämme in C-Medium mit einem pH von 6,8 bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 hochgezogen und anschließend als Glycerinkulturen konserviert (Kap. 3.2.1.2). Aus dieser Glycerinkultur wurde anschließend C-Medium mit einem pH von 7,8 1%ig beimpft. Ab dem Zeitpunkt des Animpfens (T=0) wurde nach 5 min und anschließend alle 30 min 200 µl der Kultur entnommen und transformiert. Hierfür wurden 50 ng chromosomale DNA des Stammes RKL222 zu der Kultur gegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend wurde DNaseI (Roche Applied Science) in einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugegeben um die noch verbliebene DNA enzymatisch aus dem Ansatz zu entfernen. Anschließend wurde der Ansatz zur phänotypischen Expression für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde eine Verdünnungsreihe der Transformationsansätze in Saline (0,9% NaCl) hergestellt. Hierbei wurden jeweils 100 µl der niedrigeren Verdünnungen auf D-Blutagar-Platten, welche das zur Selektion verwendete Antibiotika Rifampin (Tabelle 3.14) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml enthielten und hohe Verdünnungen auf antibiotikafreie Platten, zur Bestimmung der Lebenkeimzahl ausplattiert. Die Transformationseffizienz ergibt sich hierbei aus dem prozentualen Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl.

3.2.3 Transformation von *Escherichia coli*

3.2.2.1 Herstellen von kompetenten *E. coli* Zellen

Im Gegensatz zu *S. pneumoniae* handelt es sich bei *E. coli* um ein Bakterium welches keine natürliche Kompetenz aufweist. Daher müssen diese Zellen erst einer Behandlung unterzogen werden, welche zur künstlichen Kompetenz führt. In dieser Arbeit wurden kompetente *E. coli* Zellen nach einem vereinfachten Protokoll von Hanahan hergestellt (Hanahan, 1983). Hierfür wurden 200 ml LB Medium von Platte oder durch eine Übernachtskultur so beimpft, dass die optische Dichte (OD₆₀₀) ca. 0,05 betrug. Diese Kultur wurde 37°C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Diese Kultur wurde zügig auf Eis abgekühlt und zu 40 ml Portionen in Greiner Rörchen überführt. Die Zellkultur wurde 10 min bei 8500 rpm und 4°C abzentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instrument). Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Zellpellet in 16 ml kaltem TFB1-Puffer (Tabelle 3.15) resuspendiert und für 90 min auf Eis gehalten. Die Zellsuspension wurde anschließend wie oben beschrieben zentrifugiert und das Pellet in 2 ml TFB2-Puffer (Tabelle 3.15) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis zu 100 µl Portionen aliquotiert, Schock gefroren in flüssigem Stickstoff und bei -80°C gelagert.

3.2.2.1 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurde ein Aliquot zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 1-10 µl der zu transformierenden DNA bzw. Ligationsansatz zugegeben und die Kultur weitere 20 min auf Eis

gehalten. Anschließend wurden die Zellen für 90 sec bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium bzw. Psi-Broth (Tabelle 3.15) wurden die Zellen zur phänotypischen Expression in ein Reagenzglas überführt und 1h bei 37°C geschüttelt. Der Ansatz wurde anschließend mit Saline (0,9% NaCl) verdünnt und auf LB-Platten mit dem zur Selektion verwendeten Antibiotika ausplattiert und 24 h bei 37°C inkubiert.

Tabelle 3.15: Lösungen zur Herstellung von kompetenten Zellen und zur Transformation von *E. coli*

<i>Komponenten</i>	<i>Konzentration</i>
TFB1 Puffer	
RbCl	100 mM
MnCl ₁₂	50 mM
K-Acetat	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15 %
pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern	
TFB2 Puffer	
MOPS	100 mM
BbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15 %
pH 8 mit NaOH einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern	
Psi-Broth	
LB-Medium autoklavieren, danach zugeben	
MgSO ₄ (autoklaviert)	4 mM
KCl (autoklaviert)	10mM

3.2.4 Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *S. pneumoniae* wurde in dieser Arbeit eine auf Marmur (Marmur, 1961) basierende Methode verwendet. Hierbei handelt es sich um eine schnelle Methode, die allerdings die Fragmentierung der DNA durch Scherkräfte zu Folge haben kann. Für die in dieser Arbeit benötigte DNA konnte dies allerdings vernachlässigt werden.

Zur Präparation der DNA wurden 6 ml einer *S. pneumoniae* Kultur in C+Y-Medium bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,8 angezogen. Die Kultur wurde anschließend in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt und 5 min bei 8500 rpm (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments) abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet in 2 ml Saline (0,9% NaCl) resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 1 ml in ein ERG aliquotiert und 1 min bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vollständig entfernt und die entstandenen Zellpellets entweder bei -20°C eingefroren oder direkt weiterverwendet.

Ein Bakterienpellet wurde in 180 µl TE-Puffer (Tabelle 3.16) resuspendiert und mit 20 µl RNase Lösung (20mg/ml) versetzt und der Ansatz für ca. 1 min im 37°C Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 200 µl einer 2 %igen SDS-Lösung zugegeben und die Zellen durch invertieren lysiert. Nach erfolgter Zelllyse wurde 100 µl ProteinaseK-Lösung (20 mg/ml) zugegeben, wiederum durch invertieren gemischt und 10 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und 30 min auf einem Eppendorfschüttler gerüttelt. Der Ansatz wurde für 3 min bei 1400 rpm zentrifugiert, die wässrige Oberphase abgehoben und die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion wiederholt (20 min schütteln). Die Oberphase wurde in ein neues ERG überführt und die DNA mittels 500 µl Isopropanol (100%) gefällt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit Ethanol (100%, p.A) gewaschen. Nach dem Trocknen im Exsikkator wurde die DNA über Nacht bei 4°C oder 1 h bei 37 °C gelöst.

Tabelle 3.16: Lösungen zum Isolieren von chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae*

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

3.2.5 Isolierung von Gesamt RNA aus *S. pneumoniae*

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus *S. pneumoniae* wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden verwendet. Sollte die RNA im Anschluss für einen Northern Blot verwendet werden wurde

die „Ice cold Phenol“-Methode nach Maes und Messens angewandt (Maes & Messens, 1992). Sollte die isolierte RNA im Anschluss bei Microarray Analyse eingesetzt werden wurde mittels sogenannten „Hot Phenol“-Methode isoliert (Maes & Messens, 1992). Generell wurden bei der Arbeit mit RNA Handschuhe getragen um die Gefahr einer Verunreinigung der Proben mit externer RNase zu minimieren.

3.2.5.1 Isolierung von Gesamt RNA mittels „Ice cold Phenol“ Methode

3.2.5.1.1 Zellaufschluss

Zum Aufschluss der Zellen wurden zunächst 10 ml C+Y-Medium mit einer Glycerinkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,7$ im Wasserbad inkubiert. Die Zellkultur wurde anschließend in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt und bei 8000 rpm für 10 min abzentrifugiert (Biofuge Startos, Haraeus Instruments). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet entweder bei -20°C gelagert oder sofort weiter verwendet.

Zum Zellaufschluss wurden 500 mg Glasperlen (Roth, Ø 0,4 – 0,52 mm) und 500 µl NAE-gesättigtes Phenol/Chloroform (6:1) (Tabelle 3.17) zugegeben und dreimal 1 min gevortext. Um Wärmeentwicklung entgegenzuwirken wurde der Ansatz zwischendurch jeweils 1 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 500 µl NAES-Puffer (Tabelle 3.17) zugegeben, erneut für 1 min gevortext und bei 8000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert.

3.2.5.1.2 RNA-Isolierung

Nach erfolgter Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase vollständig in ein 1,5 ml ERG überführt und 500µl NAE-gesättigtem Phenol/Chloroform (6:1) versetzt. Durch mehrmaliges invertieren wurde der Ansatz gut gemischt und bei 14000 rpm für 5 min (Eppendorf Centrifuge 5415C) zentrifugiert. Die Phenol/Chloroform Extraktion wurde ein weiteres Mal wie beschrieben wiederholt. Anschließend wurde die obere wässrige Phase in ein neues ERG überführt und mit 500 µl Isopropanol und 30 µl Natriumacetat (pH 5) (Tabelle 3.17) versetzt. Durch mehrmaliges Invertieren wurde der Ansatz gemischt wobei die in der Lösung befindliche Gesamtnukleinsäure sichtbar ausfällt. Das ERG wurde für 30 min bei -20°C gestellt und anschließend für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet der Gesamtnukleinsäure mit 200 µl 100% Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde entnommen und das ERG auf einem Saugtuch aufgetupft. Die Gesamtnukleinsäure wurde im Exsikkator für 10 min getrocknet, in 50µl H₂O (2x autoklaviert) aufgenommen und durch auf- und abpipettieren gelöst. Die Gesamtnukleinsäure wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 3.17: Lösungen zur Isolierung von RNA mittels „Ice cold Phenol“ Methode

<i>Komponenten</i>	<i>Konzentration</i>
Natriumacetat	3 M (pH5)
NAE-Puffer	
Natriumacetat	50 mM (pH 5)

EDTA	10 mM
NAES-Puffer	
Natriumacetat	50 mM (pH 5)
EDTA	10mM
SDS	1%
NAE-gesättigtes Phenol/Chloroform (6:1)	
1:10 Vol. NAE-Puffer zu Phenol/Chloroform (6:1) geben, dunkel bei 4°C lagern	

3.2.5.1.3 DNaseI Verdau

Zum Entfernen der DNA aus der Gesamtnukleinsäure-Lösung musste ein DNase-Verdau durchgeführt werden. Hierzu wurde DNaseI (New England Biolabs) verwendet sowie der entsprechende 10x DNase-Puffer. Der Ansatz wurde wie folgt zusammen pipettiert (Tabelle 3.18).

Tabelle 3.18: Ansatz eines DNase-Verdaus

<i>Komponenten</i>	<i>Konzentration</i>
DNaseI	5000 U
DNaseI-Puffer (10x)	6µl
H ₂ O	2µl
Gesamtnukleinsäure-Lösung	50µl
Gesamtansatz	60µl

Der Gesamtansatz wurde gemischt und für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Zur Entfernung der DNase war eine weitere Aufreinigung durch Phenolisierung und Ethanolpräzipitation notwendig. Hierfür wurde der DNase-Verdau zunächst auf 300 µl mit H₂O (2x autoklaviert) aufgefüllt. Anschließend wurden 300 µl NAE-gesättigtes Phenol/Chloroform (6:1) zugegeben, für 30s gevortext und der Ansatz bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein neues ERG überführt und durch Zugabe von 50 µl 3M Na-Acetat und 900 µl Ethanol (100%) die in der Lösung befindliche DNA gefällt. Das ERG wurde für 30 min bei -20°C gelagert, für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 200 µl 100% Ethanol gewaschen, der Überstand wieder entfernt und das ERG auf einem Saugtuch aufgetupft. Das erhaltene Pellet wurde in 50 µl H₂O (2x autoklaviert) durch auf- und abpipettieren gelöst und bei -20°C gelagert.

3.2.5.2 Isolierung von Gesamt RNA mittels „Hot Phenol“ Methode

3.2.5.2.1 Zellaufschluss und RNA-Isolierung

Da die in diesem Versuchsteil verwendeten Bakterienstämme zu Zusatzmutationen neigten und sie auch nicht geeignet sind für eine Übernachtskultur, wurden diese am Vortag auf selektiv D-Agarplatten ausgestrichen. Von diesen Platten wurde am darauf folgenden Tag 140 ml C+Y-Medium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,4 bei 37°C im Wasserbad inkubiert. 100 ml der Kultur wurden auf zwei 50 ml

Greiner Röhrchen aufgeteilt und bei 8000 rpm (Biofuge Startos, Heraeus Instruments) für 6 min bei 19 C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zügig in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 C gelagert.

Zur Isolierung der RNA wurde das Pellet ohne auftauen in 4 ml, auf 60 C vorgewärmten, NAE-gesättigten Phenol/Chloroform (6:1) (Tabelle 3.17) resuspendiert. Beide resuspendierten Pellets wurden anschließend vereinigt und für 5 min bei 60 C inkubiert. Zwischendurch wurde mehrmals invertiert. Zu dem Ansatz wurden 4 ml auf 60 C vorgewärmter NAES-Puffer gegeben (Tabelle 3.17), mehrmals invertiert und 5 min bei 60 C inkubiert. Nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 8 min bei 8000 rpm und 4 C abzentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Die wässrige Oberphase wurde in ein MaXtract High Density Röhrchen (Qiagen)  berf hrt und 4 ml NAE-gesättigtes Phenol/Chloroform (6:1) (Tabelle 3.17) zugegeben. Durch mehrmaliges invertieren wurde der Ansatz gut gemischt und anschließend für 8 min bei 8000 rpm zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Durch das in den MaXtract High Density Röhrchen enthaltene Gel, welches sich beim Zentrifugieren zwischen die organische und die wässrige Phase legt, konnte die Oberphase durch dekantieren in ein neues MaXtract High Density Röhrchen überführt werden. Die Phenol/Chloroform Extraktion wurde ein weiteres Mal wie oben beschrieben wiederholt. Die wässrige Oberphase wurde in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt und durch Zugabe von 4 ml kaltem Isopropanol und 400 Öl kaltem Natriumacetat (3M, pH5) durch mehrmaliges invertieren die Gesamtnukleinsäure gef llt. Zur effizienten F llung wurde der Ansatz über Nacht bei -20 C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Ansatz für 40 min bei 8000 rpm und 4 C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml Ethanol (70%) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für 45 min im Exsikkator getrocknet. Die erhaltene Gesamtnukleinsäure wurde in 450 Öl DEPC-behandeltem H₂O gelöst. Anschließend folgte ein DNaseI Verdau wie unter Punkt 3.2.5.1.3 beschrieben. Die erhaltene RNA wurde mithilfe des RNeasy Midi/Maxi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde in dieser Arbeit entweder das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder, zur Isolierung gr oerer Mengen Plasmid-DNA, das NucleoBond PC 100 Kit (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben verwendet. Der Vorteil der verwendeten Kits liegt in der rascheren Durchführbarkeit und saubereren Aufreinigung über Säulen.

3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.7.1 PCR

Zur Vervielfältigung von DNA wurde die sogenannte Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) angewandt. Hierbei handelt es sich um ein *in vitro* Verfahren bei dem eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet wird (Mullis *et al.*, 1986). Hierbei erfolgt im ersten Schritt bei 96-98 °C die Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge. Dadurch können beim anschließenden Absenken der Temperatur im zweiten Schritt spezifische Primer an den komplementären Bereich der DNA binden. Dabei ist die optimale Temperatur des sogenannten „Annealings“ von dem GC-Gehalt der verwendeten Primer abhängig. Im darauf folgenden dritten Schritt, der Elongation, wird die Temperatur auf das Optimum der verwendeten DNA-Polymerase, welche die komplementären DNA-Stränge vom 3'-Ende aus synthetisiert, angepasst. Durch die Wiederholung dieser drei Schritte, meist 30 Zyklen, wird die DNA exponentiell amplifiziert, da in jedem Zyklus die zuvor neu synthetisierten DNA-Fragmente ebenfalls als Template dienen können.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Zum Überprüfen von Transformanten und zur Amplifikation von DNA für eine anschließende Sequenzierung, wurde die DreamTaq (Thermo Scientific) verwendet. Zur Amplifikation von Fragmenten die anschließend für Klonierungen oder Transformationen verwendet werden sollten, wurde die iProof DNA-Polymerase (Bio-Rad), die eine 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt, verwendet. Durch diese Korrekturlesefunktion kommt es zu einer geringeren Fehlerrate. In den Tabelle 3.19 bis Tabelle 3.22 sind die jeweiligen Pipettier-Schemata sowie die Cycle-Programme der beiden Polymerasen aufgeführt.

In der Regel wurde als Template DNA isolierte chromosomale DNA verwendet. Allerdings wurden bei der Überprüfung von Transformanten, Zellkulturen direkt als Template eingesetzt. Hierfür wurde 100 µl Kultur abzentrifugiert (1 min, 15000 rpm) (Eppendorf Centrifuge 5415C), das Zellpellet in 50 µl H₂Odest resuspendiert und 4 µl als Template verwendet. In diesem Fall wurde der erste Denaturierungsschritt auf 5-10 min verlängert.

Tabelle 3.19: Pipettierschema für einen PCR-Ansatz mit der DreamTaq DNA-Polymerase

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
Template	1-4 µl
DreamTaq Master Mix	25 µl
Primer fw	1 µl (10pmol/µl)
Primer rev	1 µl (10pmol/µl)
H ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 3.20: Pipettierschema für einen PCR-Ansatz mit der iProof DNA-Polymerase

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
Template	1 µl
Primer fw	1 µl (10pmol/µl)
Primer rev	1 µl (10pmol/µl)
HF Puffer (5x)	10 µl
dNTPs	1 µl (10pmol/µl)
iProof Polymerase (2U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 3.21: Cycleprogramm für einen PCR-Ansatz mit der DreamTaq DNA-Polymerase

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
1	96°C	2 min
2	96°C	30 sec
3	T _m -5°C	30 sec
4	72°C	1 min/kb
5	72°C	5 min
6	10°C	∞

T_m = Schmelztemperatur. Die Schritte zwei bis vier wurden 30x wiederholt.

Tabelle 3.22: Cycleprogramm für einen PCR-Ansatz mit der iProof DNA-Polymerase

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
1	98°C	30 min
2	98°C	10 sec
3	T _m	30 sec
4	72°C	30sec/kb
5	72°C	5 min
6	10°C	∞

T_m = Schmelztemperatur. Die Schritte zwei bis vier wurden 30x wiederholt.

Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das Jet quick PCR-Purification Kit (Genomed) verwendet. Die DNA-Konzentration wurde anschließend, wenn nötig, durch NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies) bestimmt.

3.2.7.1 Überlappende PCR

Die Herstellung von Konstrukten für die Mutagenese von Genen in *S. pneumoniae* erfolgte mittels sogenannter überlappender PCR. Bei dieser Variante der PCR ist es möglich zwei oder mehrere zuvor generierte PCR-Produkte in einer PCR zusammenzufügen. Hierzu ist es notwendig, dass die Ausgangsfragmente an einem Ende eine ca. 20 bp großen komplementären Bereich zu den anderen Fragmenten besitzen und umgekehrt.

Zunächst wurden die Ausgangsfragmente in einer PCR mit Primern synthetisiert, welche an einem Ende des jeweiligen Produkts ein ca. 20 bp große, zum Ende des anderen Produkts komplementäre Sequenz besitzen. Diese Ausgangsfragmente wurden in einer sogenannten Auffüllreaktion ohne die Anwesenheit der Primer verknüpft (Tabelle 3.23 Schritt 1 bis 3). Dabei lagern sich die Fragmente mit ihren komplementären Enden aneinander. Anschließend wurde das Primerpaar zugegeben, welches zur Amplifikation des Volllängen-Fragments führt. Das Cyclerprogramm ist in Tabelle 3.23

aufgeführt. Es wurde die iProof High-Fidelity-DNA Polymerase (Bio-Rad Laboratoris) unter der Verwendung des in Tabelle 3.20 aufgeführten Standardansatzes eingesetzt. Allerdings wurden die Primer erst nachträglich bei Schritt 4 dazu gegeben.

Tabelle 3.23: Cycleprogramm für eine überlappende PCR

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
1	98°C	1 min
2	60°C	1 min
3	72°C	1 min
4 Zugabe der Primer	30	3 min
5	98°C	30 s
6	98°C	5 s
7	$T_m - 5^\circ\text{C}$	10 s
8	72°C	30s/kb
9	72°C	10 min
10	10°C	∞

T_m = Schmelztemperatur. Die Schritte sechs bis acht wurden 30x wiederholt.

3.2.8 Restriktion von DNA mittels Endonukleasen

Zum Schneiden von PCR-Produkten oder Plasmiden durch Endonukleasen wurden Enzyme von Invitrogen bzw. New England Biolabs, mit den dazu gehörigen Puffern, nach Herstellerangaben verwendet. Die Restriktion erfolgte für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37°C. Die anschließende Aufreinigung erfolgte entweder durch das Jet Quick PCR-Purification Kit (Genomed) oder, bei Gelextraktionen, durch das Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel).

3.2.9 Reaktion mit T4-DNA-Polymerase

Zum Abbau von 3'-Überhängen an DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Polymerase (New England Biolabs) verwendet. Das Enzym wurde nach Herstellerangaben eingesetzt, für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 75°C inaktiviert. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Jet Quick PCR-Purification Kit (genomed).

3.2.10 Phosphorylierung von Oligonukleotiden und PCR-Produkten

Eine Phosphorylierung von Oligonukleotiden und PCR Produkten, mit glatten Enden, vor einer Ligation war nötig, da diese am 5'-Ende aufgrund der dort angelagerten Primer unphosphoryliert vorliegen. Die Kinasereaktion erfolgte mittels T4 Polynukleotid Kinase (Roch), die vor der Ligasereaktion in den Ansatz gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert wurde.

3.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA Ligase von Invitrogen mit zugehörigem Puffer nach Herstellerangaben verwendet. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 18°C. Vektor und Insert wurden in der Regel in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Aufreinigung für die Transformation eingesetzt.

3.2.12 Agarose-Gelelektrophorese

Eine einfache Methode zum Auftrennen von Nukleinsäuren nach ihrer Größe ist die Agarose-Gelelektrophorese. 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. Durch die im Gel enthaltenen Poren wandern kleine Moleküle leichter als große Moleküle, die sterisch behindert werden und sich dadurch langsamer durch das Gel bewegen. Die in einer bestimmten Zeit zurückgelegte Laufstrecke der Nukleinsäurefragmente ist dabei annäherungsweise antiproportional zu ihrer Größe. Die Agarosekonzentration wurde abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente gewählt. Für größere Fragmente wurde eine Konzentration von 1%, für kleinere Fragmente 1,7% verwendet. Zur Auftrennung von DNA wurden die Agarose (SeaKem LE, Biozym) in TAE-Puffer (Tabelle 3.24), für RNA in TBE-Puffer (Tabelle 3.24) durch aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Als Auftragspuffer diente entweder der 6x DNA-Ladepuffer bzw. der 2x RNA-Ladepuffer von Fermentas. Im Probenpuffer sind Farbstoffe gelöst, die es erlauben den Gang der Elektrophorese zu verfolgen. Zusätzlich enthält er Zucker, um das Absinken der DNA-Proben in die Taschen des Gels zu erleichtern. Die gelöste Agarose wurde in horizontale Gelkammern gegossen. Zur Ausformung der Taschen wurde in die noch flüssige Agarose ein Kamm eingesteckt. Nach vollständiger Polymerisation des Agarosegels wurde es in eine Laufkammer gesetzt, welche mit demselben Puffer befüllt war in welchem die Agarose gelöst wurde. Die angelegte Spannung betrug in der Regel 120 V für eine Dauer von ca. 1 h. Als Marker diente der Generuler 1 kb-Marker (Fermentas). Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele zum Detektieren der Nukleinsäuren für 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und anschließend auf dem UV-Transilluminator (Appligene Oncor M-20) angeschaut und dokumentiert (Mitsubishi Video Copy).

Tabelle 3.24: Puffer zu Herstellung von Agarose-Gelen

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

3.2.13 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Seq-IT GmbH (Kaiserslautern) durchgeführt. Hierbei wurde die sogenannte „Didesoxymethode“ oder auch „Kettenabbruchmethode“ nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) angewandt. Nach Erhalt der fertigen Sequenzen konnten diese mithilfe verschiedener Programme ausgewertet werden. Hierzu wurden zum einen 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 & Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998). Des Weiteren wurden die ermittelten Sequenzdaten mittels Blastanalyse (Altschul *et al.*, 1990) mit den theoretischen DNA-Sequenzen verglichen, die zuvor mithilfe des Programmes Clone Manager und verfügbaren Genomsequenzen aus der Datenbank des NCBI *in situ* erzeugt wurden.

3.2.14 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Wie bei der Agarose-Gelelektrophorese, können bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese geladene Makromoleküle anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Schärfe der Auftrennung und die Trennung von kleinen Molekülen sind hierbei besser als bei Agarosegelen. Die in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamidgele dienen zur Auftrennung von Proteinen und RNA.

3.2.14.1 Herstellung von Zellsaten und Markierung von Penicillin-bindenden Proteinen

Zur Visualisierung von PBPs aus verschiedenen Stämmen von *Streptococcus pneumoniae* wurden diese mit Bocillin (Molecular Probes), einem fluoreszierenden Penicillin V-Derivat markiert (Zhao G. *et al.*, 1999). Es bindet PBPs, die dadurch unter dem FluorImager 595 (Molecular Dynamics) sichtbar werden. Zur Lysatherstellung wurden die entsprechenden Stämme in 4 ml C-Medium bei 37°C bis zu einem OD₆₀₀ = 0,7 angezogen. Anschließend wurden diese bei 8.000 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415C) und der Überstand komplett verworfen. Um Veränderungen bei

Proteinmenge oder bei der Affinität der PBPs zu Bocillin feststellen zu können, sollten bei der anschließenden SDS-Gelelektrophorese immer die gleichen Mengen an Lysat aufgetragen werden. Zu diesem Zweck wurde die einzusetzende Menge an 20 mM Natriumphosphatpuffer (+ 0,2 % Triton X-100) (Tabelle 3.25), in dem die Pellets resuspendiert wurden, folgenderweise berechnet:

$$\text{Menge an Natriumphosphatpuffer [ml]} = \text{Kulturvolumen [ml]} \times (\text{tats. OD}_{600} \times 10 / 20) \times 5 \mu\text{l}$$

Dadurch entsprachen 5 μl resuspendierte Zellen 1 ml Kultur bei einem $\text{OD}_{600} = 0,2$. Die Pellets wurden in der so berechneten Menge an 20 mM Natriumphosphatpuffer (+ 0,2 % Triton X-100) resuspendiert. Das Detergenz Triton X-100 zerstört die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran und aktiviert Autolysin, was zur Zellyse führt. Die Lysate wurden für 30 min bei 37°C inkubiert, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert.

Die Zellysate wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem gleichen Volumen an Natriumphosphatpuffer ohne Triton, sowie mit dem doppelten Volumen an 2x Lämmli-Probenpuffer (Tabelle 3.25) versetzt und 3 min bei 95°C denaturiert. Als Marker wurden peqGoldII (peqLab) für Coomassie-Gele oder peqGoldIV für Western Blots verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Lämmli-Laufpuffer bei 120 V für ca. 3 h.

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

Für die Markierung der Penicillin-bindenden Proteine wurden 7 μl Lysat mit 3 μl 10 μM Bocillin versetzt und für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 10 μl 2-fach Laemmli-Probenpuffer versetzt, 2 min bei 95°C inkubiert, kurz zentrifugiert und auf ein Gel geladen. Nach erfolgter Gelelektrophorese konnten die Bocillingele mithilfe des FluorImager 595 bei einer Wellenlänge von 488 nm gescannt werden. Anschließend folgte die Coomassie-Färbung dieser Gele, um die Proteinbanden sichtbar zu machen.

Tabelle 3.25: Zur Durchführung einer SDS-PAGE verwendete Puffer und Lösungen

<i>Komponente</i>	<i>Menge/Konzentration</i>
Natrium-Phosphatpuffer	
NaH ₂ PO ₄ (1 M)	42,3
Na ₂ HPO ₄ (1 M)	57,7
H ₂ O	ad 1 l
pH mit HCl auf 7,2 einstellen, autoklavieren, vor dem Gebrauch auf 20 mM verdünnen und Triton X-100 zugeben (Endkonzentration 0,2% (v/v))	

2x Lämmli-Probenpuffer	
H ₂ O _{dest}	1,875 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,875 ml
50 % Glycerin	3 ml
SDS	0,3 g
Bromphenolblau	0,2 mg
2-Mercaptoethanol	0,750 ml
5x Lämmli-Laufpuffer	
Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O _{dest}	ad 2l
Coomassie-Färbelösung	
Coomassie R-250	2 g
Coomassie G-250	50 mg
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1 l
über Nacht in einem geschlossenen Gefäß rühren, anschließend filtrieren	
Entfärber 1	
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1 l
Entfärber 2	
Methanol	100 ml
Essigsäure	50 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1 l

3.2.14.2 SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen

Durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) ist es möglich, Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der denaturierenden Wirkung von SDS (Natriumdodecylsulfat). Das anionische Detergenz bindet an die hydrophoben Bereiche der Proteinmoleküle. Durch diese irreversible Anlagerung an die Proteine werden die nicht kovalenten Wechselwirkungen aufgehoben und somit die Sekundärstruktur der Proteine zerstört. Dadurch lösen sich die Proteine ebenfalls aus Assoziationen mit anderen Protein- oder Lipidmolekülen. Das SDS bewirkt, wenn es in einem hohen molekularen Überschuss zugegeben wird, durch die negative Ladung eine vollständige Maskierung der Bruttoladung der Proteine. Nach Zugabe von SDS ist die Beweglichkeit der Proteine im elektrischen Feld allein abhängig von dem Molekulargewicht des Proteins ohne Einfluss der Ladung bzw. der Aminosäurezusammensetzung. Den Proben wird zusätzlich noch β -Mercaptoethanol zugegeben, welches als Reduktionsmittel wirkt, indem es die Disulfidbrücken in den Proteinen löst. Polypeptide, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, können dadurch einzeln analysiert werden.

In dieser Arbeit wurden diskontinuierliche SDS-Gele verwendet welche aus zwei unterschiedlichen Gelen bestanden, dem weitporigen Sammelgel und dem engporigem Trenngel. Die hergestellten Sammelgele hatten einen pH-Wert von 6,8. Bei diesem pH-Wert liegen die im Puffer vorhandenen Chlorid-Ionen (Leitonen) vollständig dissoziiert vor. Dadurch haben sie eine hohe Mobilität. Im Gegensatz dazu, ist ein pH von 6,8 nahe dem isoelektrischen Punkt von denen im Puffer enthaltenen Glycin-Ionen. Sie haben daher eine sehr geringe Mobilität. Beim Anlegen der elektrischen Spannung bildet sich nun ein Spannungsgradient zwischen den Leit- und Folgeionen, in dem die Proteine aufkonzentriert werden. Die in dieser Arbeit hergestellten Trenngele haben einen pH von 8,8. Bei einem pH-Wert von 8,8 kommt es nun an der Grenze von Sammel- und Trenngel dazu, dass auch die Glycin-Ionen vollständig dissoziiert werden. Die Glycin-Ionen überholen die Proteine, welche nun im Trenngel aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Die detaillierte Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele ist aus Tabelle 3.26 bzw. Tabelle 3.27 zu entnehmen.

Zum Gießen von Gelen wurden die Glasplatten mit Ethanol gereinigt und mit Spacern und je 4 Klammern auf der Seite zusammengesetzt. Die somit fixierten Glasplatten wurden in einen zuvor mit flüssiger 2 %-iger Agarose gefüllten Sockel gestellt. Nach Erkalten der Agarose, mit der die Glasplatten abgedichtet wurden, wurde das Trenngel (Tabelle 3.26 und Tabelle 3.27) zusammen pipettiert, zwischen die Platten pipettiert und mit H₂O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel (Tabelle 3.28) zwischen die Platten pipettiert und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel aus dem Agarose-Sockel genommen und in die Elektrophorese-Apparatur (Apparatur Eigenbau „Berlin“) eingebaut.

Wurden die Gele nicht sofort gebraucht, wurden sie in feuchte Tücher verpackt und bei 4°C gelagert.

Tabelle 3.26: Ansatzschema für ein Trenngel

% Gele		10	12,5	15
H ₂ O	(ml)	12	7,75	5,75
30% AA:0,8% BAA	(ml)	9,9	10,25	12,5
1,5 M Tris pH8,8	(ml)	7,5	6,25	6,25
10 % SDS	(µl)	300	250	250
10 % APS	(µl)	250	250	250
TEMED	(µl)	25	25	25

AA = Acrylamid

BAA = Bisacrylamid

APS = Ammoniumpersulfat

TEMED = Tetramethylethylendiamin

Zur besseren Auftrennung der PBPs (penicillin binding proteins) wurden Spezial Gele gegossen, die anstatt 0,3 % BAA nur 0,275 % enthalten. Die Zusammensetzung dieser Gele ist in Tabelle 3.27 aufgeführt.

Tabelle 3.27: Zusammensetzung des Trenngels bei Spezial-Gelen

% Gele		7,5
H ₂ O	(ml)	7
Rotiphorese ®Gel A*	(ml)	5
Rotiphorese ®Gel B**	(ml)	2,75
1,5 M Tris pH8,8	(ml)	5
10 % SDS	(µl)	200
10 % APS	(µl)	50
TEMED	(µl)	5

* 30 % Acrylamidlösung, C.Roth GmbH & Co

** 2 % Bisacrylamid, C.Roth GmbH & Co

Tabelle 3.28: Ansatzschema für ein Sammelgel

% Gele		5
H ₂ O	(ml)	8,55
30% AA:0,8% BAA	(ml)	2,55
1,5 M Tris pH8,8	(ml)	3,75
10 % SDS	(µl)	150
10 % APS	(µl)	75
TEMED	(µl)	7,5

3.2.14.3 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine auf eine Membran übertragen, auf der dann spezifische Proteine z.B mithilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können.

Edwin Southern entwickelte das sogenannte Southern Blotting, wobei DNA auf eine Membran geblottet wird. In Anlehnung daran nannte man das Blotten von Proteinen, erstmals etabliert von Renart (Renart *et al.*, 1979) und Towbin (Towbin *et al.*, 1979) Western Blotting.

Zuerst wurden die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. 3.2.14.2) und anschließend auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm) übertragen. Diese Membran musste vorher mit Methanol aktiviert werden und wurde anschließend bis zur Verwendung in Blotpuffer gelagert. (Tabelle 3.29). Nach der Auftrennung der Proteine wurde der Blot aufgebaut. Dabei wurden SDS-Gel und Membran luftblasenfrei zwischen - in Blotpuffer getränkte - Schwämme und Whatman-Filterpapier (3 mm, Schleicher und Schuell) gelegt und das Ganze in die Blotapparatur (Bio-Rad) geschoben, wobei die Membran im Blot zur Anode und das Gel zur Kathode zeigte. Um die Proteine zu blotten wurde für 3 h eine Spannung von 100 V angelegt und auf 15°C gekühlt.

Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran zum Blocken für 30 min bei Raumtemperatur in PBS/Tween (Tabelle 3.29) leicht geschwenkt. Nach dem Blocken wurde die Membran nochmals in frischem PBS/Tween für 2 min gewaschen. Anschließend wurde der Blot für 1 h bei Raumtemperatur in einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers (in PBS/Tween) geschwenkt. Der Antikörper bindet hierbei spezifisch an sein Antigen. Überschüssige Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen (2 min / 10 min / 2 min) entfernt und die Membran für 1 h in einer Verdünnung des sekundären Antikörpers (Anti-Rabbit, 1:30 000 in PBS/Tween, Sigma) schwenkend inkubiert. Der

sekundäre Antikörper, welcher mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert ist, bindet an den primären Antikörper. Der Überschuss an sekundärem Antikörper wurde anschließend ebenfalls durch mehrmaliges Waschen (2 min / 5 min / 5 min / 2 min) entfernt. Für die Färbereaktion wurde die Membran mit auf 37°C vorgewärmtem Blotsubstratpuffer (Tabelle 3.29) äquilibriert. Der Puffer wurde entfernt und durch 10 ml vorgewärmte (37°C) Blotfärbelösung (Tabelle 3.29) ersetzt. Die Alkalische Phosphatase reagiert mit dem NBT/BCIP in der Färbelösung, wodurch ein sichtbares dunkles Substrat entsteht. Die Färbung erfolgte im Dunkeln bei 37°C. Nach Erscheinen der Banden (nach ca. 5 - 10 min) wurde die Färbereaktion mit Wasser abgestoppt. Zur Durchführung eines Western Blots verwendete Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.29.

Tabelle 3.29: Für den Western Blot verwendete Puffer und Lösungen

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

3.2.14.4 Northern Blot

Ähnlich wie bei Western Blot und Southern Blot, werden auch bei Northern Blot Moleküle auf eine Membran übertragen. Hierbei handelt es sich um RNA, die auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen wird. Durch spezifische komplementäre Digoxigenin-markierte DNA-Sonden kann man bestimmte RNAs gezielt sichtbar machen.

3.2.14.5 PAGE zur Auftrennung von RNA

Die Auftrennung der RNA für den anschließenden Northern Blot erfolgte mithilfe eines 10%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgels (Tabelle 3.30). Die Gelapparatur (Apparatur Eigenbau „Berlin“) wurde mit 2 %iger Agarose abgedichtet. Das Gel wurde zusammen pipettiert und zwischen die Glasplatten gegossen. Im Gegensatz zum Western Blot ist das Gießen eines Sammelgels nicht notwendig. Zur Ausformung von Taschen wurde vor dem Aushärten ein Kamm in das Trenngel eingesteckt. Vor der Elektrophorese der Proben wurde die Gelapparatur mit TBE-Puffer (Tabelle 3.24) befüllt und die Taschen des Gels gespült um überschüssigen Harnstoff zu entfernen. Dies führt zu einer schärferen Auftrennung der RNA. Nach einem 30 minütigen Vorlauf (200 V) ohne Proben wurden die Taschen nochmals gespült und anschließend die Proben aufgetragen.

3 µg der Gesamt RNA wurde mit 2 x RNA-Ladepuffer (Fermentas) versetzt, 2 min bei 95°C im Thermoblock denaturiert und nach Beendigung des Vorlaufs auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V für 2-3 h. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 2 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und anschließend auf dem UV-Transilluminator (Appligene Oncor M-20) angeschaut und dokumentiert (Mitsubishi Video Copy).

3.2.14.6 Blotten der RNA

Für den Northern Blot wurde in 0,5x TBE-Puffer (Tabelle 3.24) angefeuchtetes Whatman-Papier und das Gel auf die Kathodenseite der Blotapparatur gelegt. Auf das Gel wurde eine positiv geladene Nylon Membran (Roche) sowie eine weitere Schicht feuchtes Whatman-Papier gelegt. Es folgte die Anodenseite der Blotapparatur, die durch ein zusätzliches Gewicht beschwert wurde. Zum Blotten der RNA wurde für 30 min eine Stromstärke von 400 mA angelegt, die regelmäßig überprüft und korrigiert wurde. Nach dem Blotten wurde die RNA durch UV-Crosslinking kovalent an der Membran fixiert. Hierzu wurde die Membran für 2min mit UV-Licht von 0,120 J/cm bestrahlt (BLX254, Biotech).

Zum Färben des Blots wurde die Membran zunächst mit der RNA-Seite nach innen in ein Hybridisierungsröhrchen mit 20 ml Prähybridisierungspuffer (Tabelle 3.30) gelegt und für 30 min bei 50°C im Hybridisierungsofen gedreht. Anschließend wurde der Puffer verworfen und durch Hybridisierungslösung mit den Digoxigenin-markierten Sonden (hergestellt mittels des DIG Oligonukleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd Generation, Roche) ersetzt und bei 50°C über Nacht drehend inkubiert. Die Digoxigenin-markierten Sonden binden dabei spezifisch an ihre komplementäre RNA. Die anschließenden Waschschrte erfolgten schwenkend in Plastikschälchen bei Raumtemperatur. Die Hybridisierungslösung wurde verworfen. Um Reste der Sonden zu entfernen wurde je 15 min mit jeweils zweimal Waschlösung 1 und zweimal Waschlösung 2 gewaschen (Tabelle 3.30). Zum Äquilibrieren wurde die Membran 1 min in Waschpuffer geschwenkt. Das anschließende

Blocken erfolgte für 30-60 min im Blocking Puffer (Tabelle 3.30). Im Anschluss wurde mindestens für 30 min mit der Anti-Digoxigenin-Antikörper-Verdünnung (1:5000 in Blocking Puffer, Roche) inkubiert. Bei diesem Schritt binden die Antikörper, welche mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert sind, an die Digoxigenin-markierten Sonden. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen für 15 min mit Waschpuffer entfernt. Vor dem Färben wurde die Membran für 1 min in Detektionspuffer (Tabelle 3.30) äquilibriert. Der Puffer wurde verworfen und durch 10 ml vorgewärmte (37°C) Blotfärbelösung ersetzt. Die Färbung selbst funktioniert analog zum Western Blot. Nach Erscheinen der Banden (nach ca. 5 - 15 min) wurde der Färbeprogang mit Wasser abgestoppt.

Tabelle 3.30: Für den Northern Blot verwendete Puffer und Lösungen

<i>Komponente</i>	<i>Menge/Konzentration</i>
10 %igen TBE-Acrylamidgels	
8 M Harnstoff in TBE	22,5 ml
30 % AA:0,8% BAA	7,5 ml
10 % APS	200 µl
TEMED	15 µl
Prähybridisierungspuffer	
SDS	5 %
NA ₂ HPO ₄	200 mM
Blocking Agent (10x)	1 ml
Hybridisierungslösung	
Prähybridisierungspuffer	20 ml
DIG-markierte Sonden (10 µM)	20 µl
SSC (20x)	
NaCl	3 M
Na ₃ Citrat	0,3 M
mit HCl auf pH 7,0 einstellen	
Waschlösung 1	
SSC	2x
SDS	0,1 %
Waschlösung 2	
SSC	0,5x
SDS	0,1 %
Waschpuffer	
Waschpuffer 10x (Roche)	1x in H ₂ O
Blocking Puffer	
Blocking Solution 10x (Roche)	1x in H ₂ O
Maleinsäurepuffer 10x (Roche)	1x in H ₂ O
Detektionspuffer	
Tris	0,1 M
NaCl	0,1 M
mit HCl auf pH 9,5 einstellen	

AA = Acrylamid
 BAA = Bisacrylamid
 APS = Ammoniumpersulfat
 TEMED = Tetramethylethyldiamin

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

In dieser Arbeit wurde die Suszeptibilität von *S. pneumoniae* gegen β -Laktamantibiotika mithilfe der sogenannten minimalen Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Als MHK wird hierbei die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums beschrieben, bei welcher kein sichtbares Wachstum des Versuchsorganismus nach einer Inkubation über Nacht auf Nähragarplatten erfolgt (Andrews, 2001). Zur Bestimmung der MHK wurden D-Blutagarplatten mit stufenweise steigender β -Laktamkonzentration des β -Laktamantibiotikums Cefotaxim (Tabelle 3.14) hergestellt (Tabelle 3.31). Die Bakterien wurden in C+Y-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 inkubiert, anschließend 1:1000 in Saline verdünnt und von dieser Verdünnung jeweils 30 μ l auf die D-Blutagarplatten aufgetropft. Die Platten wurden 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 betropften Stellen mittels: Sony DFW-X700 Digitalkamera.

Tabelle 3.31: Pipettierschema zur Herstellung von D-Blutagarplatten zur Bestimmung der β -Lactam Suszeptibilität

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

3.2.16 Analyse von Expressionsignalen in *S. pneumoniae*

Zur Analyse von Expressionsignalen wurden die Plasmide pPP2 (Pneumo-Promotor-Probe) (Halfmann *et al.*, 2007a) und pTP3 (Pneumo-Translations-Probe) (Schnorpfel *et al.*, 2013) verwendet. Hierbei war es möglich, durch β -Galaktosidaseassays, die unterschiedlichen Expressionssignale, indirekt über die Menge der gebildeten β -Galaktosidase in der Zelle zu bestimmen.

Beide Plasmide replizieren in *E. coli* und vermitteln durch das β -Laktamase Gen *bla* Resistenz gegen Ampicillin, worüber die Selektion erfolgt. Zusätzlich zu den Funktionen zur Replikation in *E. coli*, und den Ampicillin Resistenzgenen sind auf beiden Plasmiden Gene vorhanden, die eine Integration ins *S. pneumoniae* Genom ermöglichen.

Dafür sorgen die beiden unvollständigen Gene '*bgaA* und '*spr0564* aus *S. pneumoniae*. Diese flankieren die Reporterfusion von *lacZ* sowie *tetM*, ein Tetracyclinresistenz-vermittelndes Gen zur Selektion in *S. pneumoniae*. Über diese Gene erfolgt über homologe Rekombination die Integration

dieses Plasmidbereiches in das Genom von *S. pneumoniae*. Hierbei wird das native β -Galaktosidasegen *bgaA* (Abbildung 3.1) durch eine defekte Kopie ausgetauscht. Die Menge der in diesen Stämmen gebildeten β -Galaktosidase hängt somit ausschließlich von der Stärke der auf dem Plasmid klonierten Fragmente ab.

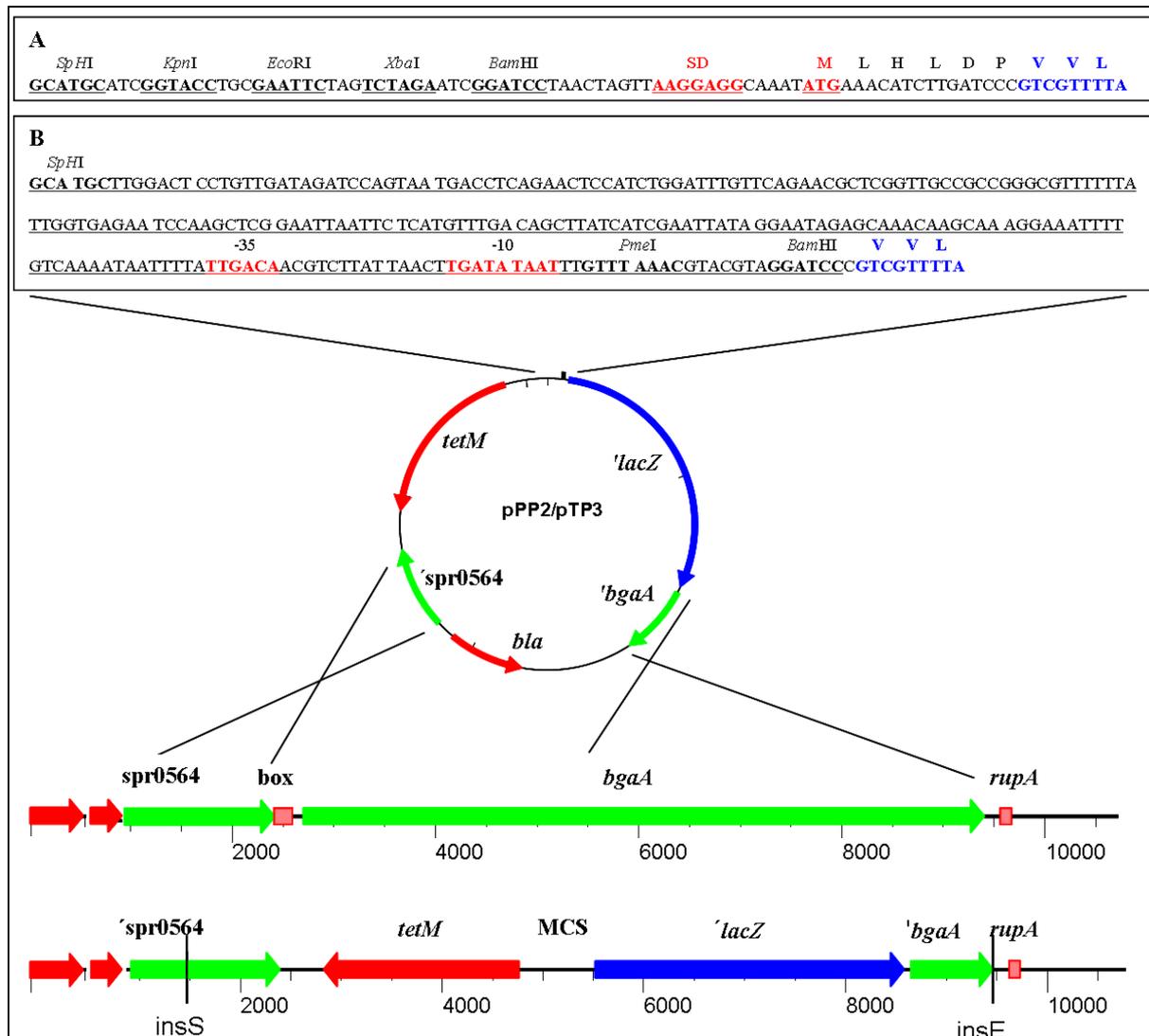


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der genetischen Organisation des Promotor-Probe-Plasmids (pPP2) (A) und des Translations-Probe-Plasmid (pTP3) (B) mit deren Integration ins Genom von *S. pneumoniae*.

Die Gene sind durch Pfeile gekennzeichnet: *bla*: β -Laktamase (Ampicillin Resistenz); *tetM*: Tetracyclin Resistenz; *'lacZ*: β -Galaktosidase; *'bgaA*: endogene, β -Galaktosidase; *rupA* und *box*: repetitive Elemente; *insS* und *insE*: Start und Ende der integrierten Plasmide.

Im Sequenzausschnitt A (pPP2) ist die 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 unterlegt. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme in der MCS sind unterstrichen. Die Aminosäuren 9-11 von *E. coli lacZ* sind blau gekennzeichnet.

Im Sequenzausschnitt B (pTP3) ist die Region stromaufwärts des Reportergens *'lacZ* gezeigt. Der gesamte *vegT*-Promotor ist unterstrichen. Die -35 und die extended -10 Region sind rot markiert. Die Aminosäuren 9-11 von *E. coli lacZ* sind blau gekennzeichnet.

Im Falle von pPP2 (Abbildung 3.1 A) wird der zu untersuchende Promotor vor das *lacZ* Gen kloniert. 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.

Im Gegensatz zu pPP2 ist es mithilfe des pTP3 (Abbildung 3.1 B) möglich Post-Transkriptionelle Regulation zu untersuchen. In diesem Fall ist dem *lacZ* Reportergen ein konstitutiv exprimierender Promotor vorgeschaltet (*vegT*), wodurch die Translationsaktivität der Gene unabhängig von der Aktivität ihrer Promotoren untersucht wird.

3.2.17 Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche β -Galaktosidaseassays durchgeführt, die allerdings beide auf dem Prinzip von Miller (Miller, 1972) basieren. Dabei wird die Menge an β -Galaktosidase indirekt über die enzymatische Spaltung des chromogenen Substrat *o*-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) zu Galaktose und *o*-Nitrophenol (ONP) bestimmt. Diese Reaktion wird durch das Enzym β -Galaktosidase katalysiert. Die Zunahme von *o*-Nitrophenol kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen werden und ist ein Maß für die Menge an β -Galaktosidase im Reaktionsansatz. Im Gegensatz zu der Methode nach Miller handelt es sich bei den hier durchgeführten Assays nicht um Endpunktassays, da die Zunahme der Extinktion bei 420 nm photometrisch über 15 min verfolgt wurde.

Die beiden in dieser Arbeit angewendeten Assays unterscheiden sich bezüglich ihrer Bezugsgröße. Wurden Messungen bei einer OD_{600} von mindestens 0,4 durchgeführt diente die Gesamtproteinmenge im Ansatz, die mittels Bradford Messung bestimmt wurde, als Bezugsgröße. Sollte die β -Galaktosidaseaktivität bei niedriger OD_{600} bestimmt werden wurde hierfür, wie auch bei Miller Assay, die optische Dichte herangezogen.

3.2.17.1 Durchführung des β -Galaktosidaseassay bei einer OD_{600} über 0,4

Zur Durchführung eines β -Galaktosidaseassays wurde eine Zellkultur in der Regel bis $OD_{600} = 0,4$ bzw. 0,8 herangezogen. 4 ml der Kultur, bei höherer Zelldichten $OD_{600} = 0,8$ 2 ml, wurden 2 min bei 14000 rpm abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C). Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet in 500 μ l Lysepuffer (Tabelle 3.32) resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend solange bei 37°C inkubiert, bis die Lyse sichtbar abgeschlossen war, d. h. bis der Ansatz klar wurde. Nach vollständiger Lyse wurden die Lysate bis zur Verwendung auf Eis gestellt. Zum Starten der Assays wurden 200 μ l Lysat im Photometer (UV-10 UV-Vis, Thermo Scientific) platziert und die Reaktion durch Zugabe von 800 μ l, auf 30°C vorgewärmtem ONPG (Tabelle 3.32) gestartet. Eine Messung erfolgte über einen Gesamtzeitraum von 15 min mit Messintervallen von 40 s.

Tabelle 3.32: Zur Durchführung des β -Galaktosidaseassays verwendete Puffer und Lösungen

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

3.2.17.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die gesamte Proteinkonzentration wurde mittels der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Hierfür wurde Roti®-Quant (Roth) verwendet, welches den Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G250 enthält. Dieser Farbstoff bildet in saurer Lösung Komplexe mit den kationischen sowie mit den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine. Durch die Komplexbildung wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionische Sulfonatform stabilisiert. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von vorher 470 nm auf 595 nm. Durch die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann die Bildung des Komplexes, was ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung darstellt, mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Als Referenz wurde hier ebenfalls Lysepuffer verwendet. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 10 μ l des Lysats mit 90 μ l Z-Puffer (Tabelle 3.32) versetzt. Zu diesem Ansatz wurden 700 μ l Z-Puffer und 200 μ l RotiQuant gegeben und der Ansatz für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gegen die Referenz gemessen.

3.2.17.3 Auswertung des β -Galaktosidaseassays bei einer OD₆₀₀ über 0,4

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

$$\text{Units} = \frac{s * V}{\epsilon * d * m} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{min} * \text{mg}} \right)$$

s = Steigung der Absorptions-Zeit-Geraden = (Δ OD₄₂₀/ Δ t [1/min])

V = Reaktionsvolumen

ϵ = Absorptionskoeffizient von o-Nitrophenol bei 420 nm = 4,5 * 10³ [l/mol * cm]

d = Lichtweg = Dicke der Küvette = 1cm

m = Masse des Proteins im Ansatz [mg]

33.2.17.4 Durchführung des β -Galaktosidaseassay bei einer OD_{600} unter 0,4

Zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität bei niedriger OD wurde ein anderer Ansatz gewählt. Hier wurde ebenfalls das entsprechende Medium 1 % mit einer Glycerinkultur beimpft und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach 5 min und alle 30 min wurden Proben gezogen, indem 640 μ l entnommen und mit 160 μ l 5x Lysepuffer (Tabelle 3.33) versetzt wurden. Der Ansatz wurde mindestens 10 min, bis die Lyse sichtbar abgeschlossen ist, inkubiert und bis zur Verwendung auf Eis gehalten. Anschließend wurde das Lysat vollständig in eine Küvette gegeben, diese im Photometer platziert und die Reaktion durch Zugaben von 200 μ l vorgewärmten ONPG (Tabelle 3.33) gestartet. Eine Messung erfolgte über einen Gesamtzeitraum von 15 min mit Messintervallen von 40 s.

Tabelle 3.33: Zur Durchführung des β -Galaktosidaseassays verwendete Puffer und Lösungen

<i>Komponente</i>	<i>Konzentration</i>
5 x Z-Puffer	
Na ₂ HPO ₄	300 mM
NaH ₂ PO ₄	200 mM
MgSO ₄	5 mM
KCl	50 mM
β -Mercaptoethanol	10,8 ml/l
5 x Lysepuffer	
Z-Puffer	
TritonX100 (Stammlsg 10 %)	0,5 %
ONPG	
ONPG	4 mg/ml in Z-Puffer (Tabelle 3.31)

3.2.17.5 Auswertung des β -Galaktosidaseassays bei einer OD_{600} unter 0,4

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

$$\text{Units} = 1000 * \frac{\Delta OD_{420}}{\Delta t * V * OD_{600}}$$

V = Reaktionsvolumen

$\Delta OD_{420} = OD_{420} t(x) - OD_{420} t(y)$ (wobei $x > y$)

t = Zeit $\Delta t = t(x) - t(y)$

3.2.18 Microarray-gestützte Transkriptomanalyse

Ein Microarray-Chip besteht aus Nukleinsäuremolekülen, die matrixartig auf einem Objektträger immobilisiert sind. An diese DNA-Moleküle hybridisieren die zu untersuchenden Nukleinsäuren, welche zuvor Fluoreszenz markiert werden. Diese Hybridisierungssignale können dann detektiert, quantitativ erfasst und bioinformatisch ausgewertet werden. In dieser Arbeit wurde präparierte RNA (siehe 3.2.5.2) unter Einbau fluoreszenzmarkierter Nukleotide mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wurden mit synthetischen Oligonukleotiden auf Glaträgern (Slides) hybridisiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe für zwei verschiedene cDNA-Populationen, die parallel auf einem Array hybridisiert, detektiert und verglichen werden bezüglich der Signalstärke bei unterschiedlicher Wellenlänge, konnten Unterschiede im Expressionsmuster untersucht werden. Die Fluoreszenzsignale zeigen die Gene an, die nur mit einer oder beiden DNAs hybridisieren. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Gene in Form von 70mer Oligonukleotiden auf dem Chip vorhanden sind. Somit kann ein Gen, das nur teilweise und außerhalb dieses Bereiches ausgetauscht ist, nicht detektiert werden. Die Durchführung dieser Microarray-gestützten Transkriptomanalyse wird im Folgenden näher erklärt.

3.2.18.1 Das *Streptococcus pneumoniae* R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set

Die Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Microarray-Experimente ist ein, in Kooperation mit der Firma Operon konzipiertes, Oligonukleotid-Set, welches insgesamt 2963 Oligonukleotide umfasst (<http://www.nbz.uni-kl.de/de/bio/microarray/r6igr4oligos.html>). Der Chip enthält 2038 Oligos, spezifisch für in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 annotierte Gene, sowie 328 Oligos für intergene Bereiche in *S. pneumoniae* R6. Weiterhin enthält das OligoSet Oligos für 309 *S. pneumoniae* TIGR4 spezifischen Gene und 160 intergene Regionen aus *S. pneumoniae* TIGR4. Dazu kommen 44 Oligos für repetitive Elemente, transfer RNA (tRNA), ribosomale RNA (rRNA), das *pbp2x* von *S. pneumoniae* 2349 und 84 Oligos für diverse Kontrollen (Positiv-, Negativ-, Stringenz-, Alien- und Eukaryotische Gen-Kontrollen). Als weitere Negativkontrollen dienen 163 Pufferkontrollen ohne Oligo. Bei den Oligos handelt es sich um 70meren Sense-Oligonukleotide, die am 5'-Ende einen Amino-C6-Linker besitzen, welcher eine kovalente Bindung zu den verwendeten Epoxybeschichteten Nexterion HiSense Slides E (SCHOTT, Jena) eingeht. Die Oligos sind in jeweils 30 µl Spottingpuffer (3 x SSC, 1,5 M Betain) gelöst, so dass sie in einer Endkonzentration von 10 µM vorliegen. Die Platten wurden bei -20°C, versiegelt in Adhäsionsfolie (SealPlate, EXCEL Scientific), aufbewahrt.

3.2.18.2 Spotten der Slides

Zum Spotten der Slides wurde das SpotArray™24 Microarray Spotting System BioChipTechnologies (Packard BioScience) und die dazugehörigen Software, SpotArray™(PerkinElmer) mit 32 SMP3-Pins (Telechem) verwendet. Dieser Spotter arbeitet nach der

Technologie des Kontakt-Spottings, bei der die Oligos mit speziellen Dispensiernadeln(Pins) aus den Mikrotiterplatten aufgenommen und anschließend durch mechanischen Kontakt mit der Trägeroberfläche aufgetragen werden. Vor dem Spotten wurde ein *.gal-File erstellt, der die Information über die genauen Positionen der Oligos auf dem Slide liefert. Nach dem Printvorgang kann somit jeder Spot einem Oligonukleotid zugeordnet werden. Die 70mer Oligonukleotide wurden in 384-well Platten geliefert und in 30 µl Spotting Puffer (3 x SSC, 1,5 M Betain) gelöst, so dass die Endkonzentration der Oligos 10 pmol/µl betrug. Zur Fehlervermeidung wurde jedes Oligonukleotid zweimal nebeneinander gespottet, bei einer relativen Luftfeuchte von 50-70 %. Vorher wurden die Slides mit einem Diamantschreiber beschriftet, mithilfe einer Druckluftpistole von Staubpartikeln befreit und in die Spottingkammer gelegt. Das Abtupfen der Pins erfolgte auf sogenannten Blockingslides. Bei diesen handelte es sich um gewöhnliche mit Ethanol (70 %) gesäuberte Objektträger. Die Mikrotiterplatten mit den Oligonukleotiden wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, für 2 min bei 800 rpm abzentrifugiert (Hermle Z 513 K, Axon) und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Die in der SpotArraySoftware eingestellten Parameter sind in Tabelle 3.34 aufgeführt. Nach dem Spotten wurden die Slides, zur Immobilisierung für 30 min in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss 60 min bei 85°C gebacken. Hierbei bilden sich kovalente Bindungen zwischen den Amino-C6-Gruppen am 5'-Ende der Oligos und den Epoxy-Gruppen auf der Slideoberfläche. Die DNA-Chips wurden bis zur Verwendung trocken und dunkel bei Raumtemperatur aufbewahrt. Auf den derart hergestellten DNA-Chips befanden sich alle Oligos und Pufferkontrollen, wie zuvor erwähnt in jeweils 2-facher Ausführung in der SpotArray™-Software festgelegten Anordnung. Dabei entsprach die Anordnung der genspezifischen Oligos nicht ihrer Abfolge im Genom von *S. pneumoniae* und auch die Kontrolloligos und Pufferkontrollen waren zufällig auf den Chips verteilt.

Tabelle 3.34: Spotting Protokoll der ScanArraySoftware

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

Speed of printhead X-Y motion	fast
Lenght of wash procedure [s]	6
Number of times to wash	4
Lenght of dry procedure after washing [s]	3
Do not print when humidity is outside of acceptable range	yes
Minimum acceptable humidity [% RH]*	50
Maximum acceptable humidity [% RH]*	70
Control humidity level during printing procedure	yes
Target humidity level [% RH]*	65
Do not print when temperature is outside of acceptable range	yes

*RH=relative humidity

3.2.18.3 Herstellung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben

Zum Vergleich der Transkriptomte zweier *S. pneumoniae* Stämme müssen die beiden RNA-Populationen, die mittels Hot Phenol Methode (siehe 3.2.5.2) extrahiert wurden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf einem Array parallel hybridisiert werden. Für die statistische Analyse der Transkriptomdaten wurden drei Arten der Wiederholung vorgenommen: eine Replikation der Hybridisierung von cDNA auf demselben DNA-Chip (Replicate spote), eine wiederholte Hybridisierung von cDNA aus derselben Präparation (Dye-Swap) und eine wiederholte Hybridisierung von cDNA aus einer unabhängigen Präparation (Biological replicates). Die unterschiedlichen Eigenschaften der Farbstoffe, Fluoreszenzintensität und Einbau bei der cDNA-Synthese werden durch den Dye-Swap berücksichtigt. Hierbei wird dieselbe cDNA verwendet, aber der Farbstoff ausgetauscht.

Die isolierte und gereinigte Gesamt-RNA (siehe 3.2.5.2) wurde mithilfe des LabelStar™ Array-Kit (50, Qiagen) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Während dieser reversen Transkription erfolgt der Einbau der fluoreszenzmarkierten Desoxycytidintriphosphaten (dCTP) (Cy3-dCTP und Cy5-dCTP) in die entstehende cDNA. Die RNA-Lösungen der beiden zu vergleichenden Stämme wurde zunächst durch eindampfen in der SpeedVac (UNIVAPO 100 H, UniEquip) auf eine Konzentration von 3 µg/ml eingestellt und das Pellet in 18 µl H₂O (RNase free) aufgenommen. Zu den eingestellten RNAs wurden 2 µl Denaturierungs-Lösung (Denaturation Solution Plus) und 1 µl Random-Oktamer-Primer (100 µM, MWG) gegeben, die Ansätze für 5 min bei 65 °C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt. Die Markierung und mittels reverser Transkription erfolgte nach Zugabe von 29 µl Mastermix. Dieser Mastermix enthielt: Puffer, dNTP-Mix, RNase Inhibitor, Reverse Transkriptase und RNase-freies H₂O und einen der beiden Farbstoffe (Cy5 oder Cy3). Hierbei wurden jeweils einem der beiden Ansätze eines Stammes Mastermix mit Cy3-dCTP, dem anderen Mastermix mit Cy5-dCTP zugegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Mittels der im Kit enthaltenen Aufreinigungssäulen wurden die Ansätze nach Herstellerangaben gereinigt und zweimal in 15 µl Elutionspuffer eluiert. Die Ansätze wurden vollständig in der SpeedVac eingedampft und die Pellets dunkel bei -20°C gelagert.

3.2.18.4 Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben

Die Hybridisierung erfolgte mithilfe der Hybridisierstation (HS 400 und HS 400 Pro, Tecan) nach dem in Tabelle 3.35 gezeigten Protokoll. Die markierten cDNA-Pellets wurden in jeweils 55 µl auf 95°C erhitzten Hybridisierungspuffer aufgenommen, die Ansätze für 5 min bei 95°C im Thermoblock (HLC) inkubiert und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde jeweils eine Cy3-markierte Probe des einen Stammes mit der Cy5-markierten Probe des anderen Stammes gemischt und für weitere 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Ansätze noch mal kurz abzentrifugiert und zum Zeitpunkt des Programms „Injektion der Probe“ auf den entsprechenden DNA-Chip appliziert.

Tabelle 3.35: Verwendetes Hybridisierungs-Protokoll

<i>Schritt</i>	<i>Komponente</i>	<i>Waschdauer</i>	<i>Einwirkdauer</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zyklen</i>
1 Waschen	SDS (0,1%)	30 s	30 s	25 °C	1
2 Waschen	H ₂ O	30 s		25 °C	1
3 Waschen	PHP*	10 s	30 min	42 °C	1
4 Waschen	PHP*	20 s		40 °C	1
5 Injektion der Probe				40 °C	
6 Hybridisierung			16 h	40°C	
7 Waschen	SSC/SDS (2x/0,1%)	1 min	30 s	30 °C	2
8 Waschen	SSC (1x)	1 min	30 s	30 °C	2
9 Waschen	SSC (0,1 %)	1 min	30 s	30°C	1
10 trocknen der Objektträger			2 min	30 °C	

* PHP = Prähybridisierungspuffer

Die zur Hybridisierung verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3.36 zu entnehmen.

Tabelle 3.36: Lösungen zur Hybridisierung

<i>Komponente</i>	<i>Konzentration</i>
SSC (20x)	
NaCl	3 M
Na-Citrat	0,3 M
pH 7 mit NaOH einstellen, autoklavieren	
Prähybridisierungspuffer	
SSC	4x
SDS	0,1 %
BSA (sterilfiltriert)	0,1 mg/ml
SDS	0,1 %
SSC/SDS	
SSC	2x
SDS	0,1 %
SSC	1x
SSC	0,1x

Hybridisierungspuffer	
Nexterion®Hyb (Peqlab)	1 Vol
Formamid	1 Vol
bei -20°C lagern	

3.2.18.5 Scannen der hybridisierten Slides

Die hybridisierten Slides wurden mithilfe des Laserscanners (ScanArray® GX Microarray, PerkinElmer Life Sciences, USA) eingescannt. Hierbei wird der Chip mit zwei Lasern verschiedener Wellenlänge gescannt. Der Farbstoff Cy3 wurde mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 543$ nm angeregt und die Emission bei $\lambda = 570$ nm gemessen. Cy5 wurde entsprechend bei $\lambda = 633$ nm angeregt und bei $\lambda = 670$ nm gemessen. Mithilfe der Option „EasyScan“ der Software ScanArray® Express (Version 3.0, 2004, PerkinElmer) wurde der Chip zunächst mit einer niedrigen Auflösung von 50 μm gescannt. Dabei wurden die Photomultiplier Tube (PMT)-Stärke eingestellt, so dass beide Fluoreszenzkanäle in etwa die gleiche Signalintensität lieferten. Anschließend wurde der Chip mit einer hohen Auflösung von 10 μm und den ermittelten PMT-Werten gescannt, wobei für jeden Kanal eine Bilddatei (*.tif-Datei) erstellt und gespeichert wurde. Für die Visualisierung und anschließende Auswertung der Hybridisierungsergebnisse wurden beide Bilder übereinander gelegt.

3.2.18.6 Auswertung und Analyse der Microarray Daten

Die Auswertung der Microarray Daten erfolgte mit der Software ScanArray® Express (Version 3.0, 2004, PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA), Microsoft® Excel 2003 (1985-2003) und diversen Anwendungen, die auf der Homepage des Nano+Bio Center der TU Kaiserslautern zur Verfügung stehen. Hierzu wurden die beiden *.tif-Dateien der Fluoreszenzkanäle geöffnet und das durch Überlagerung dieser Dateien von der Software erzeugte „Composite“-Bild, wenn nötig, mit Filtern (3x3 Median, Black threshold) optimiert. Die Quantifizierung, Normalisierung und Zuordnung der Spots erfolgte mithilfe des Quantifizierungstyp „Easy Quant“, der Quantifizierungsmethode „Adaptive circle“, der Normalisierungsmethode „Locally Weighted Scatter Plot Smoothing (LOWESS) (Yang Y. H. *et al.*, 2001) und der Zuordnungsmethode „Auto find Spots“. Dabei wurde das beim Printing der DNA-Chips erstellte *.gal-File (3.2.18.2), auf welchem die Position jedes Oligos auf dem Chip vermerkt ist, geladen und die aktuelle Lage der Spots dem Raster angepasst. Die Zuordnung der Spots erfolgte über die Software, wurde aber gegebenenfalls manuell korrigiert. Die Ergebnistabelle, die unter anderem die Oligonamen und die Intensität enthielt, wurde als *.csv- und *.gpr-Datei gespeichert und in Microsoft® Excel 2003 bearbeitet. Anschließend wurden alle Oligos, die nicht gefunden wurden oder von schlechter Qualität waren, herausgefiltert. Nach Überprüfung der Kontrolloligos wurden diese ebenfalls entfernt und die weitere Auswertung mithilfe diverser Anwendungen auf der Homepage des Nano+Bio Center der TU Kaiserslautern durchgeführt. Zunächst wurden aus den Intensitätswerten der beiden Fluoreszenzkanäle mit der Normalisierungsmethode „Global Loess“ (Cleveland, 1979) durch die Anwendung „Global normalization of microarray data with loess“ die entsprechenden normalisierten Verhältnisse der Intensitäten (Normalized ratios)

3.2.20 Konstruktion der mutierten *comC*-Translationsfusionen

In dieser Arbeit wurden verschiedene *comC-lacZ* Mutationen hergestellt um den negativen Effekt der csRNAs auf die natürliche Kompetenz genauer zu untersuchen. Durch unterschiedliche Veränderungen der Zielgen mRNA sollte so die Bindung der csRNAs an diese mRNA untersucht werden. In Abbildung 3.3, ist die durch Zuker (Zuker, 2003) ermittelte Bindung der csRNAs, in diesem Beispiel csRNA4 an die *comC* mRNA gezeigt.

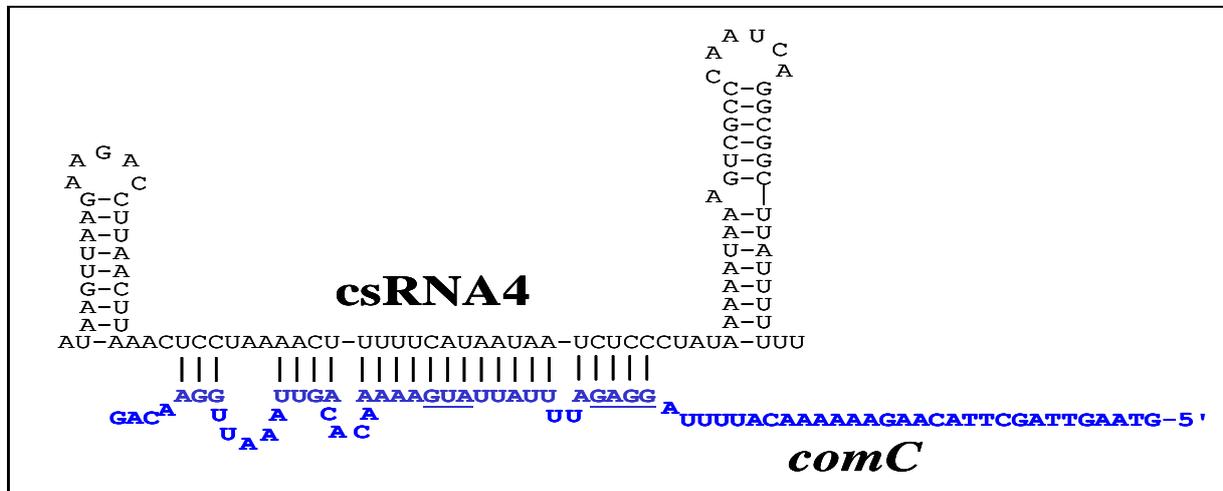


Abbildung 3.3: Nach Zuker (Zuker, 2003) ermittelte Bindung der csRNA4 an die *comC* mRNA.

Die mögliche Bindung aller csRNAs an die *comC* mRNA ist sehr ähnlich, daher wurde hier vereinfacht nur die Bindung zu csRNA4 gezeigt.

Bei der ersten Mutation, *comC*-M wurde das *comC* direkt hinter dem Startcodon an das *lacZ*-Gen fusioniert. Dadurch entfällt der Interaktionsbereich downstream des Startcodons. Die Sequenz ist in Abbildung 3.4 A dargestellt.

Die zweite Mutation *comC*8, wurde so konstruiert, dass der Bereich zwischen der Shine-Dalgarno-Sequenz (GGAG) und dem Startcodon nicht mehr in der Lage ist eine Bindung mit den csRNAs einzugehen. Die Sequenz dieser Mutation ist in Abbildung 3.4 B dargestellt.

Die dritte Mutation, *comC*13 enthält dieselbe Mutation wie *comC*8 zwischen der Shine-Dalgarno-Sequenz und dem Startcodon, des Weiteren ist die Shine-Dalgarno-Sequenz selbst verändert. Abbildung 3.4 C zeigt die Sequenz von *comC*13.

Eine letzte *lacZ*-Fusion *comC*-L wurde erstellt, bei der die ersten beiden Guanin der mRNA, welche für die Ausbildung der ersten Stammschleife verantwortlich sind, zu zwei Adinin geändert wurden. Hierdurch kommt es nicht zur Ausbildung der ersten Stammschleife, was die Stabilität der mRNA beeinflusst. In Abbildung 3.4 D ist die Sequenz der mutierten *comC*-L-*lacZ*-Translationsfusion gezeigt.

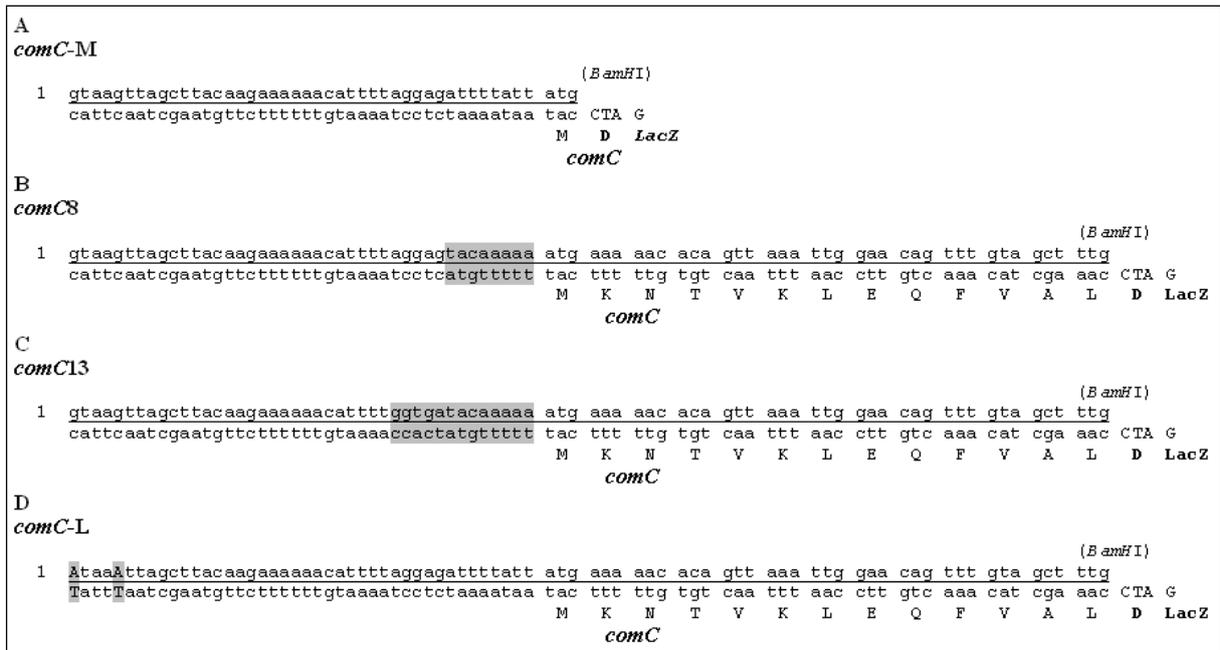


Abbildung 3.4: Nukleotidsequenz der veränderten *comC-lacZ* Translationsfusionen.

Gezeigt sind die in dieser Arbeit konstruierten Mutationen in der *comC* mRNA von dem Transcriptionsstart an (1), *comC-M* (A), welches direkt nach dem Methionin an das *lacZ* fusioniert wurde. Des Weiteren sind die Veränderungen in *comC8* (B), *comC13* (C) und *comC-L* (D) grau hinterlegt. Die Aminosäuresequenz der Codons, welche in Frame an das *lacZ* fusioniert wurden ist ebenfalls gezeigt. Alle Mutationen wurden über *PmeI* und *BamHI* in das pTP4 (Abbildung 3.2) eingebracht und werden somit durch P_{vegT} exprimiert.

Zur Konstruktion dieser veränderten *lacZ*-Translationsfusion wurden ebenfalls synthetisierte Oligonukleotide (Firma Eurofins MWG Operon) (Tabelle 3.9) verwendet. Für die Konstruktion von *comC-M* die Oligonukleotide: *comC-met-for* und *comC-met-rev*, für *comC8*: *comC-l-mut1-for* und *comC-l-mut1-rev*, für *comC13*: *comC-l-mut2-for* und *comC-mut2-rev2* und für *comC-L*: *comC-stem-loop1* und *stem-loop1-rev2* (Tabelle 3.9).

Die Oligonukleotide wurden 1:10 in H_2O verdünnt und im Verhältnis 1:1 zusammengegeben und 1 min auf 98°C erhitzt. Beim anschließenden Abkühlen für 1 min lagern sich die Oligos mit ihren komplementären Bereichen aneinander. Im Anschluss folgte eine Phosphorylierung (3.2.10) und eine Ligation (3.2.11) in den mit *PmeI* und *BamHI* geschnittenen Vektor pTP4 (3.2.19). Diese Ligation wurde direkt in verschiedene *S. pneumoniae* transformiert, da es nicht möglich war die ligierten Plasmide in *E. coli* zu vermehren. Zur Selektion in *S. pneumoniae* wurden den Platten Tetracyclin (Tabelle 3.14) und X-Gal zugegeben. Mittels PCR (3.2.7) und DNA Sequenzierung (3.2.13) wurden die Transformanten überprüft.

Des Weiteren wurde die Wildtyp *comC-lacZ* Translationsfusion pTP3-*comC* (Kovács, 2009) in verschieden Stämme transformiert und als Kontrolle vermessen.

3.2.21 Konstruktion der Stämme mit verändertem *comC*

Die in Abschnitt 3.2.20 beschriebene *comC8* Variante, sollte unter Verwendung der Janus-Kassette (Sung *et al.*, 2001) in das Genom diverser *S. pneumoniae* Stämme integriert werden. Hierbei wird das Wildtyp *comC* durch die veränderte Variante ersetzt.

Die Janus-Kassette besteht aus dem Kanamycinresistenzgen *aphIII* und dem dominant-Streptomycinsensitivität-verleihenden Wildtyp-Allel des Gens *rpsL*. Diese spezielle Konstruktion ermöglicht eine Selektion sowohl beim Einbringen der Kassette, als auch bei ihrem Entfernen.

Die Voraussetzung für die Benutzung dieser Kassette ist, dass der verwendete Stamm das *rpsL41*-Allel (Salles *et al.*, 1992) im Genom trägt, welche Streptomycinresistenz verleiht. Der Austausch eines Gens mithilfe der Janus-Kassette erfolgt in zwei Schritten.

Im ersten Schritt wird die Janus-Kassette durch Selektion auf Kanamycin ins Genom eingebracht. Der entstehende Stamm ist somit Kanamycin resistent. Weiterhin verleiht das zusätzliche dominante *rpsL*-Allel Streptomycin Sensitivität.

Durch homologe Rekombination wird im zweiten Schritt die Janus-Kassette gegen das gewünschte DNA Stück ausgetauscht, wobei die Selektion auf Streptomycin erfolgt.

Um die veränderte *comC8* Variante im Genom verschiedener *S. pneumoniae* Stämme gegen das Wildtyp-Allel auszutauschen musste dieses zuerst durch die Janus-Kassette ersetzt werden. Hierzu wurde DNA des Stammes *S. pneumoniae* R1029 (Sung *et al.*, 2001) verwendet. In diesem Stamm wurde *comC* bereits gegen die Janus-Kassette ausgetauscht. Mithilfe der Primer *comC_fwd_kontr* und *comC_rev_janus* (Tabelle 3.10) wurde das Fragment *comC::janus* aus diesem Stamm amplifiziert. Anschließend wurde dieses PCR-Produkt in Stämme transformiert, die zuvor durch eine Transformation das *rpsL41*-Allel (RKL242) erhalten hatten.

Anschließend wurden zwei Fragmente mithilfe von Mutagenese Primern amplifiziert. Die entstandenen Fragmente enthalten jeweils einen überlappenden homologen Teil des *comC8DE* Operons mit entweder dem up- oder downstream Bereich für die homologe Rekombination. Die hierfür verwendeten Primer waren Fragment 1: *comC_fwd_kontr* und *Janus_mut1_rev*, Fragment 2: *ComC_rev_janus* und *Janus_mut1_fwd*. Die Sequenzen sind Tabelle 3.10 zu entnehmen. Durch die überlappenden homologen Teile der Fragmente ist es möglich, diese in einer weiteren PCR, überlappenden PCR zusammenzufügen (3.2.7.1). Das so entstandene Fragment wurde nun in die Stämme *comC::janus* transformiert. Das so entstandene *comC8DE* Operon wurde durch Sequenzierung überprüft (3.2.13).

Zur Konstruktion des Wildtyp R6 in Kombination mit dem *comC8DE* auf dem Genom wurde eine etwa andere Strategie gewählt. Hierfür wurde in den Stamm RKL347, welcher das hyperaktive *ciaH202*-Allel und die *comC8DE* Variante enthält, das über PCR amplifizierte *ciaH::janus* Konstrukt eingebracht. Dieses wurde mit den Primern *CiaHup_f* und *CiaHdown_r* (Tabelle 3.7) aus dem Stamm R6 *ciaH::janus* (Schmitt, 2006) amplifiziert und transformiert. Anschließend mit denselben Primern

das Wildtyp *ciaH*-Allel aus R6 amplifiziert und dieses in den entstanden Stamm eingebracht. Damit die Kompetenzentwicklung mittels β -Galaktosidase-messung in diesem Stamm untersucht werden konnte, wurde das Promotorplasmid P_{comX} eingebracht.

3.2.22 Konstruktion der Stämme mit ektopische Expression der csRNAs

Für Komplementationsstudien wurden Stämme konstruiert, welche nur eine der csRNAs exprimieren. Hierfür wurden die integrative Plasmide pCcnA, pCcnB, pCcnC, pCcnD, pCcnE, pVccnA, pVccnB, pVccnC, pVccnD und pVccnE verwendet, welche alle ein Derivat des Plasmids pSW1 (Denapaitte & Hakenbeck, 2011) bzw. pEXP1 darstellen. In den Plasmiden pCcnA-pCcnE sind die csRNAs mit ihren jeweiligen nativen Promotor enthalten (Schnorpfeil *et al.*, 2013). In den Plasmiden pVccnA-pVccnE steht die Transkription der csRNAs unter Kontrolle des konstitutiven Promotor *vegT* (Backes, 2010; Gartmann, 2010; Hummes 2010; Kaysen, 2010; Vatter, 2010).

pSW1 und pEXP1 sind Plasmide (Abbildung 3.5), die zum einen in *E. coli* repliziert werden und zum anderen in das Genom von *S. pneumoniae* integrieren können. Beide Plasmide enthalten das Gen *bla*, welches für eine β -Laktamase kodiert und die Selektion in *E. coli* ermöglicht. Ein weiteres Resistenzgen in den Plasmiden ist *tmp*, welches nach der Integration der Plasmide in das Genom von *S. pneumoniae*, Trimethoprimresistenz vermittelt. Über die Gene *bgaA* und *spr0566-spr0568*, welche aus *S. pneumoniae* stammen, kommt es zur homologen Rekombination. Durch diesen Doppel-Cross-over werden alle Gene, welche in den Plasmiden zwischen *bgaA* und *spr0566-spr0568* liegen, in das Genom von *S. pneumoniae* eingebaut. Die beiden Primer pBP4_f und pPB5_r können sowohl für eine die Amplifikation der MCS verwendet werden.

Bei pEXP1 handelt es sich um ein Derivat pSW1 in welches der Promotor P*vegT* in die MCS über die Restriktionsschnittstellen *SalI* und *BamHI* eingebracht wurde. Dieser Promotor ist konstitutiv aktiv und besitzt direkt am +1 eine Restriktionstelle für das Enzym *PmeI*. Dadurch ist es möglich, Gene an dieser Stelle einzubringen, deren Transkription durch den konstitutiv aktiven Promotor *vegT* kontrolliert wird. Die Promotorstärke von P*vegT* liegt bei ca. 600 Miller Units.

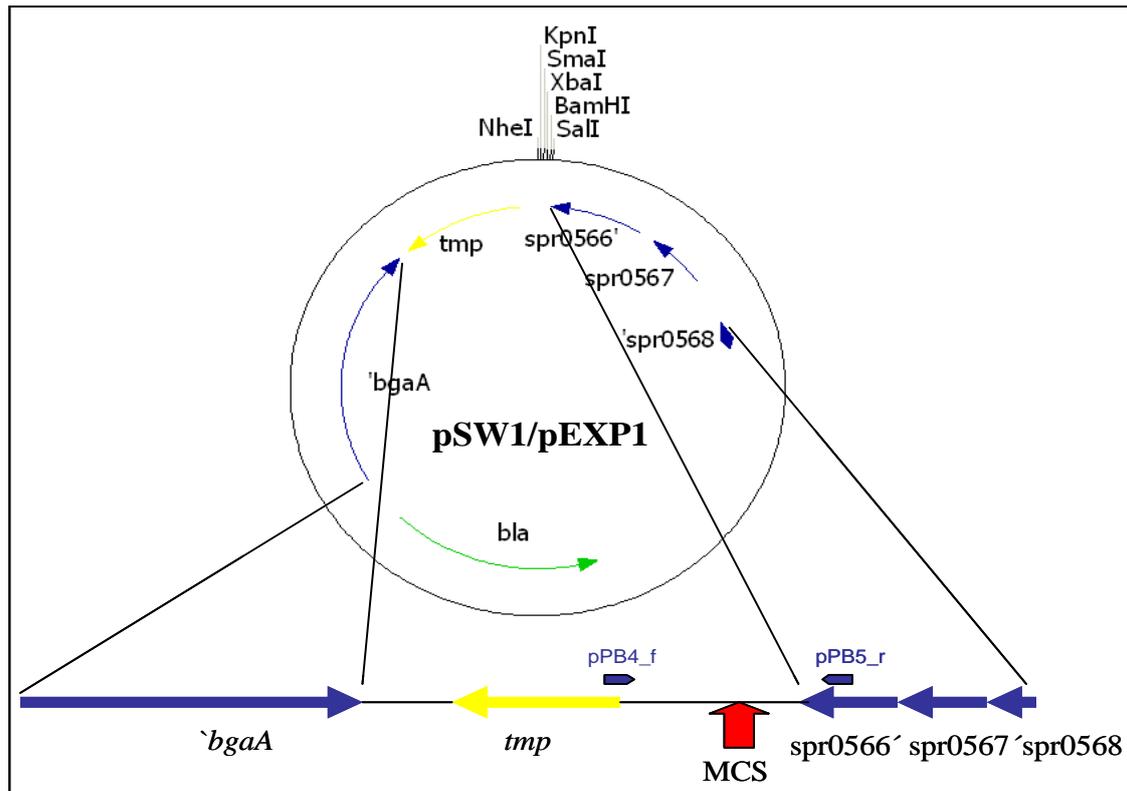


Abbildung 3.5: Genetische Organisation des Integrationsplasmids pSW1/pEXP1 und deren Integration in das *S. pneumoniae* Genom.

Oben: Genkarte der pSW1/pEXP1 Plasmide. Unten: Genetische Karte der Region zwischen *bgaA* und *spr0568* in *S. pneumoniae* nach der Integration von pSW1/pEXP1. Die einzelnen Gene auf dem Plasmid und dem Genom sind durch Pfeile gekennzeichnet. *bla*: β -Laktamase (Ampicillin Resistenz), '*bgaA*', Teil des β -Galaktosidase Gens, *tmp*: Trimethoprim Resistenz, *spr0566*-*spr0568*: Funktion nicht bekannt, *lacZ*: β -Galaktosidase Gen. Im Unterschied zu pSW1 enthält pEXP1 den konstitutiven Promotor *PvegT*, welcher über *SalI* und *BamHI* eingebracht wurde. Die MCS ist durch einen roten Pfeil markiert. Mit violetten Pfeilen sind die beiden Primer pPB4_f und pPB5_r, welche zum amplifizieren der MCS verwendet werden, markiert.

Diese Plasmide wurden in *S. pneumoniae* Stämme transformiert, in denen zuvor alle csRNAs mithilfe der Cheshire-Kassette aus dem Genom deletiert wurden. Somit wurden Stämme erhalten, die nur eine der csRNAs, entweder unter Kontrolle des nativen oder des konstitutiven Promotors, exprimieren.

3.2.23 Konstruktion des Integrationsvektor pSW2

Um sicher zu stellen, dass beobachtete Effekte auf die Expression einzelner csRNAs, welche über pSW1 (Abbildung 3.5) in das Genom integriert wurden, zurück zu führen sind, sollte diese im Genom deletiert werden. Hierfür wurde das Integrationsplasmid pSW2 konstruiert. Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein Derivat von pSW1, welches an derselben Stelle wie pSW1 in das Genom von *S. pneumoniae* integriert. Dadurch ist es möglich, Gene die zuvor über pSW1 in das Genom eingebracht wurden, wieder zu entfernen.

Für die Konstruktion von pSW2 wurde zuerst die Erythromycin-Kassette mithilfe der Primer *ermAM_rev* und *ermAB-BamHI_for* (Tabelle 3.5) aus dem Genom von R6 Δ 1345 amplifiziert.

Anschließend wurde das PCR Produkt einer Polymerase-Behandlung (3.2.9) unterzogen und mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten (3.2.8). Das Plasmid pSW1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RV geschnitten, wodurch ein „Blunt end“ und ein „sticky end“ entsteht. Beide Fragmente wurden anschließend über Säule aufgereinigt und ligiert (3.2.11). Die Ligation wurde in *E. coli* transformiert, auf Ampicillin selektiert, auf Erythromycin überstrichen und die Plasmide isoliert. In Abbildung 3.6 ist die genetische Organisation von pSW2 und dessen Integration ins *S. pneumoniae* Genom gezeigt.

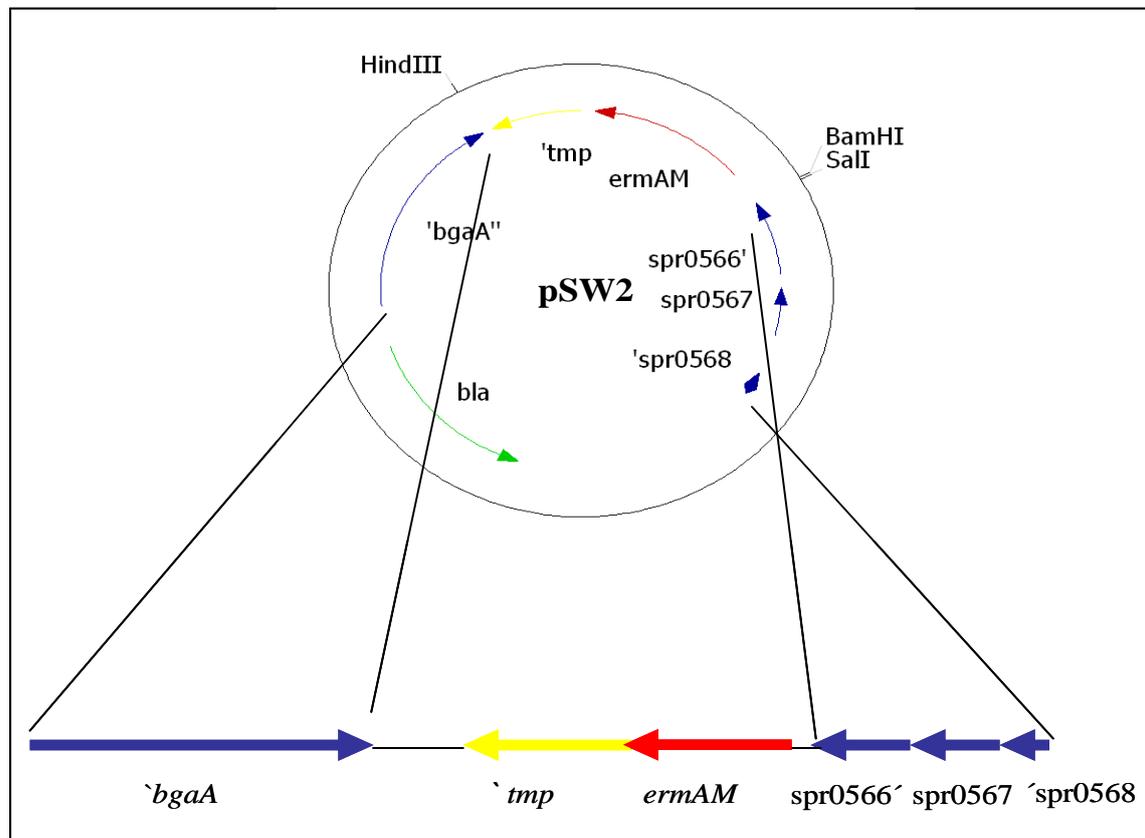


Abbildung 3.6: Genetische Organisation des Integrationsplasmids pSW2 und dessen Integration in das *S. pneumoniae* Genom.

Oben: Genkarte der pSW2 Plasmids. Unten: Genetische Karte der Region zwischen *bgaA* und *spr0568* in *S. pneumoniae* nach der Integration von pSW2. Die einzelnen Gene auf dem Plasmid und dem Genom sind durch Pfeile gekennzeichnet. *bla*: β -Laktamase (Ampicillin Resistenz), '*bgaA*', Teil des β -Galaktosidase Gens, '*tmp*': Rest der Trimethoprim Resistenz, *spr0566*-*spr0568*: Funktion nicht bekannt, *lacZ*: β -Galaktosidase Gen. Im Unterschied zu pSW1 enthält pSW2 anstelle der MCS das Erythromycin Resistenzgen *ermAM*. Das Trimethoprim Resistenzgen *tmp* wurde durch teilweise Deletion inaktiviert.

Dieses Plasmid konnte anschließend zur Inaktivierung von Genen, die zuvor über pSW1 in das Genom eingebracht wurden, verwendet werden. Die Stämme sind anschließend wieder Trimethoprim sensitiv, da das Trimethoprim Resistenzgen in pSW2 durch eine teilweise Deletion inaktiviert wurde. Daher kann auch nach einbringen von pSW2, pSW1 nochmals verwendet werden, um ein anderes Gen in diesen Stamm einzubringen.

3.2.24 Inaktivierung des Proteasegens *htrA*

Für die Inaktivierung von *htrA*, ohne Effekt auf das downstream liegende und co-transkribierte Gen *parB*, wurde *htrA* in Frame gegen die Kanamycin Resistenzkassette *aphIII* (Trieu-Cuot & Courvalin, 1983) ausgetauscht. Das *htrA::aphIII* Fragment wurde mithilfe der Primer *htrA-ko-6* und *SpoOJ1* (Tabelle 3.8) aus dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *htrA::aphIII* amplifiziert. Dieses Fragment wurde anschließend in das Genom diverser *S. pneumoniae* Stämme integriert und auf Kanamycin (Tabelle 3.14) selektioniert. Die erfolgreiche Integration wurde mittels PCR und anschließender Sequenzierung überprüft.

3.2.25 Deletion einzelner csRNAs mittels Cheshire-Kassette

Im Zuge dieser Arbeit wurden in verschiedenen Stämme die einzelne csRNAs durch die Cheshire-Kassette (Weng *et al.*, 2009) deletiert. Ein Vorteil dieser Methode ist das es nicht zu einer Häufung von Resistenz Kassetten im Genom kommt und es dadurch möglich ist, weitere Gene zu deletieren. Die Gene *ccnA* und *ccnB* die Hintereinander angeordnet sind wurde eine Cheshire Konstrukt verwendet. Sollten diese Gene einzeln deletiert werden wurde die Erythromycin-Resistenzkassette (Kovács, 2009) verwendet.

Für alle csRNAs wurden die up- und downstream flankierenden Bereiche mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.4 aufgeführt (*ccnAB*: 236F, *ccnAB-MluI*, *ccnAB-NcoI* und *ruvK*. *ccnC*: *purK*, *ccnC-MluI*, *ccnC-NcoI* und *dot*. *ccnD*: *uppsS1*, *ccnD-MluI*, *ccnD-NcoI* und *uppsS7*. *ccnE*: *gpmB1*, *ccnE-MluI*, *ccnE-NcoI* und *gpmB4*). Die Primer für das jeweilige upstream Fragment enthalten Schnittstellen für das Restriktionsenzym *MluI*, die für das downstream Fragment eine Schnittstelle für *NcoI*.

Das Cheshire-Fragment wurde mit den Primern *lox66-MluI* und *lox71-NcoI* (Tabelle 3.4) von DNA amplifiziert, welche von Morrison D.A. zur Verfügung gestellt wurde. Die beiden Schnittstellen *MluI* und *NcoI* sind daher auch in diesem Fragment vorhanden. Durch Restriktion der upstream Fragmente mit *MluI*, der downstream Fragmente mit *NcoI* und der Cheshire-Kassette mit beiden Restriktionsenzymen wurden „sticky ends“ produziert die in einer anschließenden Ligation zusammen gefügt wurden. Über die up- und downstream Fragmente integriert die Cheshire-Kassette bei der anschließenden Transformation über homologen Doppel-crossover an die Stelle des ursprünglichen Gens. Die Transformanten wurden auf D-Blutagarplatten mit Erythromycin und 0,2% Glucose selektioniert. Die Glucose wird hierbei zur Stabilisierung der Kassette im Genom benötigt, da das *cre*-Element unter der Kontrolle eines Fucose indizierbaren Promotor ist, welcher solange Glucose im Medium vorhanden ist nur geringfügig aktiv ist. Im nächsten Schritt werden die Transformanten mit 0,5 % Fucose als Kohlenstoffquelle im C+Y-Medium angezogen. Hierdurch wird der Promotor aktiv und *cre*-Elements, welches das Schneiden und die Rekombination zwischen den beiden *lox66* und *lox71* Stellen katalysiert, exprimiert. Das Herausschneiden der Cheshire-Kassette wurde mit einer

PCR der jeweils außen liegenden Primer (up- und downstream Fragmente) überprüft. Falls dieser als Kurierung bezeichneter Schritt nicht erfolgreich war, wurden die Stämme ein weiteres Mal in C+Y-Medium mit 0,5% Fucose angezogen. Abbildung 3.7 zeigt beispielhaft die Deletion von *ccnA* und *ccnB* mittels Cheshire-Kassette.

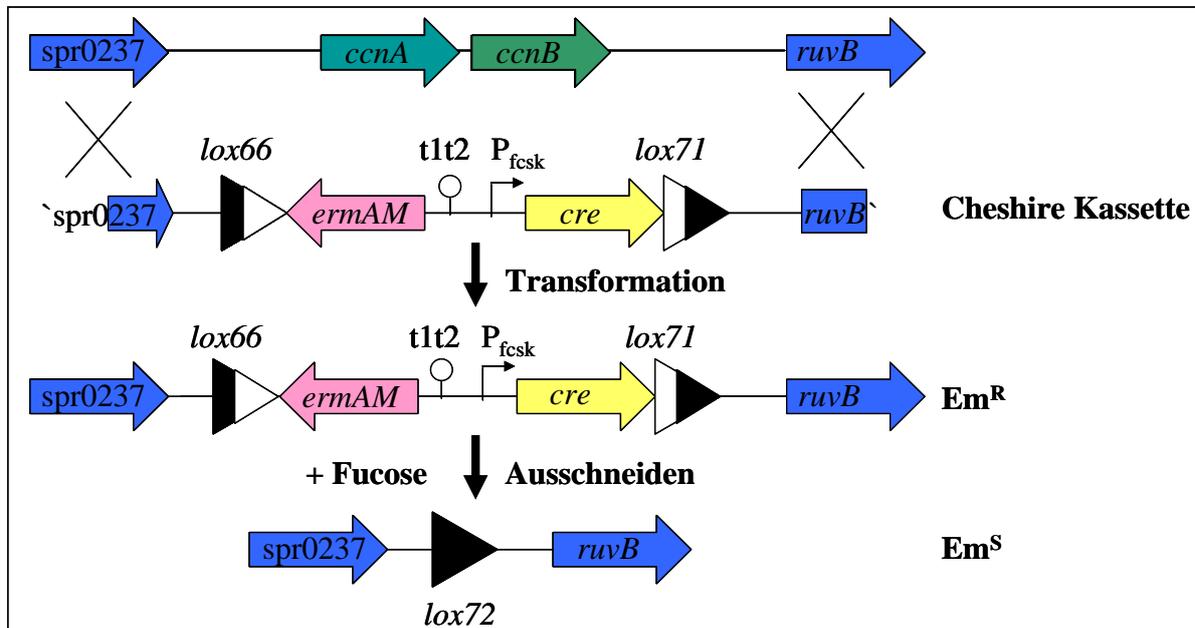


Abbildung 3.7: Schema zur Anwendung der Cheshire-Kassette zur Deletion von Genen in zwei Schritten.

Das zu deletierende Gen, in diesem Beispiel *ccnA* und *ccnB* wird im ersten Schritt durch die Cheshire-Kassette, welche mit den flankierenden DNA-Fragmenten ligiert ist, ersetzt. Die Selektion läuft hierbei über das *ermAM*-Gen, welche Erythromycin Resistenz verleiht. Die Cheshire-Kassette wird anschließend beim Wachstum in Fucose heraus geschnitten. Das *cre*-Element, welches für das Schneiden und die Rekombination der beiden *lox66* und *lox71* Elemente verantwortlich ist, steht unter der Kontrolle eines Fucose induzierten Promotors P_{fcsk} .

Mithilfe der Cheshire-Kassette war es möglich einzelne csRNAs im Genom zu deletieren und vor allem verschiedene Kombinationen von csRNA Deletionenmutanten zu konstruieren.

3.2.26 Integration eines Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems

Im Laufe dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass ein hyperaktives *ciaRH* System in Kombination mit verschiedenen csRNAs zu einer starken Instabilität der Stämme führt. Es kommt vermehrt zu Zusatzmutationen in den *ciaRH* Genen, welche meist zu einer Reduktion der Hyperaktivität führen. Um dieses Problem zu umgehen, sollten Stämme konstruiert werden, welche das Hyperaktive *ciaH202*-Allel unter Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotors enthalten. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit die Stämme während der Konstruktion in einem uninduzierten Zustand, also vergleichbar mit Δ *ciaH*, zu halten und die Induktion des *ciaH202*-Allels erst bei der jeweiligen Messung zu starten.

Hierfür wurde ein Plasmid verwendet pTEX*ciaH202*, welches zuvor von Franziska Huber (Huber, 2012) im Rahmen eines Forschungspraktikums erstellt wurde. Bei dem Plasmid pTX*ciaH202* (Abbildung 3.8) handelt es sich um ein Derivat von pSW1 (Abbildung 3.5).

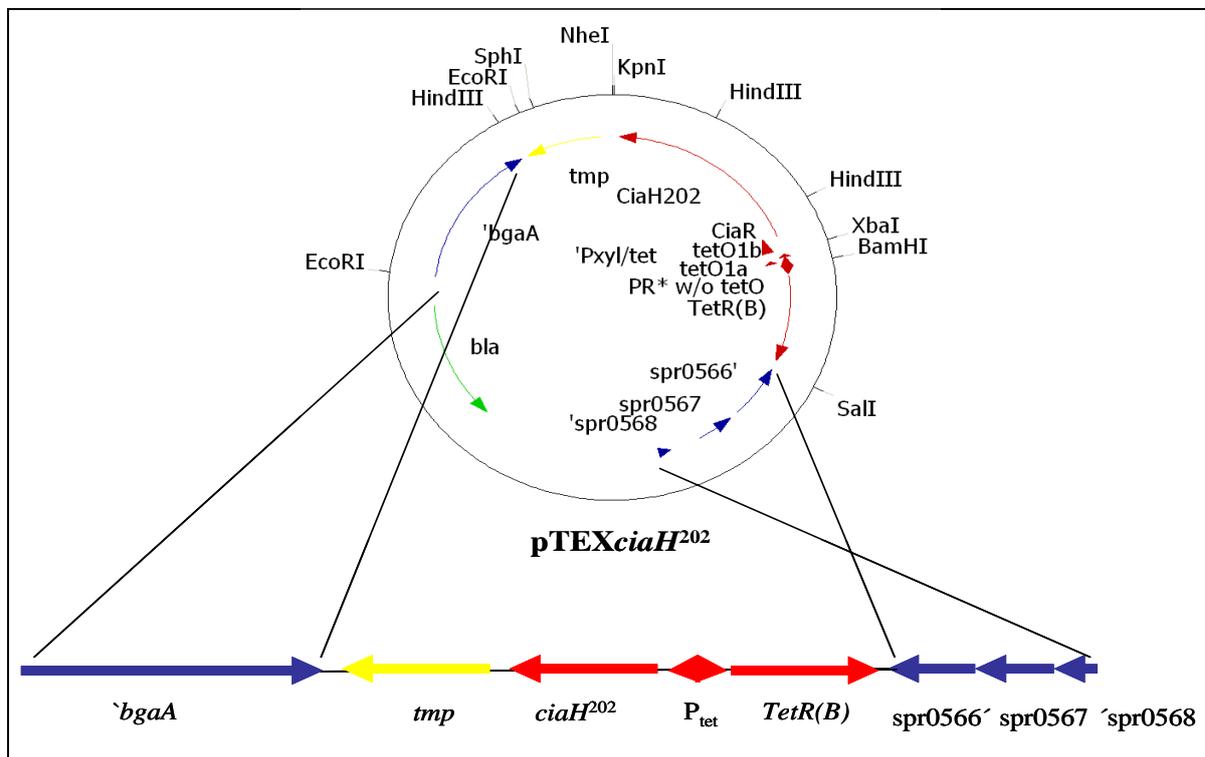


Abbildung 3.8: Genetische Organisation des induzierbaren Integrationsplasmids pTEX*ciaH202* und dessen Integration in das *S. pneumoniae* Genom.

Oben: Genkarte der pTEX*ciaH202* Plasmids. Unten: Genetische Karte der Region zwischen *bgaA* und *spr0568* in *S. pneumoniae* nach der Integration von pTEX*ciaH202*. Die einzelnen Gene auf dem Plasmid und dem Genom sind durch Pfeile gekennzeichnet. *bla*: β -Laktamase (Ampicillin Resistenz), '*bgaA*', Teil des β -Galaktosidase Gens, *tmp*: Trimethoprim Resistenz, *spr0566*-*spr0568*: Funktion nicht bekannt, *lacZ*: β -Galaktosidase Gen. Im Gegensatz zu pSW1 enthält pTEX*ciaH202* die Operatorsequenzen des MFS TetA Efflux-Transporter, aus *B. subtilis* mit dem entsprechenden *tetR(B)*. *tet(B)* kodiert dabei den Repressor, der an die Operatorsequenzen bindet und die Transkription der Gene hemmt (Abbildung 3.9). Downstream dieses Bereiches liegt das *ciaH202*-Allel. Da *ciaR* und *ciaH* in einem Operon kodiert sind wurde dem *ciaH202*-Allel zusammen mit einem sogenannten *ciaR*-Minigen kloniert. Dadurch bleibt die Translationseinheit erhalten aber *ciaR* zu großen Teilen deletiert, und ist somit nicht aktiv.

In dem Plasmid pTEX*ciaH202* ist die Expression des *ciaH202* Gens unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors, welcher aus *B.subtilis* stammt und dort den MFS TetA Efflux Transporters reguliert (Grkovic *et al.*, 2002). In Abbildung 3.9 ist der Aufbau der Tn10 *tet* Intergenregion gezeigt. TetR bildet ein Dimer, welches an den Operator O₂ bindet und somit die Transkription durch den Promotor P_{tetA} verhindert. Hierbei besteht eine höhere Affinität zu O₂ als zu O₁, dem Operator für *tetR*. Dadurch wird garantiert, dass genügend TetR vorhanden ist um die Transkription über P_{tetA} zu inhibieren. Tetracyclin und Derivate können an TetR binden und dadurch die Inhibierung des Operators O₂ verhindern. Es kommt zur Transkription von *tetA*. In dem Plasmid pTEX*ciaH202* ist nun an die Stelle des *tetA* Gens das *ciaH202*-Allel eingebracht, was somit unter der Kontrolle dieses Systems steht. Da *ciaR* und *ciaH* in einem Operon kodiert sind und somit translationel gekoppelt, wurde für diese Klonierung ein *ciaRH*²⁰² Fragment verwendet, bei welchem große Teile des *ciaR* Gens deletiert sind (*ciaR*-Minigen).

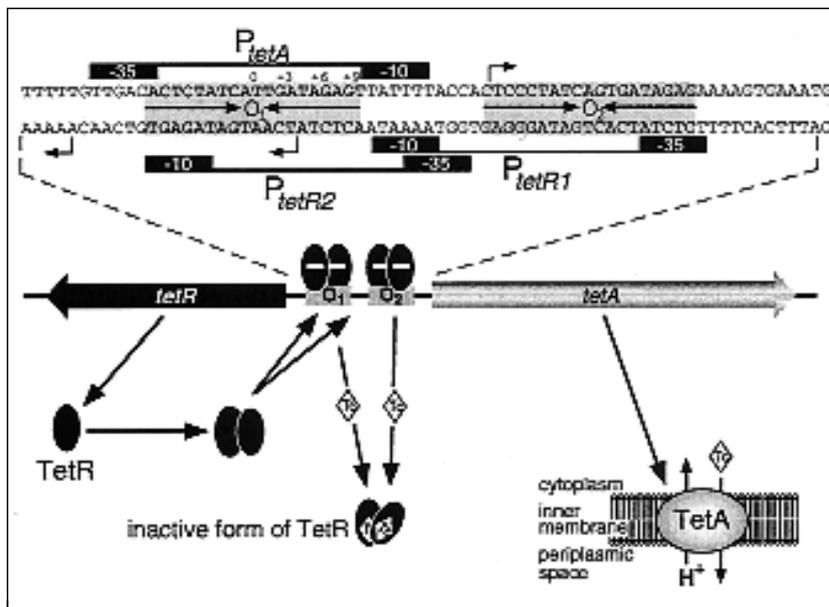


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung von Tn10 *tet* nach Grkovic *et al.*, 2002.

In dieser Arbeit wurde das Plasmid pTEX*ciaH202* in verschiedene *S. pneumoniae* Stämme eingebracht, in denen zuvor die auf dem Genom kodierte Wildtyp Kinase *ciaH* durch eine Spectinomycin-Kassette deletiert wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Der Einfluss einzelner csRNAs auf den CiaRH System vermittelten Resistenzphänotyp

Die Histidinkinase CiaH wurde als erste nicht-PBP-Resistenzdeterminante in *S. pneumoniae* über sukzessiv gesteigerte Antibiotikakonzentrationen identifiziert (Guenzi *et al.*, 1994; Hakenbeck *et al.*, 1999). Die entstandenen Mutanten wurden bezüglich veränderter Genloci untersucht (Laible & Hakenbeck, 1987) und Spontanmutationen im Histidinkinasegen *ciaH* konnten neben Mutationen in den *pbp*-Genen mit den Antibiotika Cefotaxim und Piperacillin selektioniert werden (Zähler *et al.*, 2002). Anhand verschiedener *ciaH*-Allele aus diesen Labormutanten und weiteren klinischen Isolaten konnte gezeigt werden, dass diese Mutationen in *ciaH* zu einer starken Aktivierung der CiaR-abhängigen Genregulation führen (Müller *et al.*, 2011). Diese starke Aktivierung des CiaRH Systems, auch Hyperaktivität genannt, wird mit weiteren Veränderungen innerhalb diverser Phänotypen in Verbindung gebracht. Des Weiteren konnte in früheren Studien nachgewiesen werden, dass der Resistenzanstieg, welcher durch ein hyperaktives CiaRH System vermittelt wird, stark von den csRNAs (cia dependent small RNAs) abhängig ist (Müller, 2011). Die Deletion aller csRNAs führt zu einem fast vollständigen Verlust der Resistenz. Im Zuge dieser Arbeit wurde der Effekt einzelner csRNAs auf die Resistenzentwicklung untersucht, zum einen in dem Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 und zum anderen in einem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System. Dieser Stamm enthält das *ciaH202*-Allel. Dieses *ciaH*-Allel bewirkt eine, von dem jeweiligen Promotor abhängige, Steigerung der CiaR-vermittelten Genregulation (Müller *et al.*, 2011). Zum einen können die mit einem hyperaktiven CiaRH System in Verbindung stehenden Phänotypen in diesem Stamm gut untersucht werden und zum anderen ist dieser Stamm verhältnismäßig stabil. Für einige sehr stark aktivierende *ciaH*-Allele konnte eine Instabilität beobachtet werden, wodurch das Arbeiten mit diesen Stämmen erschwert wird (Müller, 2011). Hierbei kommt es in Stämmen mit aktiviertem CiaRH System häufig zu unerwünschten Zusatzmutationen in *ciaR* oder *ciaH*, die die Aktivität des Systems wieder reduzieren. Um das Akkumulieren von Pseudorevertanten, welche einen Wachstumsvorteil haben, zu reduzieren, wurden die Kulturen auf Antibiotika-Platten ausgestrichen und von diesen am Folgetag angeimpft.

4.1.1 Auswirkungen einzelner csRNAs auf die β -Laktam Suszeptibilität

Die Resistenz verschiedener Stämme wurde gegen Cefotaxim, ein Cephalosporin der dritten Generation, untersucht. Zum einen handelt es sich hierbei um den Wildtyp *S. pneumoniae* R6. In diesem Stamm wurden alle csRNAs mittels Cheshire-Konstrukt entfernt und anschließend die csRNAs einzeln über die integrativen Plasmide *pCcnA*, *pCcnB*, *pCcnC*, *pCcnD* und *pCcnE* eingebracht (siehe 3.2.22). In diesen Plasmiden ist die Expression der csRNAs über ihren nativen Promotor gesteuert. Des Weiteren wurden, um eine etwas stärkere Expression der csRNAs zu erreichen, die Plasmide *pVccnA*, *pVccnB*, *pVccnC*, *pVccnD* und *pVccnE* in *S. pneumoniae* R6 Δ csRNAs transformiert. In den so erhaltenen Stämmen steht die Expression der csRNAs unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors *vegT*. Die minimale Hemmkonzentration wurde mithilfe des Tropfentests näherungsweise bestimmt.

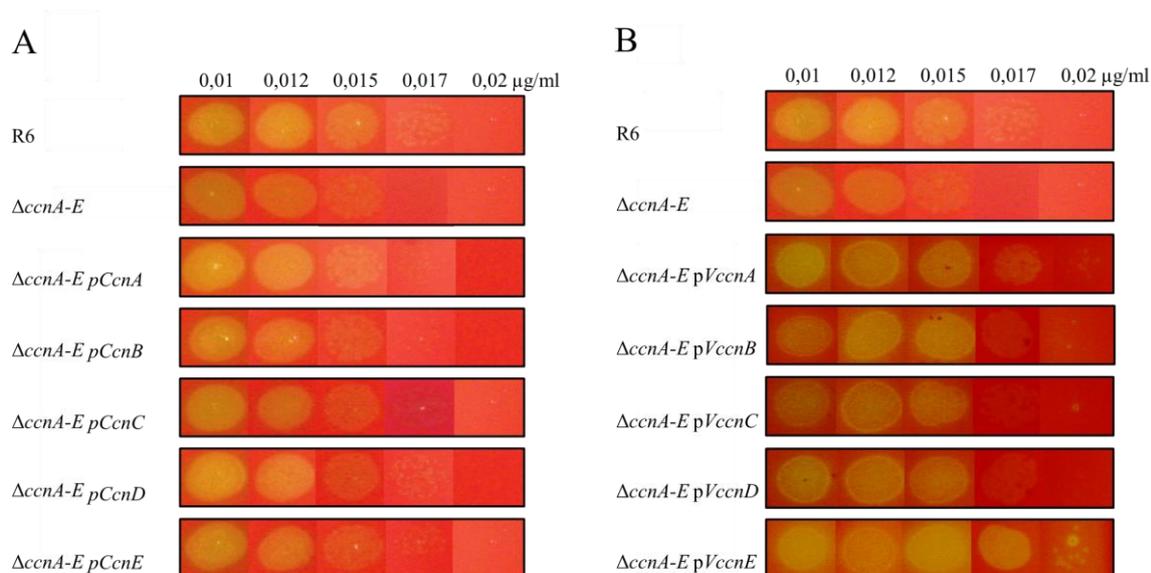


Abbildung 4.1: Untersuchung der Resistenz von *S. pneumoniae* R6 sowie von seinen Derivaten mit einzelnen csRNAs, unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren (A) und dem konstitutiven *vegT*-Promotor (B), gegen das β -Laktamantibiotikum Cefotaxim.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Tropfentests für die verschiedenen Stämme mit unterschiedlichen csRNAs (von oben nach unten: R6, Δ *ccnA-E*, Δ *ccnA-E* *pCcnA*/*pVccnA* (RKL335; RKL672), Δ *ccnA-E* *pCcnB*/*pVccnB* (RKL336; RKL673), Δ *ccnA-E* *pCcnC*/*pVccnC* (RKL337; RKL674), Δ *ccnA-E* *pCcnD*/*pVccnD* (RKL338; RKL675) und Δ *ccnA-E* *pCcnE*/*pVccnE* (RKL339; RKL676)) bei von links nach rechts ansteigenden Antibiotikakonzentrationen. Die Bereiche der D-Blutagarplatten, auf denen ein Bakterienwachstum stattgefunden hat, sind durch die α -Hämolysen der Bakterien grün verfärbt. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen bei 37°C in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 inkubiert, anschließend 1:1000 in NaCl verdünnt, 30 µl dieser Verdünnung gespottet und die Platten 48 h bei 37°C inkubiert.

Wie in Abbildung 4.1 A zu erkennen ist, ist der Abfall der Resistenz durch Inaktivierung der csRNAs im Wildtyp nicht sehr stark. Der Wildtyp R6 erreicht eine minimale Hemmkonzentration von 0,017 µg/ml, die durch das Inaktivieren aller csRNAs (Δ *ccnA-E*) etwa auf 0,015 µg/ml absinkt. Bis zu dieser Konzentration wachsen ebenfalls die Stämme, die nur eine csRNA enthalten (*pCcnA-E*). Das

Wachstum dieser Stämme bei 0,015 $\mu\text{g/ml}$ ist minimal besser, als das des csRNAs Deletionsstamms. Generell sind aber keine Unterschiede zwischen den einzelnen csRNAs zu erkennen. Auch eine stärkere Expression der csRNAs durch den *vegT*-Promotor zeigt keinen starken Effekt auf die β -Laktamresistenz (Abbildung 4.1 B). Jedoch ist zu erkennen, dass die Stämme mit einzelnen csRNAs unter Kontrolle des *vegT*-Promotor (*pVccnA-E*) die minimale Hemmkonzentration von 0,017 $\mu\text{g/ml}$ des Wildtyps R6 erreichen. Der Stamm, welcher csRNA5 unter der Kontrolle des *vegT*-Promotors enthält (*pVccnE*), zeigt sogar eine stärkere Resistenz (0,02 $\mu\text{g/ml}$) als der Wildtyp, welcher alle kleinen RNAs unter der Kontrolle ihres natürlichen Promotors besitzt. Schon in früheren Studien konnte beobachtet werden, dass die Untersuchung von CiaRH-abhängigen Phänotypen, in Stämmen mit hyperaktivem CiaRH System, durch die wesentlich bessere Ausprägung einfacher zu untersuchen sind (Müller, 2011). Daher wurden Stämme konstruiert, die das hyperaktive *ciaH202*-Allel enthalten und jeweils eine der csRNAs unter Kontrolle des nativen Promotors (siehe 3.2.22).

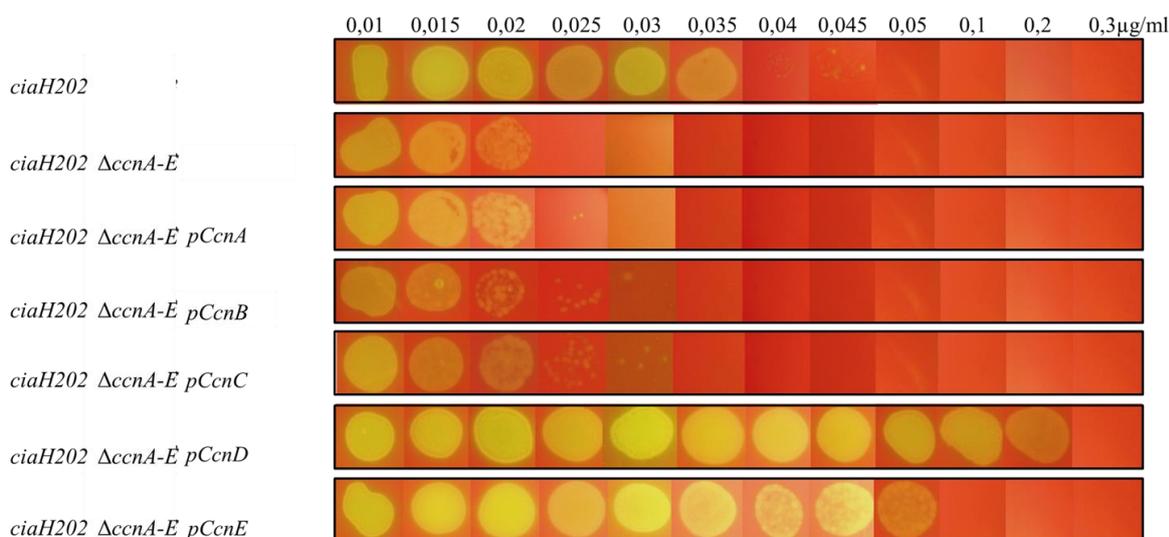


Abbildung 4.2: Untersuchung der Resistenz von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* sowie von seinen Derivaten mit einzelnen csRNAs, unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren, gegen das β -Laktamantibiotikum Cefotaxim.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Tropfentests für die verschiedenen Stämme mit unterschiedlichen csRNAs (von oben nach unten: *ciaH202*, *ciaH202 ΔccnA-E*, *ciaH202 ΔccnA-E pCcnA* (RKL342), *ciaH202 ΔccnA-E pCcnB* (RKL336), *ciaH202 ΔccnA-E pCcnC* (RKL337), *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD* (RKL631) und *ciaH202 ΔccnA-E pCcnE* (RKL345)) bei von links nach rechts ansteigenden Antibiotikakonzentrationen. Die Bereiche der D-Blutagarplatten, auf denen ein Bakterienwachstum stattgefunden hat, sind durch die α -Hämolyse der Bakterien grün verfärbt. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen bei 37°C in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 inkubiert, anschließend 1:1000 in NaCl verdünnt, 30 μl dieser Verdünnung gespottet und die Platten für 48 h bei 37°C inkubiert.

In Abbildung 4.2 ist deutlich zu erkennen, dass die Deletion aller csRNAs in dem Stamm, welcher das hyperaktive *ciaH202*-Allel trägt, zu einem deutlichen Abfall der Resistenz gegen Cefotaxim führt. Der Stamm mit dem *ciaH202*-Allel zeigt eine minimale Hemmkonzentration von 0,04 $\mu\text{g/ml}$, wohingegen bei dem Deletionsstamm *ciaH202 ΔccnA-E* schon bei einer Konzentration von 0,02 $\mu\text{g/ml}$ kein

Wachstum mehr zu verzeichnen ist. Das Einbringen von csRNA1, 2 oder 3 (p*CcnA*, p*CcnB* und p*CcnC*) führt in diesem genetischen Hintergrund nicht zu einer Erhöhung der Resistenz. Ein deutliches Wachstum ist für diese Stämme ebenfalls noch bei 0,02 µg/ml Cefotaxim zu erkennen. Im Gegensatz hierzu ist in den Stämmen, die csRNA4 (p*CcnD*) bzw. csRNA5 (p*CcnE*) enthalten, eine sehr starke Resistenzerrhöhung zu beobachten. In diesen Fällen ist ein Wachstum noch bei Konzentrationen von 0,2 bzw. 0,05 µg/ml nachzuweisen. Damit liegt die minimale Hemmkonzentration dieser Stämme weit über der des Ausgangsstammes, welcher alle csRNAs enthält (*ciaH202*). Um in diesen Fällen sekundäre Mutationen auszuschließen, da wie schon oben erwähnt einige Stämme mit stark aktivem CiaRH System Instabilität aufweisen, wurde in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnD* die eingebrachte csRNA4 durch Transformation mit dem Plasmid pSW2 deletiert. Hierbei wird die auf dem Plasmid befindliche RNA durch eine Erythromycinkassette ersetzt. In Abbildung 4.3 ist klar zu erkennen, dass durch diese Deletion der zuvor beobachtete Resistenzanstieg einbricht. Dieser Stamm *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnD*::*ery* zeigt eine minimale Hemmkonzentration von 0,025 µg/ml, was dem csRNAs Deletionsstamm entspricht. Um nun sicher zu stellen, dass der starke Anstieg in diesem genetischen Hintergrund nur durch die csRNA4 ausgelöst wird, wurde in diesem Stamm das Plasmid eingebracht, welches csRNA2 (p*CcnB*) trägt. Hier zeigt sich kein Resistenzanstieg (Abbildung 4.3). Die minimale Hemmkonzentration liegt hier, wie auch bei dem Original csRNA2 Stamm bei 0,02 µg/ml. Der beobachtete Resistenzanstieg in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnD* ist somit von csRNA4 abhängig.

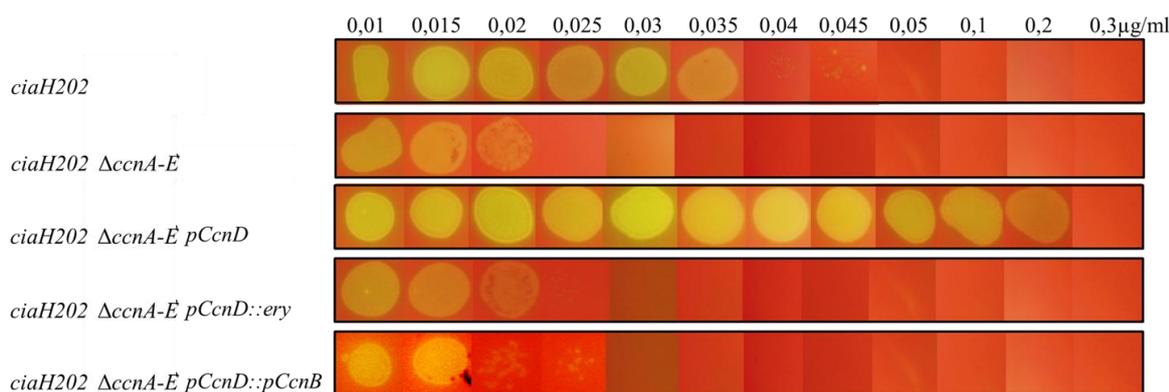


Abbildung 4.3: Untersuchung der Resistenz von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* sowie von seinen Derivaten, unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren, gegen das β -Laktamantibiotikum Cefotaxim.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Tropfentests für die verschiedenen Stämme mit unterschiedlichen csRNAs (von oben nach unten: *ciaH202*, *ciaH202* Δ *ccnA-E*, *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnD* (RKL631), *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnD*::Erythromycinkassette (RKL634), *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnD*::p*CcnB* (RKL635)) bei von links nach rechts ansteigenden Antibiotikakonzentrationen. Die Bereiche der D-Blutagarplatten, auf denen ein Bakterienwachstum stattgefunden hat, sind durch die α -Hämolyse der Bakterien grün verfärbt. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen bei 37°C in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 inkubiert, anschließend 1:1000 in NaCl verdünnt, 30 µl dieser Verdünnung gespottet und die Platten für 48 h bei 37°C inkubiert.

Trotz allem ist der beobachtete Resistenzanstieg in den Stämmen *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* *pCcnD* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* *pCcnE* sehr überraschend.

Da in früheren Studien gezeigt wurde, dass ein weiteres CiaR-reguliertes Genprodukt, die Serinprotease HtrA, die β -Laktamresistenz beeinflusst (Müller, 2011; Peters, 2013), sollte der Effekt dieses Gens im Hintergrund der einzelnen csRNAs untersucht werden.

4.1.2 Effekt der *htrA* Deletion auf den csRNA vermittelten Resistenzanstieg

Die CiaR-regulierte Serinprotease HtrA wird ebenfalls mit der β -Lactamresistenz in Verbindung gebracht. Allerdings konnten hier unterschiedliche Ergebnisse beobachtet werden. Die Deletion von *htrA* führt in *S. pneumoniae* R6 zu einem leichten Anstieg der Resistenz. Wohingegen ein Abfall der Resistenz nach der *htrA* Deletion in einem Stamm mit hyperaktivem *ciaH306*-Allel zu beobachten ist. In dem Stamm mit hyperaktivem *ciaH306*-Allel in Kombination mit einer Deletion aller csRNAs war dagegen kein Effekt der *htrA* Deletion auf die Resistenz zu beobachten (Müller, 2011)

Daher stellte sich nun die Frage, ob die Deletion von *htrA* Auswirkungen auf einzelne csRNAs hat. Hierzu wurden Stämme konstruiert, die das *ciaH202*-Allel und einzelne csRNAs unter der Kontrolle ihrer nativen Promotoren tragen, in welchen das Serinproteasegen *htrA* mittels Kanamycinkassette deletiert wurde.

Die Deletion von *htrA* hat auf die Resistenz der Stämme mit einzelnen csRNAs einen unterschiedlichen Effekt. Während die Deletion die Resistenz der Stämme, welche csRNA1, 2 und 3 (*pCcnA-C*) enthalten von 0,02 $\mu\text{g/ml}$ auf 0,04 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 0,03 $\mu\text{g/ml}$ erhöht, ist in den Stämmen mit csRNA4 (*pCcnD*) und csRNA5 (*pCcnE*) ein starker Abfall der Resistenz zu beobachten (Abbildung 4.4). In *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnD* fällt die Resistenz von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ auf 0,04 $\mu\text{g/ml}$ durch die Deletion von *htrA* ab. In *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnE* von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ auf 0,035 $\mu\text{g/ml}$. Die minimale Hemmkonzentration der Stämme mit einzelnen csRNAs, ausgenommen die des Stammes mit csRNA3, entspricht nach der Deletion von *htrA* der des Ausgangsstammes *ciaH202* Δ *htrA* (Vergleich Abbildung 4.2/Abbildung 4.4).

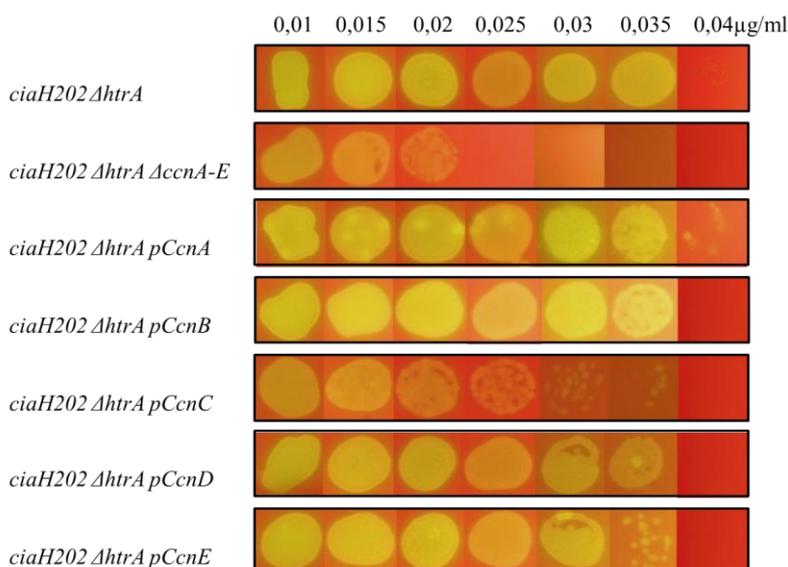


Abbildung 4.4: Untersuchung der Resistenz von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔhtrA* sowie seinen Derivaten mit einzelnen csRNAs, unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren, gegen das β -Laktamantibiotikum Cefotaxim.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Tropfentests für die verschiedenen Stämme mit unterschiedlichen csRNAs (von oben nach unten: *ciaH202ΔhtrA*, *ciaH202 ΔhtrA ΔccnA-E*, *ciaH202 ΔhtrA ΔccnA-E pCcnA* (RKL626), *ciaH202 ΔhtrA ΔccnA-E pCcnB* (RKL627), *ciaH202 ΔhtrA ΔccnA-E pCcnC* (RKL628), *ciaH202 ΔhtrA ΔccnA-E pCcnD* (RKL629), und *ciaH202 ΔhtrA ΔccnA-E pCcnE* (RKL630)) bei von links nach rechts ansteigenden Antibiotikakonzentrationen. Die Bereiche der D-Blutagarplatten, auf denen ein Bakterienwachstum stattgefunden hat, sind durch die α -Hämolyse der Bakterien grün verfärbt. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen bei 37°C in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 inkubiert, anschließend 1:1000 in NaCl verdünnt, 30 μ l dieser Verdünnung gespottet und die Platten für 48 h bei 37°C inkubiert.

Die Beobachtung, dass ein veränderter genetischer Hintergrund unterschiedliche Auswirkungen auf die csRNAs hat, konnte so noch nicht identifiziert werden. Auch die extreme Resistenzentwicklung in den Stämmen *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnE* und vor allem in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD* war nicht zu erwarten, wenn von einer additiven Funktion der csRNAs ausgegangen wird.

Ob diese unterschiedlichen Effekte der csRNAs und dem genetischen Hintergrund auch bei der csRNA vermittelten Kompetenzinhibition zu beobachten sind, sollte daher im Folgenden genauer untersucht werden.

4.2 Der Einfluss einzelner csRNAs auf die Entwicklung der natürlichen Kompetenz in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202*

Die Fähigkeit DNA aus der Umgebung aufzunehmen, ist für die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen von großer Bedeutung. So können sich Antibiotikaresistenzen über horizontalen Gentransfer verbreiten (Dowson *et al.*, 1989; Claverys *et al.*, 2000). Des Weiteren trägt die Kompetenz direkt zur Virulenz der Bakterien bei (Bartilson *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Guiral *et al.*, 2005; Kowalko & Sebert, 2008). Ein Einfluss des Zwei-Komponenten Systems CiaRH, der Serinprotease HtrA und der csRNAs auf die Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* R6 konnte bereits nachgewiesen werden (Guenzi *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 2011; Cassone *et al.*, 2012).

In früheren Arbeiten wurden die kompetenten Zellen in Glycerin konserviert, am Folgetag aufgetaut und transformiert. Es konnte allerdings im Verlauf dieser Arbeit beobachtet werden, dass sich das Einfrieren und Auftauen unterschiedlich auf die Lebendkeimzahl der bei dieser Studie verwendeten Stämme auswirkt. Die Lebendkeimzahl des Wildtyps wird durch das Einfrieren nicht maßgeblich beeinflusst. Die Lebendkeimzahl der Stämme mit hyperaktivem CiaRH System allerdings stark reduziert, wodurch die Transformationseffizienz beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden die Transformationseffizienzen der Vergleichsstämme *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* nochmals mit der in dieser Arbeit angewendeten Methode, welche eine verbesserte Sensitivität aufweist, in C+Y-Medium (3.2.2.3) bestimmt. Die Ergebnisse dieser Transformationstests sind in Abbildung 4.5 dargestellt.

Der standartmäßig verwendete Transformationsmarker Strep^R (RKL242) konnte in diesem Fall nicht verwendet werden, da diese Stämme durch das Einbringen des *ciaH202*-Alles über die Januskassette schon eine Streptomycinresistenz aufweisen. Deshalb wurde zur Analyse der Transformierbarkeit chromosomale DNA eines Rifampin-resistenten Stammes (RKL222) verwendet (Müller *et al.*, 2011). Dieser Transformationsmarker weist eine etwa 10 fach geringere Transformationseffizienz als der konventionelle Marker auf, wodurch sich die Detektionsgrenze der messbaren Kompetenz etwas ändert. Allerdings wird dieser Effekt durch eine erhöhte Effizienz der frischen Zellen aufgehoben, wodurch diese Transformationstests letztlich sensitiver sind.

Zur Untersuchung der Kompetenz wurde die Transformationseffizienz in regelmäßigen zeitlichen Abständen während des Wachstums ermittelt.

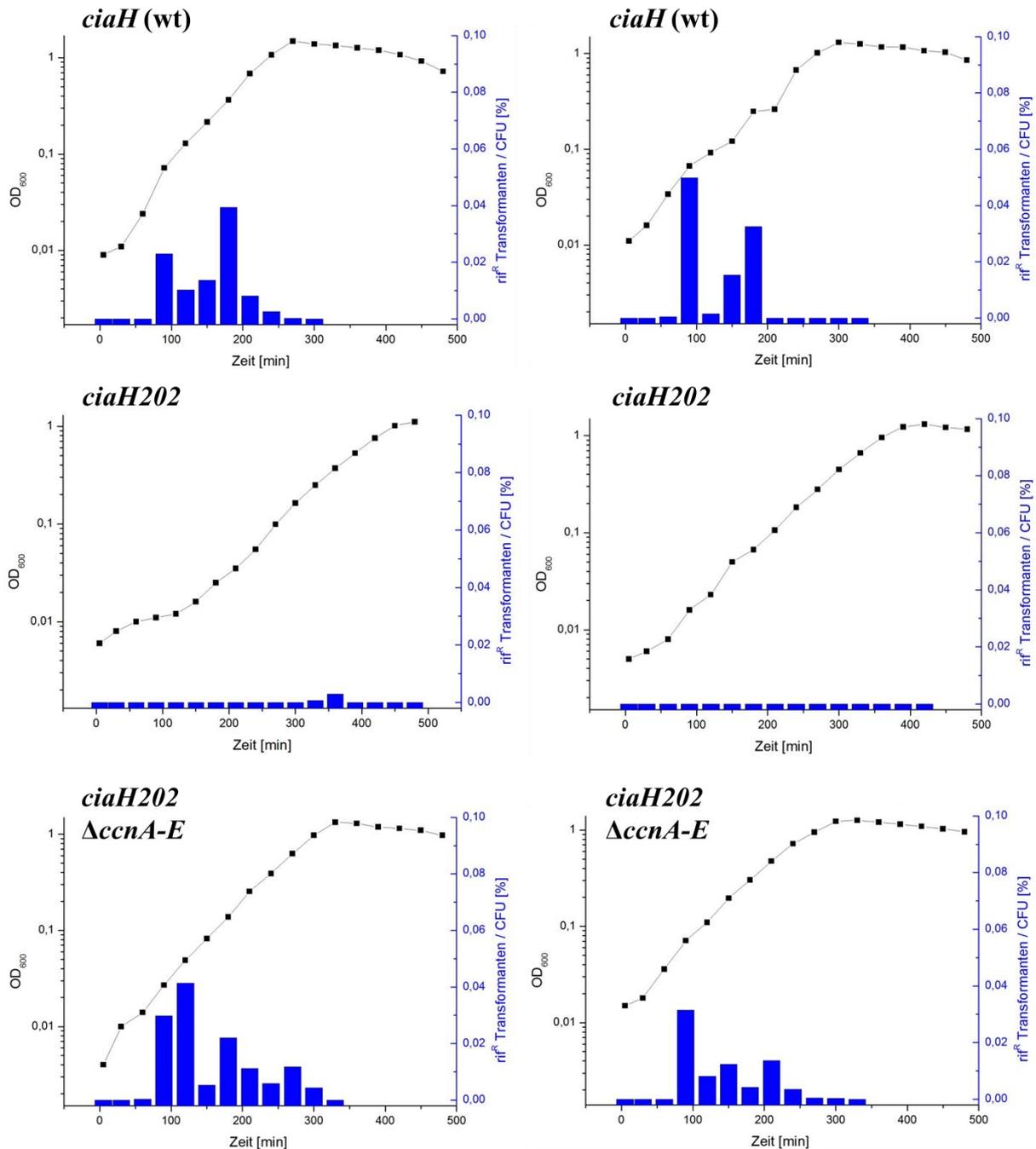


Abbildung 4.5: Einfluss der csRNAs auf den CiaRH-regulierten Kompetenzverlauf während des Wachstums in C+Y-Medium.

Von den *S. pneumoniae*-Stämmen R6, *ciaH202* (RKL162) und *ciaH202* Δ *ccnA-E* (RKL341) wurde die Kompetenzentwicklung in C+Y-Medium untersucht. Zum Starten des Experiments wurde C+Y-Medium 1 %ig mit einer Glycerinkultur aus C+Y-Medium pH 6,8 beimpft. Proben wurden 5 min nach dem Animpfen, dann im Abstand von 30 min bis zur Stationärphase geerntet und die Transformationseffizienz mithilfe des Transformationsmarkers RKL222 bestimmt. Die Transformationseffizienz (blaue Balken) ist der prozentuale Anteil der Rifampin-resistenten Transformanten bezogen auf die Lebendkeimzahl (CFU = Colony forming units). Das Wachstum (schwarze Kurve) wurde mittels der optischen Dichte bei 600 nm photometrisch verfolgt. Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildungen je zwei als repräsentative Beispiele zeigen.

Die Untersuchung der Kompetenz des Wildtyps R6 zeigt einen Anstieg der Transformierbarkeit während der exponentiellen Wachstumsphase. Zu Beginn der stationären Phase kommt es zu einem Abfall der Transformationseffizienz und zum Verlust der natürlichen Kompetenz. Das Maximum der Transformationseffizienz liegt bei ca. 0,04 %. Bei dem Stamm mit dem *ciaH202*-Allelen führt die Aktivierung des CiaR-Regulons wie erwartet zur nahezu vollständigen Unterdrückung der Kompetenz. Einige wenige Transformanten wurden in einem Versuch zum Messpunkt 390 min erhalten, was einer Transformationseffizienz von $5,1 \cdot 10^{-5}$ entspricht. Die Deletion aller csRNAs in dem Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel führt zu einer vollständigen Wiederherstellung der natürlichen Kompetenzentwicklung (Müller *et al.*, 2011). Das Effizienzniveau dieses Stammes entspricht dem des Wildtyps R6. Obwohl die Expression der anderen Gene des CiaR-Regulons, darunter auch *htrA*, nach wie vor hyperaktiviert sind, reicht das Fehlen aller csRNAs aus, um die Blockierung der Kompetenzentwicklung aufzuheben. Auf Grund ihrer starken Ähnlichkeit liegt eine redundante Wirkung der csRNAs nahe. Ob dies im Falle der reprimierenden Wirkung auf die Kompetenzentwicklung zutrifft, sollte anschließend untersucht werden.

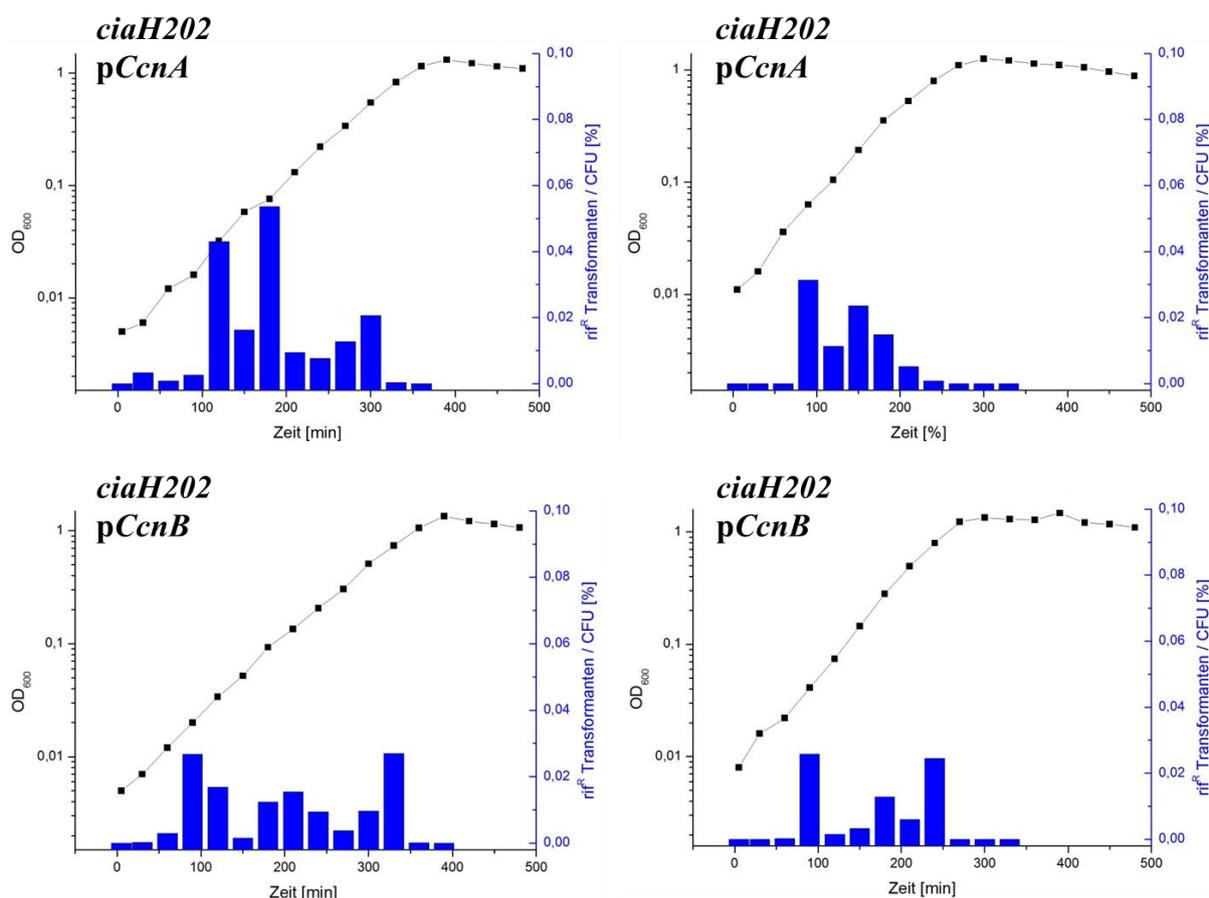
4.2.1 Auswirkungen einzelner csRNAs auf die natürliche Kompetenz

Ein kompetenzinhibitorischer Effekt der csRNA1 unter Kontrolle eines fremden Promotors in *S. pneumoniae* D39 (Tsui *et al.*, 2010) konnte bereits nachgewiesen werden. Allerdings konnte innerhalb dieser Arbeit kein Kompetenz spezifisches Zielgen verifiziert werden (Tsui *et al.*, 2010). Um den Effekt einzelner csRNAs auf die Kompetenz zu untersuchen, wurden die csRNAs einzeln über die Plasmide *pCcnA*, *pCcnB*, *pCcnC*, *pCcnD* und *pCcnE* (Tabelle 3.3) in den Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* integriert. Dieser Stamm enthält zum einen das hyperaktive *ciaH202*-Allel, welches über die Januskassette eingebracht wurde und zum anderen wurden alle fünf csRNAs mittels Cheshire-Kassette (Weng *et al.*, 2009) deletiert.

Um die Kompetenzentwicklung verfolgen zu können, wurde mit nicht-kompetenten Zellen gestartet (siehe 3.2.2.3). Aus diesem Grund war eine Selektion der Stämme über Antibiotika-Platten nicht möglich (siehe 4.1). Um Pseudorevertanten zu erkennen, wurde daher das Promotorprobe Plasmid *pPP2htrA* eingebracht und die zum Transformationstest verwendeten Platten mit X-Gal versetzt. Hierdurch sollte es möglich sein, die erwünschten Transformanten, welche ein aktiviertes *ciaH202*-Allel enthalten und daher eine starke blaue Färbung aufweisen, von den Pseudorevertanten mit reduzierter CiaRH Aktivität zu unterscheiden. Zur Kontrolle der Stämme *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnD* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnE* wurden zusätzlich noch einzelne Transformanten auf einer Cefotaximkonzentration von 0,05 μ g/ml ausgestrichen (siehe 4.1). Die Ergebnisse dieser Transformationstests sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

Die Stämme, welche csRNA1 (*pCcnA*), 2 (*pCcnB*) und 3 (*pCcnC*), in Kombination mit dem hyperaktiven *ciaH202*-Allel enthalten, zeigen eine Transformationseffizienz von maximal 0,06 %,

0,03 % und 0,04 %. Damit liegen sie im Bereich der Transformierbarkeit des Wildtyps R6 (0,04 %). Auch in diesen Stämmen zeigt sich eine Transformierbarkeit innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase, welche zu Beginn der stationären Phase nicht mehr nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu zeigen die Stämme, welche csRNA4 (pCcnD) und csRNA5 (pCcnE) exprimieren, keine Kompetenzentwicklung in C+Y-Medium. Lediglich zu einzelnen Zeitpunkten zeigte sich eine geringfügige Transformierbarkeit (csRNA4 max. 0,009 %; csRNA5 max. 0,005 %). Die Stämme mit einzelnen csRNAs zeigen alle ein langsames Wachstum als der csRNA Deletionsstamm und der Wildtyp R6, allerdings ein schnelleres Wachstum als der Stamm mit allen csRNAs und dem *ciaH202*-Allel. Am stärksten ausgeprägt ist dieses Wachstumsdefizit in den Stämmen mit csRNA4 und csRNA5. In früheren Studien konnte für diese beiden csRNAs ein Einfluss auf die Stationärphasen-Autolyse nachgewiesen werden (Halfmann *et al.*, 2007b).



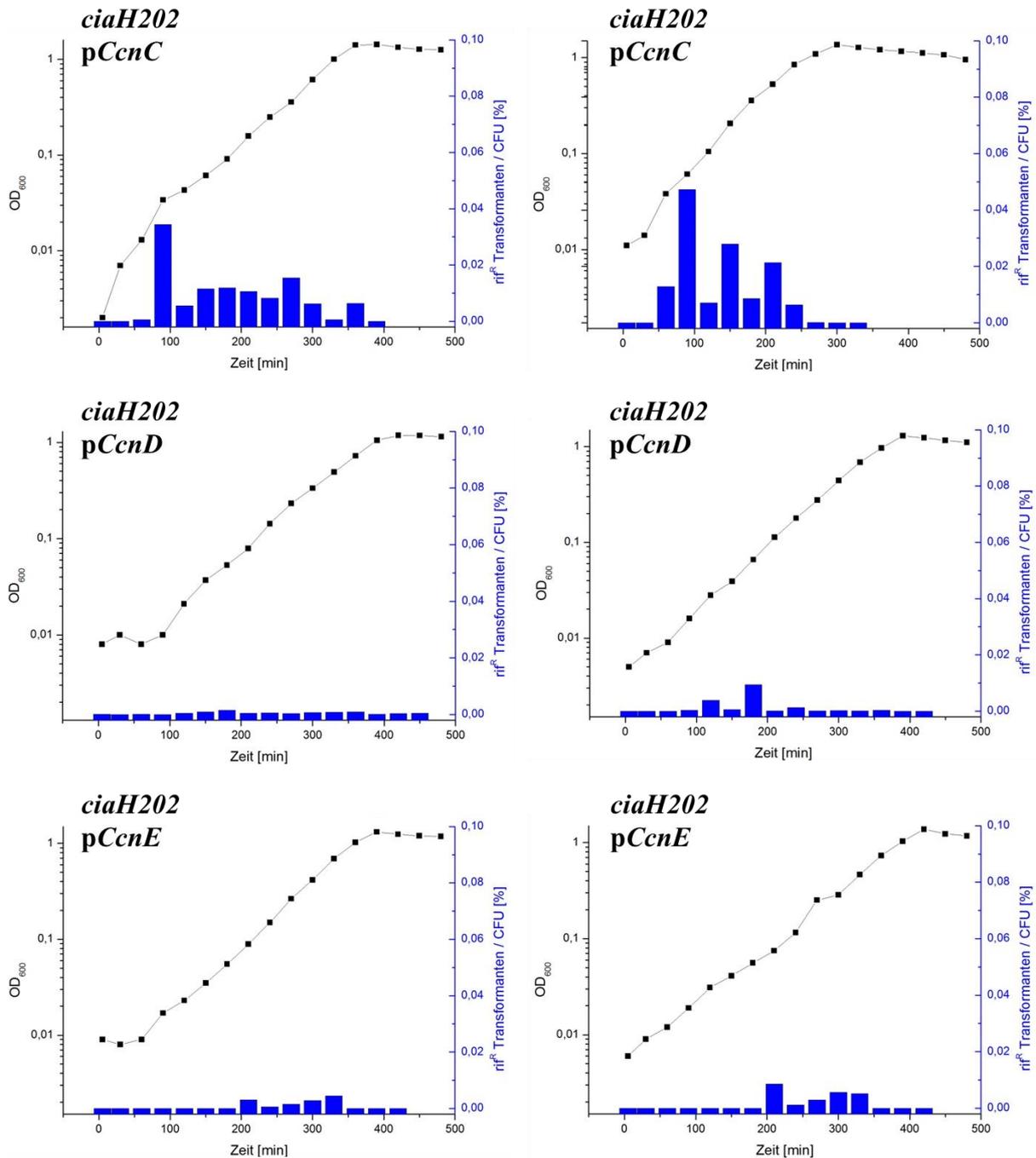


Abbildung 4.6: Einfluss einzelner csRNAs auf den CiaRH-regulierten Kompetenzverlauf während des Wachstums in C+Y-Medium.

Von den *S. pneumoniae*-Stämmen *ciaH202* $\Delta ccnA-E$ pCcnA (RKL342), *ciaH202* $\Delta ccnA-E$ pCcnB (RKL343), *ciaH202* $\Delta ccnA-E$ pCcnC (RKL344), *ciaH202* $\Delta ccnA-E$ pCcnD (RKL631) und *ciaH202* $\Delta ccnA-E$ pCcnE (RKL345) wurde die Kompetenzentwicklung in C+Y-Medium untersucht. Zum Starten des Experiments wurde C+Y-Medium 1 %ig mit einer Glycerinkultur aus C+Y-Medium pH 6,8 beimpft. Proben wurden 5 min nach dem Animpfen, dann im Abstand von 30 min bis zur Stationärphase geerntet und die Transformationseffizienz mithilfe des Transformationsmarkers RKL222 bestimmt. Die Transformationseffizienz (blaue Balken) ist der prozentuale Anteil der Rifampin-resistenten Transformanten bezogen auf die Lebendkeimzahl (CFU = Colony forming units). Das Wachstum (schwarze Kurve) wurde mittels der optischen Dichte bei 600 nm photometrisch verfolgt. Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildungen je zwei als repräsentative Beispiele zeigen.

Ein weiteres CiaR reguliertes Gen, die Serinprotease HtrA, hat einen nachgewiesenen Einfluss auf die Kompetenz. Im folgenden Versuchsabschnitt wurde daher untersucht, welche Folgen eine Deletion von *htrA* auf den csRNA vermittelten Kompetenzeffekt hat.

4.2.2 Effekt der *htrA* Deletion auf den csRNA vermittelten Kompetenzverlauf

Der Einfluss von *htrA* wurde in einigen Veröffentlichungen als kompetenzinhibierend (Sebert *et al.*, 2005), in anderen als –aktivierend (Ibrahim *et al.*, 2004b; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004) beschrieben. In neueren Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass die Serinprotease HtrA die Kompetenz reprimiert, indem sie das Kompetenz stimulierende Peptidpheromon CSP prozessiert (Cassone *et al.*, 2012). Auch in diesem Fall wurde der Effekt einer *htrA*-Deletion in einem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System mittels der in dieser Arbeit verwendeten Methode der Transformationsmessung untersucht. Bei dem verwendeten *htrA*-Deletionskonstrukt (*htrA::aphIII*) wurde die codierende Sequenz von *htrA* größtenteils durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Die Ergebnisse von zwei repräsentativen Transformationstests sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

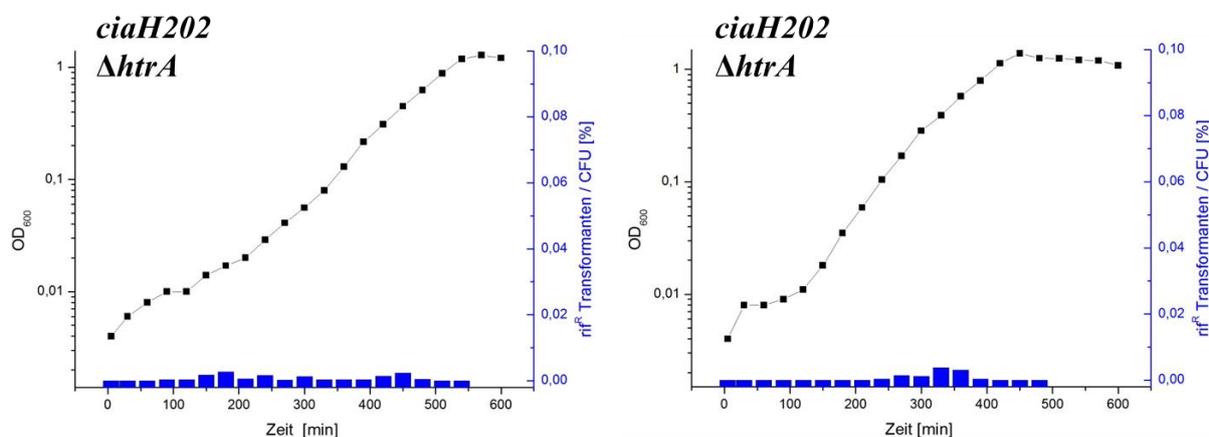
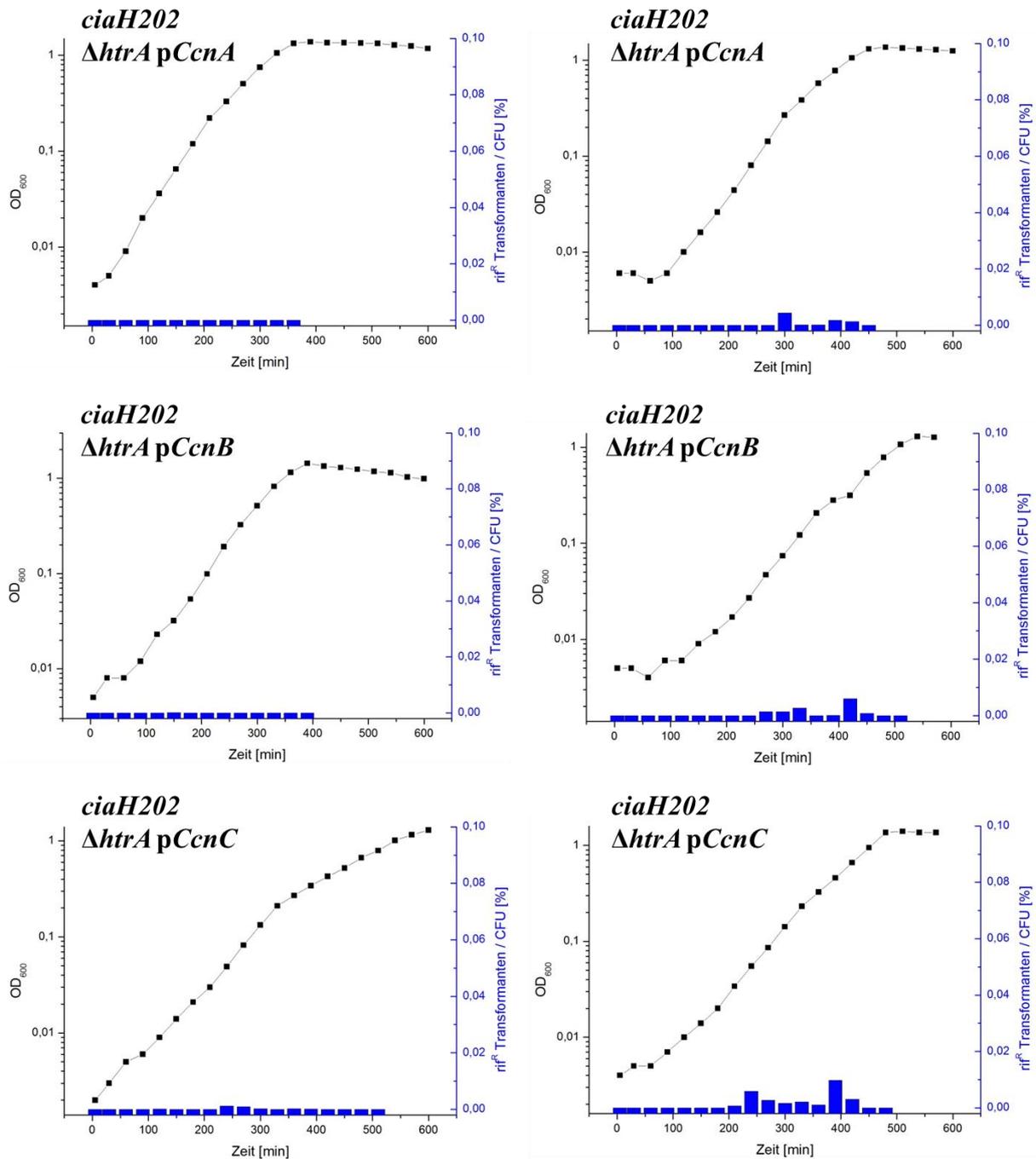


Abbildung 4.7: Einfluss von HtrA auf den CiaRH-regulierten Kompetenzverlauf in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* während des Wachstums in C+Y-Medium.

Von dem *S. pneumoniae*-Stamm *ciaH202* $\Delta htrA$ (RKL192) wurde die Kompetenzentwicklung in C+Y-Medium untersucht. Zum Starten des Experiments wurde C+Y-Medium 1 %ig mit einer Glycerinkultur aus C+Y-Medium pH 6,8 beimpft. Proben wurden 5 min nach dem Animpfen, dann im Abstand von 30 min bis zur Stationärphase geerntet und die Transformationseffizienz mithilfe des Transformationsmarkers RKL222 bestimmt. Die Transformationseffizienz (blaue Balken) ist der prozentuale Anteil der Rifampin-resistenten Transformanten bezogen auf die Lebendkeimzahl (CFU = Colony forming units). Das Wachstum (schwarze Kurve) wurde mittels der optischen Dichte bei 600 nm photometrisch verfolgt. Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildung je zwei als repräsentatives Beispiel zeigt.

Die Deletion von *htrA* in einem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System zeigt einen schwachen Effekt auf die Transformierbarkeit (Abbildung 4.7). Das Kompetenzniveau befindet sich zwar im messbaren Bereich (max. 0,003 %), etwas höher als beim *ciaH202* Stamm mit HtrA, allerdings deutlich unter dem Niveau des Wildtyps R6 mit 0,04 % (Abbildung 4.5).

Anschließend sollte nun der Effekt einer *htrA* Deletion auf den csRNA vermittelten Kompetenzverlauf untersucht werden. Da bereits bei der Resistenz ein unterschiedlicher Effekt der *htrA* Deletion auf die einzelnen csRNAs zu beobachten war (siehe 4.1.1), könnte dies auch bei der Kompetenzentwicklung der Fall sein. Abbildung 4.8 zeigt die Ergebnisse der Kompetenzuntersuchungen der *htrA* Deletionsstämme in Kombination mit einzelnen csRNAs. Zur Konstruktion dieser Stämme wurde ebenfalls das *htrA::aphIII* PCR-Produkt verwendet. Dieses wurde in die schon zuvor untersuchten Stämme mit einzelnen csRNAs eingebracht (siehe 4.1.1).



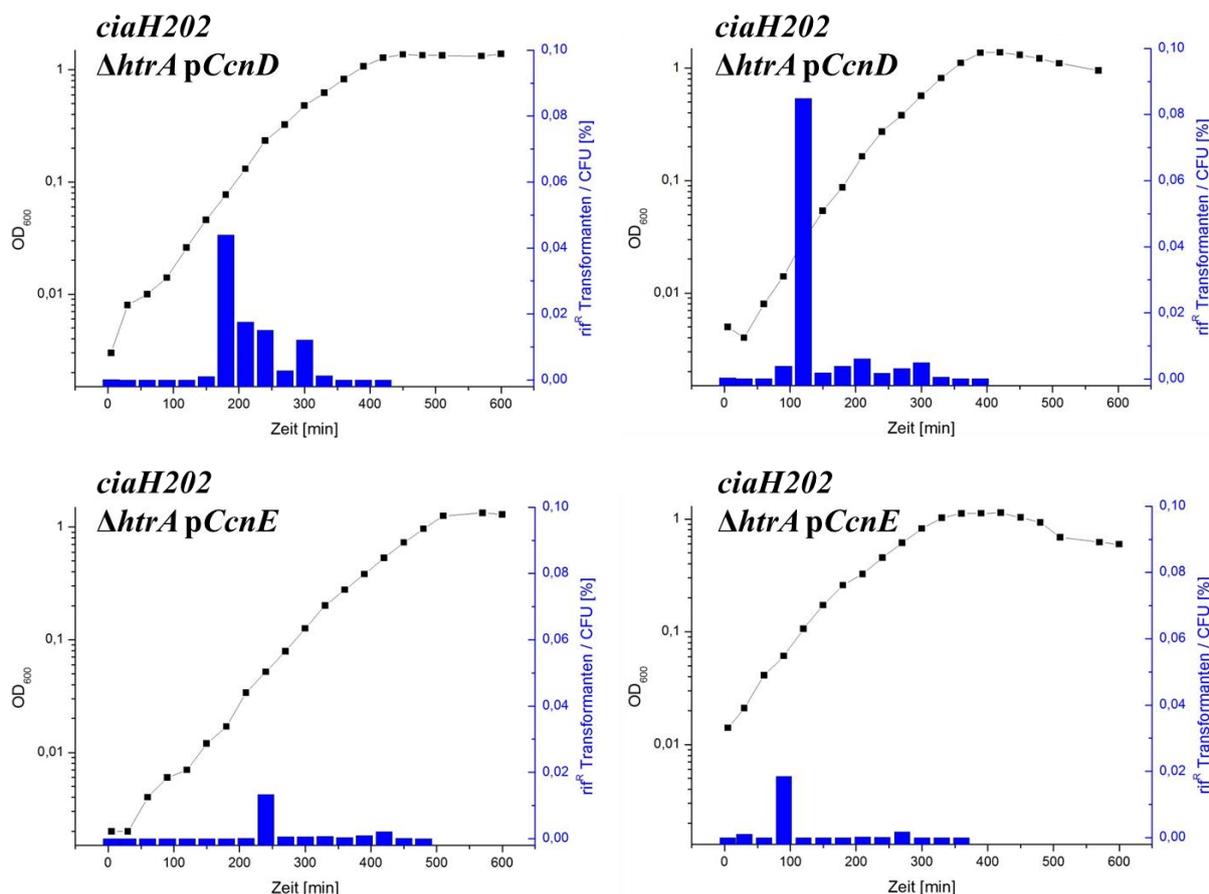


Abbildung 4.8: Einfluss von HtrA auf den csRNA vermittelten Kompetenzverlauf während des Wachstums in C+Y-Medium.

Von den *S. pneumoniae*-Stämmen *ciaH202* $\Delta htrA$ $\Delta ccnA$ -E pCcnA (RKL626), *ciaH202* $\Delta htrA$ $\Delta ccnA$ -E pCcnB (RKL627), *ciaH202* $\Delta htrA$ $\Delta ccnA$ -E pCcnC (RKL628), *ciaH202* $\Delta htrA$ $\Delta ccnA$ -E pCcnD (RKL629), *ciaH202* $\Delta htrA$ $\Delta ccnA$ -E pCcnE (RKL630) wurde die Kompetenzentwicklung in C+Y-Medium untersucht. Zum Starten des Experiments wurde C+Y-Medium 1 %ig mit einer Glycerinkultur aus C+Y-Medium pH 6,8 beimpft. Proben wurden 5 min nach dem Animpfen, dann im Abstand von 30 min bis zur Stationärphase geerntet und die Transformationseffizienz mithilfe des Transformationsmarkers RKL222 bestimmt. Die Transformationseffizienz (blaue Balken) ist der prozentuale Anteil der Rifampin-resistenten Transformanten bezogen auf die Lebendkeimzahl (CFU = Colony forming units). Das Wachstum (schwarze Kurve) wurde mittels der optischen Dichte bei 600 nm photometrisch verfolgt. Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildungen je zwei als repräsentative Beispiele zeigen.

Die Deletion von *htrA* führt in den Stämmen, welche csRNA1 (pCcnA), csRNA2 (pCcnB) und csRNA3 (pCcnC) enthalten, zu einem Verlust der natürlichen Kompetenz (Abbildung 4.8), die vor der *htrA* Deletion in diesen Stämmen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.6). Innerhalb einer Versuchsreihe konnten nur einige wenige Transformanten für diese Stämme nachgewiesen werden. Das Kompetenzniveau liegt in etwa in dem Bereich des Stammes *ciaH202* $\Delta htrA$ (0,003 %), für $\Delta ccnA$ -E pCcnA max. 0,001 %, für $\Delta ccnA$ -E pCcnB max. 0,006 % und $\Delta ccnA$ -E pCcnC max. 0,009 %. Des Weiteren ist anzumerken, dass diese Maxima erst spät in der exponentiellen Wachstumsphase nach 390-420 min auftreten. Im Gegensatz dazu zeigen die Stämme mit csRNA4 (pCcnD) und csRNA5 (pCcnE), bei welchen vor der *htrA* Deletion nur wenige Transformanten nachweisbar waren (Abbildung 4.6), innerhalb dieser Versuchsreihe deutliche Transformierbarkeit (Abbildung 4.8). Das

Kompetenzniveau des Stammes *ciaH202 ΔhtrA ΔccnA-E pCcnD* liegt mit 0,08 % nicht nur deutlich höher als der Stamm *ciaH202 ΔhtrA* (0,003 %), sondern übersteigt sogar das Kompetenzniveau des Wildtyp R6 mit 0,04 %. Der Stamm *ciaH202 ΔhtrA ΔccnA-E pCcnE* hingegen zeigt eine Transformierbarkeit von 0,01846 %, was einer in etwa 10 fachen Erhöhung gegenüber dem Stamm *ciaH202 ΔhtrA* und einer 2 fachen Erniedrigung gegenüber dem Wildtyp R6 entspricht.

Aufgrund der in der β-Laktamresistenz und Kompetenz beobachteten überraschenden unterschiedlichen Effekte einzelner csRNAs in diversen genetischen Hintergründen ergaben sich deutliche Zweifel an der Korrektheit der hier untersuchten Stämme. Schon bei der Konstruktion der untersuchten Stämme traten erhebliche Probleme auf.

Obwohl das *ciaH202*-Allel in früheren Arbeiten als etwas stabiler beschrieben ist (Müller, 2011), ergaben sich bei der Arbeit mit Stämmen, welche eine Kombination aus dem hyperaktivem *ciaH202*-Allel und einzelnen csRNAs enthalten, deutliche Probleme. Mittels Sequenzierung konnten immer wieder Pseudorevertanten nachgewiesen werden, welche zusätzliche Mutationen in *ciaR* oder *ciaH* trugen, welche zu einer verminderten oder vollständigen Inaktivierung der CiaRH Aktivität führten. Daher sollten die CiaR Mengen in den hier verwendeten Stämmen mithilfe von CiaR-spezifischen Antikörpern überprüft werden.

Während der Konstruktion wurden die Stämme immer wieder auf Cefotaxim ausgestrichen um das vermehrte Auftreten von Pseudorevertanten zu minimieren. Dies hatte allerdings zur Folge, dass zumindest in einem Stamm eine Veränderung im Penicillin-bindenden-Protein 2x nachgewiesen wurde. Da aus früheren Untersuchungen bekannt ist, dass diverse Mutationen in den Penicillin-bindenden-Proteinen nur im Zusammenspiel mit einem hyperaktiven CiaRH System zu starker Resistenzentwicklung führen (Zerfaß, 2010), wurden die Penicillin-bindenden-Proteine in den hier verwendeten Stämmen mittels Bocillinmarkierung untersucht.

Des Weiteren sollte innerhalb dieser Überprüfung der Effekt der *htrA* Deletion auf die einzelnen csRNAs genauer untersucht werden. In früheren Arbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Inaktivierung der Serinprotease HtrA zu einer etwa 2-fachen Erhöhung des CiaRH Systems im Wildtyp führt. Die Daten bezüglich des hyperaktiven *ciaH202*-Allels waren in diesem Fall nicht ganz eindeutig (Müller, 2011). In weiteren Studien konnte im Wildtyp gezeigt werden, dass diese Steigerung der Aktivität über die Promotoren der einzelnen CiaR-regulierten Gene, zum Teil unabhängig von CiaH, vermittelt wird (Shambhu, 2013). Das allerdings bedeutet, dass alle CiaR-regulierten Gene stärker reguliert werden. Dass die Promotoren der csRNAs unterschiedlich beeinflusst werden, konnte in diesem Versuch nicht beobachtet werden. Ein differenzierter Effekt der Serinprotease müsste sich daher auf die Stabilität und darüber auf die Menge der csRNAs auswirken.

Aufgrund der oben beschriebenen Probleme wurden die Penicillin-bindenden-Proteine, die Aktivität des CiaRH Systems und die Menge an csRNAs im Folgenden genauer untersucht.

4.2.3 Kontrolle der verwendeten *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Derivate

4.2.3.1 Nachweis der Penicillin-bindenden-Proteine

Die Penicillin-bindenden-Proteine (PBPs) waren die ersten in *S. pneumoniae* identifizierten Resistenzdeterminanten. Da β -Laktamantibiotika ein Strukturanalog des natürlichen Substrats, dem D-Alanin-D-Alanylrest der Pentapeptidkette der Peptidoglykanuntereinheiten sind, binden diese ebenfalls kovalent an das katalytisch aktive Serin der PBPs. Hierdurch wird die Transpeptidierung der Mureinstränge unterbunden. Durch die fehlende Quervernetzung kommt es zur Instabilität der Zellhülle, was letztlich zur Lyse führen kann (Tipper & Strominger, 1965). Es gibt Hinweise darauf, dass diverse Veränderungen in den PBPs nur in Kombination mit einem hyperaktiven CiaRH-System zur vollständigen Resistenzentwicklung führt (Zerfaß, 2010), wodurch eine Verbindung zwischen dem CiaRH System und den PBPs deutlich wird. Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Resistenzeffekten einzelner csRNAs um Unterschiede in den PBPs handelt, wurden diese mittels Bocillinmarkierung und Sequenzierung untersucht.

S. pneumoniae besitzt sechs verschiedene PBPs, die bezüglich ihres Molekulargewichts und ihren enzymatischen Aufgaben unterschieden werden.

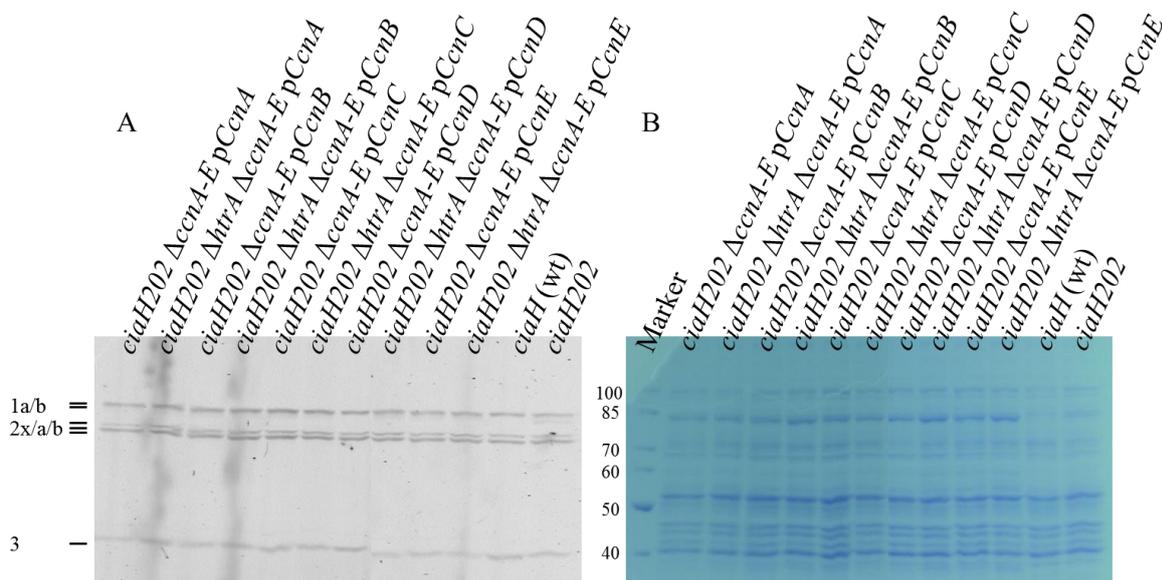


Abbildung 4.9: PBP-Profil der verwendeten *S. pneumoniae* R6 Derivaten.

Gezeigt ist das PBP-Profil (A) und das entsprechende Coomassiegefärbte Gel (B), der für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration verwendeten Stämme (von links nach rechts: *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnA* (RKL342), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* p*CcnA* (RKL626), *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnB* (RKL343), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* p*CcnB* (RKL627), *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnC* (RKL344), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* p*CcnC* (RKL628), *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnD* (RKL631), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* p*CcnD* (RKL629), *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnE* (RKL345), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* p*CcnE* (RKL630), *ciaH* (wt), *ciaH202*). Die Stämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 in C+Y-Medium inkubiert. Für die Markierung der Penicillin-bindenden-Proteine wurde das Lysat mit 3 μ M Bocillin (Finale Konzentration) versetzt und für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Der PBP-Bocillin-Komplex wurde, nach der Auftrennung über ein Spezialgel, mittels Fluorographie visualisiert. Das Laufmuster der einzelnen PBPs ist links dargestellt.

In Abbildung 4.9 ist keine Veränderung der PBPs in den diversen Stämmen zu erkennen, alle zeigen das gleiche PBP Muster wie der Wildtyp *S. pneumoniae* R6. Da nicht alle PBP-Veränderungen mittels Bocillin nachgewiesen werden können, wurde PBP2x zusätzlich sequenziert (Zerfaß, 2010). Hier wurde lediglich PBP2x ausgewählt, da in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass PBP2x als erstes PBP Veränderungen durchläuft, wenn die Selektion auf Cefotaxim erfolgt. Es konnte in keinem der verwendeten Stämme eine Mutation in PBP2x detektiert werden. Die Veränderung der minimalen Hemmkonzentration der Stämme mit einzelnen csRNAs wird daher nicht durch aufgetretene Mutationen in den PBPs verursacht.

Da Veränderungen in der CiaRH Aktivität oder der Expression der csRNAs auch einen Effekt auf die Resistenzentwicklung haben könnten, wurden diese ebenfalls in den verwendeten Stämmen untersucht.

4.2.3.2 Nachweis der CiaRH Aktivität mittels Western Blot

Die Aktivität des CiaRH Systems wird an dieser Stelle mittels eines spezifischen CiaR-Antikörpers nachgewiesen. Auf Aktivitätsmessungen mittels β -Galaktosidaseassays wurde in diesem Fall verzichtet, um in weiteren Versuchen die Möglichkeit offenzuhalten verschiedene Gene über die Integrationsstellen des pPP2/pTP2 einzubringen.

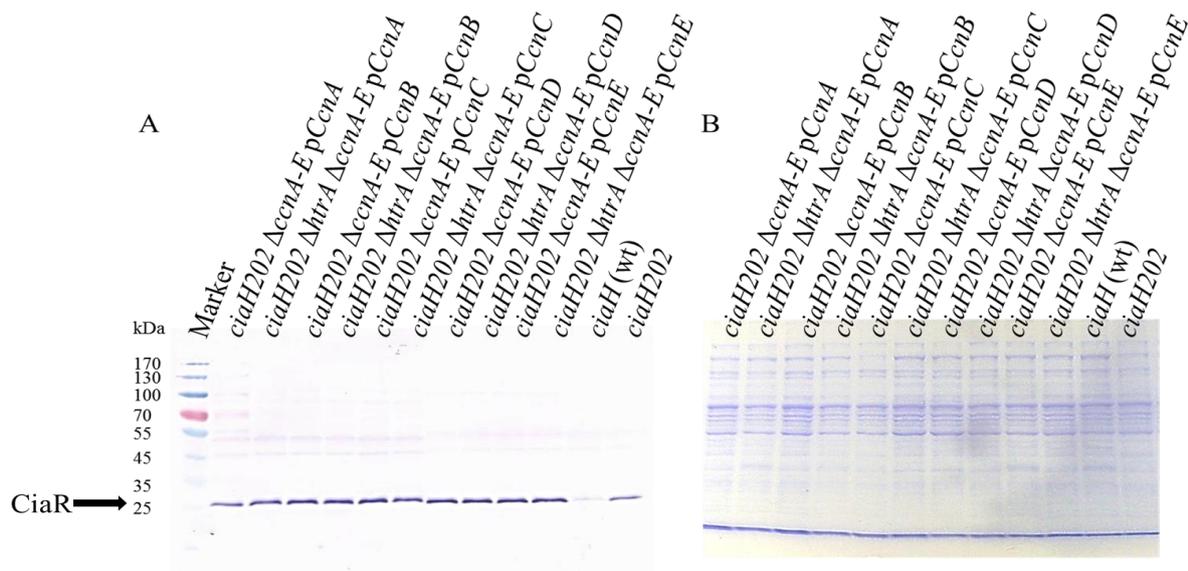


Abbildung 4.10: Western Blot Analyse zur Detektion von CiaR in den verwendeten *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Derivaten.

Gezeigt ist eine PVDF-Membran (A) und das entsprechende Coomassiegefärbte Gel (B) mit dem durch Western Blotting detektierten CiaR (von links nach rechts: *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnA* (RKL342), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* p*CcnA* (RKL626), *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnB* (RKL343), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* p*CcnB* (RKL627), *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnC* (RKL344), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* p*CcnC* (RKL628), *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnD* (RKL631), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* p*CcnD* (RKL629), *ciaH202* Δ *ccnA-E* p*CcnE* (RKL345), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* p*CcnE* (RKL630), *ciaH* (wt), *ciaH202*). Die untersuchten Stämme wurden in C+Y-Medium bei 37°C bis zu OD₆₀₀ = 0,8 inkubiert und anschließend lysiert. Nach erfolgter elektrischer Auftrennung der Proteine in einem 10 %igen

SDS-Gel wurden diese durch ElektrobloTTing auf eine PVDF-Membran übertragen. Der primäre Antikörper (Anti-CiaR) wurde 1:5000 verdünnt, der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen) wurde in einer Verdünnung von 1:30000 eingesetzt. Die aufgetragene Lysatmenge entspricht einem Kulturvolumen von 125 μ l bei OD₆₀₀ = 0,7. CiaR von *S. pneumoniae* R6 hat ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Als Marker wurde der peqGoldIV-Marker verwendet.

Wie in Abbildung 4.10 zu sehen ist, zeigen alle Stämme, welche das hyperaktive *ciaH202*-Allel tragen, eine erhöhte CiaR Menge im Vergleich zum Wildtyp R6, welche durch die stärkere Aktivierung des CiaRH Systems zustande kommt. Vergleicht man die Menge an CiaR in diesen Stämmen untereinander, stellt man fest, dass alle in etwa die gleiche Bandenstärke aufweisen. Anhand dieses Ergebnisses lässt sich sagen, dass alle verwendeten Stämme ein aktives *ciaH202*-Allel tragen.

Somit konnte gezeigt werden, dass die starke Erhöhung der Resistenz weder durch eine Veränderung der PBPs noch durch eine Veränderung der CiaR Menge verursacht wird.

Die durch die Deletion von *htrA* verursachten unterschiedlichen Auswirkungen auf die einzelnen csRNAs könnten durch verschiedene Effekte auf die Expression oder Stabilität der csRNAs zustande kommen. Daher wurden die Mengen an csRNAs in den verwendeten Stämmen mittels Northern Blot analysiert.

4.2.3.3 Nachweis der csRNAs mittels Northern Blot

In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass das Deletieren von *htrA* auf die fünf csRNAs unterschiedlich wirkt. Die hohe Resistenz der Stämme *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnD* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnE* ist nach Deletion von *htrA* nicht mehr zu beobachten, wohingegen die csRNA1, 2 und 3 vermittelte Resistenz ansteigt (Abbildung 4.4). Daher stellt sich die Frage, ob HtrA direkt oder über sekundäre Effekte die Menge oder Stabilität der csRNAs beeinflusst. Um dies zu überprüfen, wurde ein Northern Blot der verwendeten Stämme angefertigt. Die einzelnen Signale der csRNA1, csRNA2, csRNA3 und csRNA4 sind im Wildtyp R6 und in dem Stamm mit *ciaH202*-Allel nicht zu detektieren, da diese durch ihre Größe in etwa auf derselben Höhe laufen. Allerdings ist deutlich zu erkennen, dass die Intensität dieser dicken Bande im Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* stärker ist als im Wildtyp R6.

Wie in Abbildung 4.11 zu erkennen ist, beeinflusst die Deletion von *htrA* die Menge der csRNAs nicht maßgeblich. Wenn überhaupt lassen sich nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Stämmen und den jeweiligen *htrA* Deletionsmutanten feststellen. Der Anstieg der Resistenz und die Inhibition der Kompetenz in den Stämmen mit csRNA1, 2 und 3 kann daher nicht über eine stärkere Expression dieser csRNAs erklärt werden. Ebenso kann der, durch die *htrA* Deletion vermittelte, Verlust der hohen Resistenz und der Kompetenzinhibition der Stämme *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnD* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnE* nicht durch eine erniedrigte Menge dieser csRNAs zustande kommen.

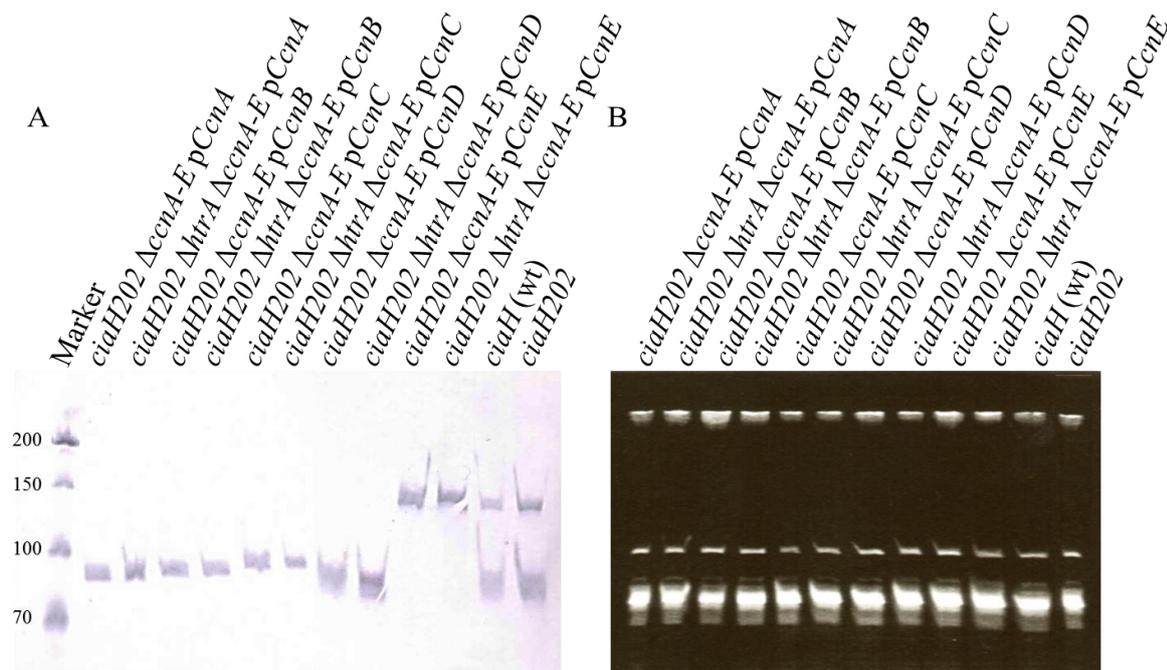


Abbildung 4.11: Northern Blot Analyse mit Gesamt-RNA der verwendeten *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Derivaten und csRNA-spezifischen Sonden.

Gezeigt ist die entsprechende Nylon-Membran (A) mit denen durch Northern Blotting detektierten csRNAs und das entsprechende Ethidium-Bromid gefärbte Gel (B). Jeweils 3 μ g Gesamt-RNA wurden aufgetrennt (von links nach rechts: *ciaH202* Δ *ccnA-E* pCcnA (RKL342), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* pCcnA (RKL626), *ciaH202* Δ *ccnA-E* pCcnB (RKL343), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* pCcnB (RKL627), *ciaH202* Δ *ccnA-E* pCcnC (RKL344), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* pCcnC (RKL628), *ciaH202* Δ *ccnA-E* pCcnD (RKL631), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* pCcnD (RKL629), *ciaH202* Δ *ccnA-E* pCcnE (RKL345), *ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnA-E* pCcnE (RKL630), *ciaH* (wt), *ciaH202*). Die untersuchten Stämme wurden in C+Y-Medium bei 37°C bis zu OD₆₀₀ = 0,8 inkubiert und anschließend die enthaltene Gesamt-RNA isoliert. Es wurden Sonden (10 μ M/ml) für alle fünf csRNAs und den Marker verwendet.

Die in der β -Laktamresistenz und Kompetenz ermittelten Ergebnisse können anhand der hier durchgeführten Überprüfungen nicht erklärt werden. Da von einer additiven Wirkung der csRNAs ausgegangen wird, gab es zu Beginn dieser Arbeit keine Hinweise darauf, dass das Vorkommen einer einzelnen csRNA in einem hyperaktiven CiaRH Hintergrund zu Problemen führt. Trotzdem wurde eine starke Instabilität beobachtet. Hierbei kam es vermehrt zu Zusatzmutationen in den *ciaRH* Genen, welche meist zu einer Reduktion der Hyperaktivität führen. Da es wegen dieser Instabilität durchaus möglich ist, dass noch weitere Mutationen in den Stämmen mit hyperaktivem CiaRH System in Kombination mit einzelnen csRNAs aufgetreten sind, wurde eine andere Strategie gewählt um den Effekt der einzelnen csRNAs auf die β -Laktamresistenz und Kompetenz zu untersuchen. Hierbei sollte das hyperaktive *ciaH202*-Allel unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors in Stämme eingebracht werden, in welchen nur eine csRNA im Genom enthalten ist. Zur Konstruktion des induzierbaren *ciaH202*-Allels wurde ein Tetracyclin-induzierbares Expressionssystem verwendet.

4.3 Das *ciaH202*-Allel unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems

Durch die Verwendung eines induzierbaren Systems ergibt sich die Möglichkeit, die Stämme während der Konstruktion in einem uninduzierten Zustand, also vergleichbar mit $\Delta\textit{ciaH}$ zu halten und die Induktion des *ciaH202*-Allels erst bei der jeweiligen Messung zu aktivieren. Hierfür wurde das Plasmid pTEX*ciaH202* in Stämme eingebracht, in denen zuvor die auf dem Genom befindliche Histidinkinase deletiert wurde. Der Aufbau dieses Plasmids und die Konstruktion der in den anschließenden Untersuchungen verwendeten Stämme ist unter Punkt 3.2.26 beschrieben. Die genetische Organisation im Genom ist in Abbildung 4.12 dargestellt.

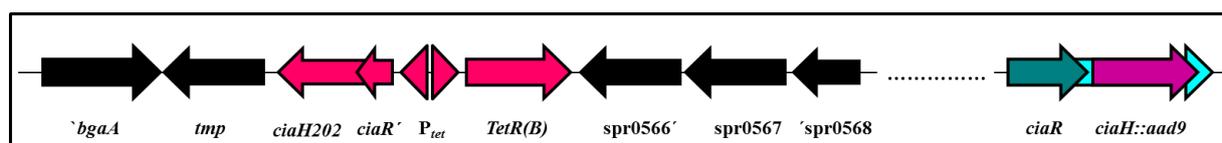


Abbildung 4.12: Genetische Organisation diverser konstruierter Stämme nach der Integration von pTEX*ciaH202*.

Gezeigt ist die genetische Karte der Region zwischen *'bgaA* und *'spr0568* in *S. pneumoniae* nach der Integration von pTEX*ciaH202* und der Inaktivierung von *ciaH* durch die Spectinomycinkassette. Die einzelnen Gene auf dem Genom sind durch Pfeile gekennzeichnet: *'bgaA'*: Teil des β -Galaktosidase Gens, *tmp*: Trimethoprim Resistenz, *spr0566*-*spr0568*: Funktion nicht bekannt, *ciaR*: Response Regulator, *ciaH*: Histidinkinase, *aad9*: Spectinomycinresistenzgen. Da *ciaR* und *ciaH* in einem Operon kodiert sind, wurde die Spectinomycinkassette innerhalb des *ciaH* Gens integriert. Somit entsteht kein negativer Einfluss auf *ciaR* oder die nachfolgenden Gene.

Das pTEX*ciaH202* enthält die Operatorsequenzen des MFS TetA Efflux-Transporter, aus *B. subtilis* mit dem entsprechenden *tetR(B)*. *Tet(B)* kodiert dabei den Repressor, der an die Operatorsequenzen bindet und die Transkription der Gene hemmt (Abbildung 3.9). Downstream dieses Bereiches liegt das *ciaH202*-Allel. Da *ciaR* und *ciaH* in einem Operon kodiert sind wurde dem *ciaH202*-Allel zusammen mit einem sogenannten *ciaR*-Minigen kloniert. Dadurch bleibt die Translationseinheit erhalten aber *ciaR* ist zu großen Teilen deletiert, und somit nicht aktiv.

Für den verwendeten Promotor P_{tet} konnte in früheren Arbeiten zum einen gezeigt werden, dass ohne Antibiotika Zugabe praktisch keine Aktivität zu verzeichnen ist und er auf die Zugabe von Anhydrotetracyclin in gleichem Maße wie auf Tetracyclin reagiert (George, 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieser Promotor nach kurzer Zeit aktiv wird und kein Nachteil durch hohe Dosen Antibiotika zu erkennen ist, der Promotor allerdings schon bei 50 ng/ml vollständige Aktivität zeigt. Dieser Promotor P_{tet} wurde upstream des *ciaH202*-Allels kloniert und das entstandene Plasmid pTEX*ciaH202* für die weiteren Versuche verwendet.

4.3.1 Untersuchung der Aktivität von pTEX $ciaH202$

Das pTEX $ciaH202$ Plasmid wurde in einen *S. pneumoniae* R6 Stamm integriert, in welchem zuvor das auf dem Genom enthaltene *ciaH* Gen mittels einer Spectinomycinkassette deletiert wurde. Die Aktivität des CiaRH Systems wurde indirekt über die Aktivität des Responseregulators CiaR untersucht. Dazu wurde die Promotoraktivität des CiaR abhängigen Promotors P_{htrA} gemessen, da dieser deutlich auf Veränderungen bezüglich der CiaR Aktivität reagiert (Halfmann *et al.*, 2007a). Dieser Promotor steht stellvertretend für die Aktivierung des gesamten CiaR-Regulons. Um die Aktivität dieses Promotors zu untersuchen, wurde dieser als Promotor-*lacZ*-Fusion über das Plasmid pPP2 in das Genom von *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaH$ pTEX $ciaH202$ integriert und die Menge an exprimierter β -Galaktosidase mittels β -Galaktosidaseassay bestimmt (Halfmann *et al.*, 2007b).

Innerhalb der ersten Versuchsreihe sollte ermittelt werden, welche Konzentration an Anhydrotetracyclin benötigt wird, um eine Hyperaktivierung des CiaRH Systems hervorzurufen. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen (zwischen 5 ng/ml und 1 μ g/ml) von Anhydrotetracyclin direkt zu Beginn des Wachstums hinzugegeben und die Kulturen in BHI Medium bis zu einer von $OD_{600} = 0,4$ inkubiert. In weiteren Versuchen sollte ebenfalls die Rolle der Histidinkinase CiaH bei der Induzierung durch Anhydrotetracyclin bestimmt werden. Daher wurden diese Versuchsreihen in BHI durchgeführt. In diesem Medium ist ein Unterschied in der CiaR Aktivität abhängig von der Histidinkinase CiaH zu beobachten (Halfmann *et al.*, 2011). Hier kommt es durch die Deletion der Histidinkinase CiaH zu einem deutlichen Abfall der CiaR Aktivität. In C+Y-Medium dagegen, zeigt die Deletion der Histidinkinase CiaH keinen deutlichen Effekt. CiaR kann unter diesen Bedingungen auch ohne CiaH phosphoryliert werden.

Die Ergebnisse der β -Galaktosidaseassays sind in Abbildung 4.13 zusammengefasst. Die Untersuchung des CiaR-abhängigen Promotors P_{htrA} ergab hierbei für alle getesteten Konzentrationen eine starke Aktivierung des CiaRH Systems. Die Aktivität liegt für alle getesteten Konzentrationen bei ca. 5000 Units, wohingegen ohne Induktion nur eine Aktivität von etwa 160 U gemessen wurde. Die Induktion durch Antibiotikazugabe, auch bei geringeren Konzentrationen, führen zu einer 31 fachen Erhöhung der Promotoraktivität von P_{htrA} . Eine solch starke Aktivierung konnte in früheren Studien für das *ciaH202*-Allel nicht beobachtet werden. Im Wildtyp R6 führt der Austausch des *ciaH*-Allels gegen das *ciaH202*-Allel zu einem etwa 14 fachen Anstieg in C+Y-Medium (Müller, 2011). Allerdings handelt es sich hierbei um ein synthetisches System, wobei durchaus die Möglichkeit besteht, dass sich dieses anders verhält. Eine starke Hyperaktivierung des CiaRH System ist somit mit diesem synthetischen System möglich und Pseudorevertanten während der Konstruktion sollten, da das System ohne Antibiotikazugabe nur geringe Aktivität zeigt, nicht auftreten.

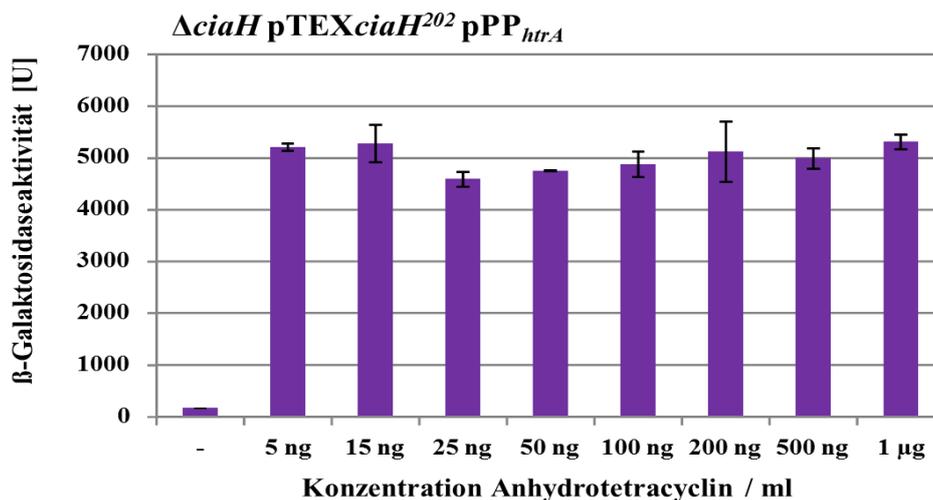


Abbildung 4.13: Durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* pTEX*ciaH202*.

Das Wachstum des untersuchten Stammes erfolgte in BHI, welches zu Beginn mit der entsprechenden Menge Anhydrotetracyclin versetzt wurde, bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Die Units wurden ebenfalls bei einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,8$ ermittelt. Hierbei ergab sich kein Unterschied zu den gezeigten Ergebnissen. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* pTEX*ciaH202* pPP2*htrA* (RKL559) ohne und nach Induktion mit unterschiedlichen Anhydrotetracyclin Konzentrationen (- ohne Induktion).

In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass die Kompetenzentwicklung auf Änderungen in der Proteinsynthese reagiert. Es konnte gezeigt werden, dass Antibiotika, welche Translationsfehler hervorrufen wie z.B. Streptomycin und Kanamycin, die Kompetenzentwicklung induzieren. Wohingegen Antibiotika wie z.B. Spectinomycin und Tetracyclin, welche die Genauigkeit der Translation positiv beeinflussen, die Kompetenzentwicklung unterdrücken (Stevens *et al.*, 2011). Des Weiteren konnten die Autoren zeigen, dass dieser Effekt über die Serinprotease HtrA reguliert wird, indem diese die Kompetenzentwicklung unterdrückt, falls Translationsfehler verstärkt auftreten. Es ist daher möglich, dass die Zugabe von Tetracyclin bzw. Anhydrotetracyclin die Aktivität von HtrA beeinflusst. Da die Zugabe von Anhydrotetracyclin einen Effekt auf den *htrA* Promotor haben könnte und die Aktivität von HtrA wiederum die Aktivität des CiaRH Systems beeinflusst (Müller, 2011), sollte dies zuvor untersucht werden. Auch die Rolle der Histidinkinase CiaH sollte in diesem Zusammenhang ermittelt werden.

Hierfür wurde die Aktivität des *htrA* Promotors in Brain Heart Infusion (BHI) bei einer $OD_{600} = 0,4$, ohne und nach Zugabe von 100 ng/ml Anhydrotetracyclin, in den Stämmen *S. pneumoniae* R6 pPP_{*htrA*} und *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* pPP_{*htrA*} mittels β -Galaktosidaseassay bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Für beide Stämme konnte ohne und mit Induktion durch 100 ng/ml Anhydrotetracyclin dieselbe Aktivität des *htrA* Promotors bestimmt werden. Hierbei zeigt sich für den Wildtyp R6 eine Aktivität von ca. 450 U. Der *ciaH* Deletionsstamm erreicht unter diesen Bedingungen

in beiden Fällen eine Aktivität von ca. 25 U. Durch die Zugabe von Anhydrotetracyclin kommt es zu keinem unerwünschten Effekt auf die Aktivität von HtrA oder dem CiaRH System.

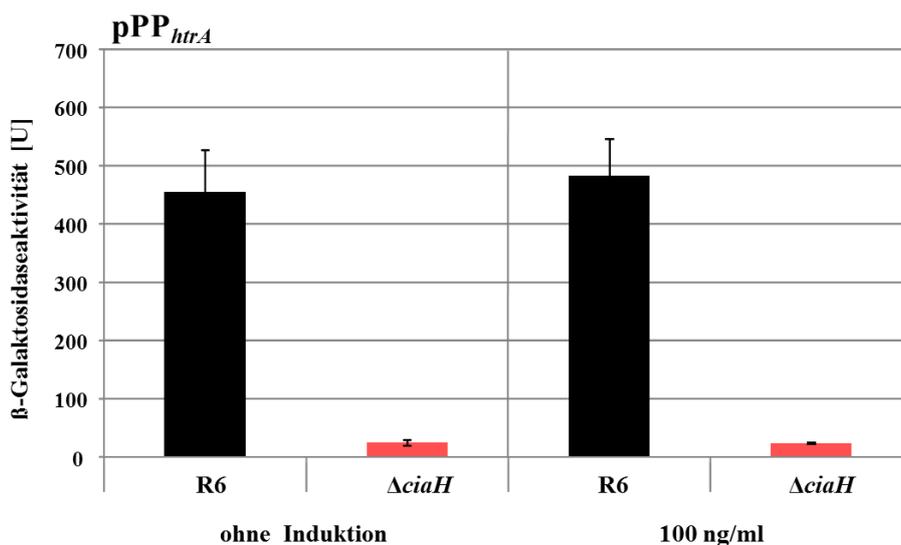


Abbildung 4.14: Durch den Promotor P_{htrA} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH*.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI, welches zu Beginn mit der entsprechenden Menge Anhydrotetracyclin versetzt wurde, bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Die Units wurden ebenfalls bei einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,8$ ermittelt. Hierbei ergab sich kein Unterschied zu den gezeigten Ergebnissen. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 pPP2*htrA* (RKL43) und *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* pPP2*htrA* (RKL86) ohne und nach Induktion mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin.

Innerhalb dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass das Tetracyclin induzierbare System zur gezielten Expressionskontrolle des *ciaH202*-Allels in *S. pneumoniae* genutzt werden kann. Anschließend wurde dieses System verwendet, um die Ergebnisse aus den Kapiteln 4.1 (β -Laktamresistenz) und 4.2 (natürlicher Kompetenz) zu überprüfen. Hierbei wird durch das induzierbare System die Stabilität der Stämme während den Stammkonstruktionen gewährleistet.

4.3.2 Auswirkungen des Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems auf die β -Laktam Suszeptibilität

Um den Effekt einzelner csRNAs mithilfe des Tetracyclin-induzierbaren Systems zu untersuchen, war es nötig, Stämme zu konstruieren, welche nur eine csRNA innerhalb ihres Genoms enthalten. Die pSW1 Derivate mit einzelnen RNAs konnten hier nicht verwendet werden, da pSW1 an derselben Stelle wie das verwendete pTEX Plasmid im Genom integriert. Die einzelnen csRNAs wurden mithilfe der Cheshire-Kassette deletiert (siehe 3.2.25). Anschließend wurde das auf dem Genom befindliche Gen der Histidinkinase CiaH durch eine Spectinomycinkassette ersetzt und das

pTEX*ciaH202* in die jeweiligen Stämme eingebracht (siehe 3.2.26). Das C+Y Medium wurde noch vor dem Animpfen mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt. Die Stämme wurden in diesem Medium bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3 angezogen, 1:1000 in NaCl verdünnt und anschließend auf Platten mit unterschiedlicher Cefotaximkonzentration auf getropft. Nach 48 h Inkubation bei 37°C wurde das Ergebnis dokumentiert (Abbildung 4.15). Es ist klar zu erkennen, dass es durch die Induktion des *ciaH202*-Allels zu einem Anstieg der Resistenz in allen Stämmen im Vergleich zu dem Stamm *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* (0,01 μ g/ml) kommt. Die Stämme, welche alle csRNAs, csRNA2 (Δ *ccnACDE*) oder csRNA3 (Δ *ccnABDE*) enthalten, wachsen noch bei einer Konzentration von 0,02 μ g/ml und erreichen somit die höchste minimale Hemmkonzentration innerhalb dieser Versuchsreihe. Eine etwas geringere Resistenz von 0,017 μ g/ml zeigen die Stämme mit csRNA1 (Δ *ccnBCDE*), csRNA4 (Δ *ccnABCE*) und csRNA5 (Δ *ccnABCD*). Diese Ergebnisse widersprechen denen in 4.1.1 ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen. Mithilfe des induzierbaren Systems ist der beobachtete große Resistenzanstieg in den Stämmen mit csRNA4 (p*CcnD*) und csRNA5 (p*CcnE*) nicht nachzuweisen (Abbildung 4.2). Es ist davon aus zu gehen, dass es in den instabilen hyperaktiven Stämmen, während der Konstruktion, zu einer Zusatzmutation im Genom gekommen ist, die zusammen mit csRNA4 bzw. csRNA5 den Resistenzanstieg bewirkt. Die Überexpression dieser beiden csRNAs alleine hingegen führt nicht zu einer extremen Resistenzentwicklung.

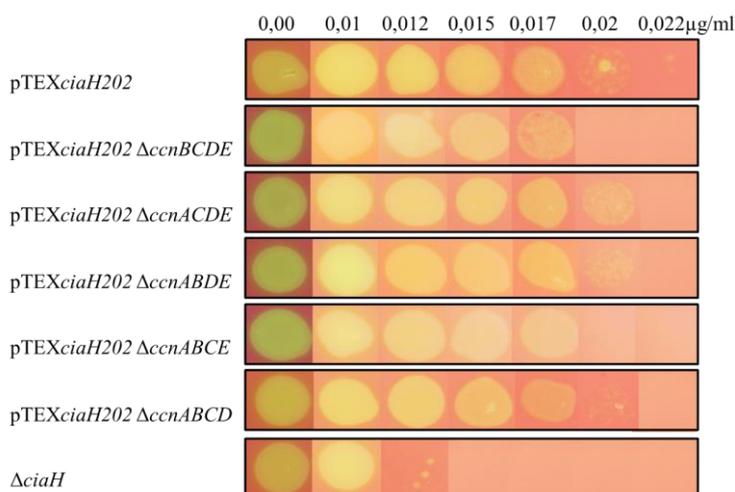


Abbildung 4.15: Untersuchung der Resistenz von *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* pTEX*ciaH202* sowie von seinen Derivaten mit einzelnen csRNAs, unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren gegen das β -Laktamantibiotikum Cefotaxim.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Tropfentests für die verschiedenen Stämme mit unterschiedlichen csRNAs (von oben nach unten: pTEX*ciaH202*, pTEX*ciaH202* Δ *ccnBCDE* (RKL729), pTEX*ciaH202* Δ *ccnACDE* (RKL730), pTEX*ciaH202* Δ *ccnABDE* (RKL731), pTEX*ciaH202* Δ *ccnABCE* (RKL732), pTEX*ciaH202* Δ *ccnABCD* (RKL733) und R6 Δ *ciaH*) bei von links nach rechts ansteigenden Antibiotikakonzentrationen. Die Bereiche der D-Blutagarplatten, auf denen ein Bakterienwachstum stattgefunden hat, sind durch die α -Hämolyse der Bakterien grün verfärbt. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen bei 37°C in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 inkubiert, anschließend 1:1000 in NaCl verdünnt, 30 μ l dieser Verdünnung gespottet und die Platten für 48h bei 37°C inkubiert. Noch vor dem Animpfen wurde das Medium mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin zur Induktion versetzt.

Da innerhalb der Resistenzuntersuchungen auch ein unterschiedlicher Effekt einer *htrA* Deletion beobachtet wurde, sollte auch dies nochmal mit dem induzierbaren System überprüft werden. Hierzu wurde in allen oben getesteten Stämmen die Serinprotease HtrA mittels einer Kanamycinresistenzkassette deletiert. Anschließend wurde auch bei diesen Stämmen die minimale Hemmkonzentration wie oben beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.16 dargestellt.

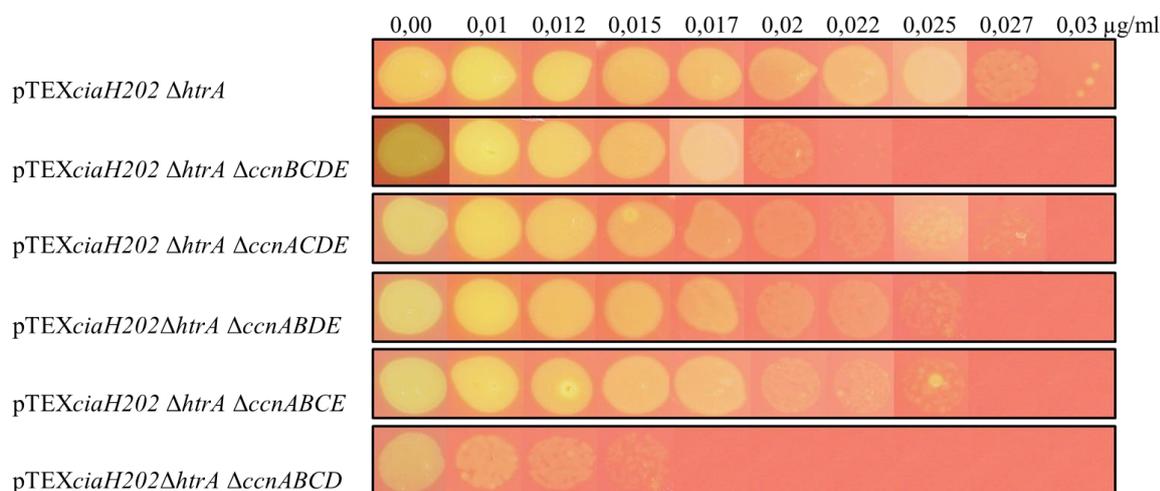


Abbildung 4.16: Untersuchung der Resistenz von *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* Δ *htrA* pTEX*ciaH202* sowie von seinen Derivaten mit einzelnen csRNAs, unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren gegen das β -Laktamantibiotikum Cefotaxim.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Tropfentests für die verschiedenen Stämme mit unterschiedlichen csRNAs (von oben nach unten: pTEX*ciaH202* Δ *htrA*, pTEX*ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnBCDE* (RKL737), pTEX*ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnACDE* (RKL738), pTEX*ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnABDE* (RKL739), pTEX*ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnABCE* (RKL740) und pTEX*ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnABCD* (RKL741)) bei von links nach rechts ansteigenden Antibiotikakonzentrationen. Die Bereiche der D-Blutagarplatten, auf denen ein Bakterienwachstum stattgefunden hat, sind durch die α -Hämolyse der Bakterien grün verfärbt. Die Stämme wurden vor dem Auftropfen bei 37°C in C+Y-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 inkubiert, anschließend 1:1000 in NaCl verdünnt, 30 μ l dieser Verdünnung gespottet und die Platten für 48h bei 37°C inkubiert. Noch vor dem Animpfen wurde das Medium mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin zur Induktion versetzt.

Durch die Deletion der Serinprotease HtrA kommt es in fast allen getesteten Stämmen zu einem Anstieg der Resistenz. Die minimale Hemmkonzentration der Stämme mit allen csRNAs (pTEX*ciaH202* Δ *htrA*) und csRNA2 (Δ *ccnACDE*) steigt von 0,02 mg/ml (Abbildung 4.15) auf 0,027 mg/ml (Abbildung 4.16) an. Die Stämme mit csRNA3 und csRNA4 wachsen noch bei einer Konzentration vom 0,025 μ g/ml. Der geringste Anstieg ist im Stamm mit csRNA1 (Δ *ccnBCDE*) zu beobachten. Dieser zeigt lediglich eine Steigerung von 0,017 μ g/ml auf 0,02 μ g/ml. In dem Stamm dagegen, welcher die csRNA5 (Δ *ccnABCD*) enthält, kommt es zu einem Abfall der Resistenz von 0,017 μ g/ml auf 0,015 μ g/ml durch die *htrA* Deletion. Allerdings ist hierbei anzumerken, dass es in diesem Stamm durch die Induktion zu einem stark beeinträchtigten Wachstum kommt, wie in Abbildung 4.17 zu sehen ist. Ohne Induktion ist ein Wildtyp-ähnliches Wachstum zu beobachten.

Durch die Induktion des *ciaH202*-Allels kommt es zu einem deutlich langsameren Wachstum, welches bei einer OD_{600} von etwa 0,7 in die stationäre Phase übergeht. Dieser Stamm wächst sogar schlechter als der Stamm mit *ciaH202*-Allel, welcher alle csRNAs enthält. Dies wiederum ist ein weiterer Beweis für die starke Instabilität der Stämme mit einzelnen csRNAs und hyperaktivem CiaRH System.

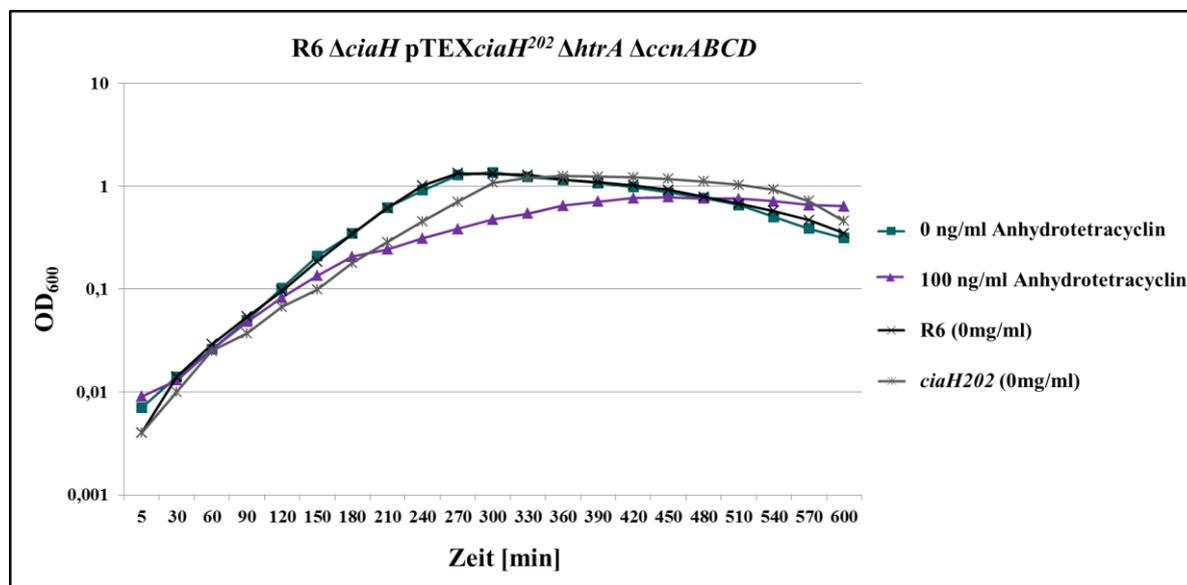


Abbildung 4.17: Einfluss der Anhydrotetracyclin Induktion auf *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* pTEX*ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnABCD*.

Der Stamm *S.pneumoniae* R6 Δ *ciaH* pTEX*ciaH202* Δ *htrA* Δ *ccnABCD* wurde ohne Anhydrotetracyclin (grün) und mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin (lila) bei 37°C in C+Y-Medium inkubiert. Das uninduzierte Wachstum der Stämme *S. pneumoniae* R6 (schwarz) und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* (grau) wurde aus Vergleichszwecken ebenfalls gezeigt. Die Induktion erfolgte vor dem Animpfen. Zum Verfolgen des Wachstumsverlaufs wurde alle 30 min die OD_{600} photometrisch ermittelt.

Insgesamt konnten mithilfe des Tetracyclin-induzierbaren *ciaH202*-Allels Ergebnisse beobachtet werden, welche sich von denen der Stämme mit *ciaH202*-Allel im Genom deutlich unterscheiden. Ob dies auch bezüglich der Kompetenz der Fall ist, wird im nachfolgenden Abschnitt erläutert.

4.3.3 Auswirkungen des Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems auf die Entwicklung der natürlichen Kompetenz

Um die Kompetenzentwicklung in den Tetracyclin-induzierbaren Stämmen zu beobachten, wurde in diese Stämme das Promotorprobe Plasmid pPP_{comX} eingebracht. Das frühe Kompetenzgen *comX* kodiert für einen alternativen Sigmafaktor, ComX, der die Expression der späten Kompetenzgene reguliert, die für die DNA-Aufnahme, -Prozessierung und -Integration essentiell sind. Anhand der *comX* Expression kann somit ermittelt werden, ob der getestete Stamm unter diesen Bedingungen natürliche Kompetenz entwickelt. Die Stämme wurden in C+Y-Medium bei 37°C bis zu einer $OD_{600} =$

0,4 inkubiert. In C+Y-Medium ist ein Kompetenzphänotyp zwischen dem Wildtyp R6 und dem Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel zu erkennen (Müller *et al.*, 2011; siehe 4.2). Dem Medium wurde vor dem Animpfen entweder kein Anhydrotetracyclin, für die Messung ohne Induktion, oder 100 ng/ml mit Induktion zugegeben. Um die, schon in der frühen exponentiellen Wachstumsphase einsetzende Kompetenzinduktion zu beobachten, wären hier eigentlich, wie schon bei den Transformationstest, Messungen über die Zeit nötig. Da allerdings die hier gemessene, durch die Stämme gebildete β -Galaktosidase sehr stabil ist, wurde bei diesen diagnostischen Test der Kompetenz, lediglich eine Messung bei einer von $OD_{600} = 0,4$ durchgeführt.

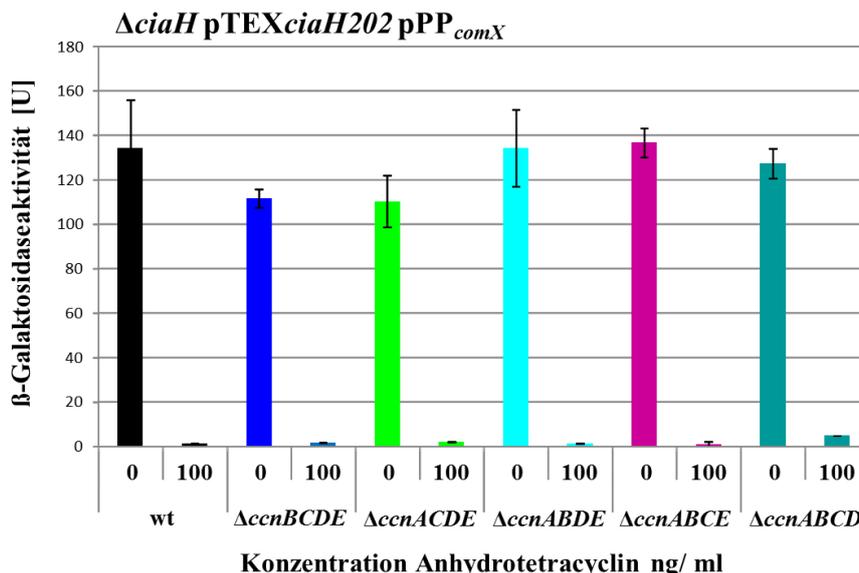


Abbildung 4.18: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaH$ pTEX*ciaH202* und seinen Derivaten.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium, welches gegebenenfalls zu Beginn mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt wurde, bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaH$ pTEX*ciaH202* pPP2*comX* (schwarz), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnBCDE$ $\Delta ciaH$ pTEX*ciaH202* pPP2*comX* (RKL729) (blau), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnACDE$ $\Delta ciaH$ pTEX*ciaH202* pPP2*comX* (RKL730) (grün), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABDE$ $\Delta ciaH$ pTEX*ciaH202* pPP2*comX* (RKL731) (cyan), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCE$ $\Delta ciaH$ pTEX*ciaH202* pPP2*comX* (RKL732) (lila) und *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCD$ $\Delta ciaH$ pTEX*ciaH202* pPP2*comX* (RKL733) (blaugrün) ohne und nach Induktion mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin.

Ohne Induktion ist bei allen Stämmen eine Expression von *comX* messbar (Abbildung 4.18; Tabelle 4.1). Die Aktivität liegt hierbei zwischen 110 und 136 Units. Daher ist klar gezeigt, dass unter diesen Bedingungen alle getesteten Stämme natürliche Kompetenz entwickeln. Bei einer Induktion mit 100 ng/ml zeigt keiner der Stämme eine Expression von *comX*. Alle Stämme zeigen eine Aktivität von unter 1 Unit. Die Aktivität liegt somit unterhalb der nachweisbaren Grenze. Durch die Induktion des *ciaH202*-Allels sind alle csRNAs einzeln in der Lage, die Entwicklung der natürlichen Kompetenz zu unterdrücken.

Tabelle 4.1: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* pTEX*ciaH202* und seinen Derivaten.

<i>RKL- Nummer</i>	<i>Genetik</i>	<i>Induktion (Anhydrotetracyclin ng/ml)</i>	<i>β-Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung</i>
	wt	0	134 \pm 21
		100	1 \pm 0,005
729	Δ <i>ccnBCDE</i>	0	111 \pm 4
		100	1 \pm 0,144
730	Δ <i>ccnACDE</i>	0	110 \pm 11
		100	1 \pm 0,042
731	Δ <i>ccnABDE</i>	0	134 \pm 17
		100	1 \pm 0,043
732	Δ <i>ccnABCE</i>	0	136 \pm 6
		100	1 \pm 0,967
733	Δ <i>ccnABCD</i>	0	127 \pm 6
		100	4 \pm 0,051

Auch hier spielt die im CiaR-Regulon befindliche Serinprotease HtrA eine Rolle, da sie die natürliche Kompetenz durch das Prozessieren von CSP negativ beeinflusst (Cassone *et al.*, 2012). Deshalb sollte auch in diesem Zusammenhang der Einfluss einer *htrA* Deletion untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.19 und Tabelle 4.2 dargestellt.

Die Deletion von *htrA* zeigt im R6 Hintergrund, welcher alle fünf csRNAs enthält, keinen Unterschied. Auch dieser Stamm ist nach Induktion des *ciaH202*-Allels in der Lage, die Entwicklung der natürlichen Kompetenz zu unterdrücken. Für den Stamm, welcher nur csRNA1 enthält (Δ *ccnBCDE*), konnte beobachtet werden, dass sich die untersuchten Transformanten unterschiedlich verhalten. Die Hälfte der Transformanten zeigt nach Induktion eine reduzierte *comX* Expression, die Aktivität liegt hier bei 18 Units im Vergleich zu 88 Units im uninduzierten Zustand. Die andere Hälfte der Transformanten ist nach der Deletion von *htrA* nicht mehr in der Lage, die Kompetenzentwicklung zu unterdrücken. Dieser Effekt konnte auch bei den Stämmen mit csRNA2 (Δ *ccnACDE*) und csRNA3 (Δ *ccnABDE*) beobachtet werden. Nach der Deletion von *htrA* wird die Kompetenzentwicklung durch diese csRNAs nicht unterdrückt. Für die Stämme mit csRNA4 (Δ *ccnABCE*) und csRNA5 (Δ *ccnABCD*) konnte ein positiver Effekt auf die Kompetenzentwicklung nach Induktion beobachtet werden. Hier steigt die Aktivität von 118 Units bzw. 115 Units ohne Induktion auf 264 bzw. 322 Units an. Ein positiver Effekt einzelner csRNAs auf die Kompetenzentwicklung konnte zuvor noch nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen klar für einen additiven Effekt der csRNAs, welche zum Teil auch entgegengesetzt wirken können.

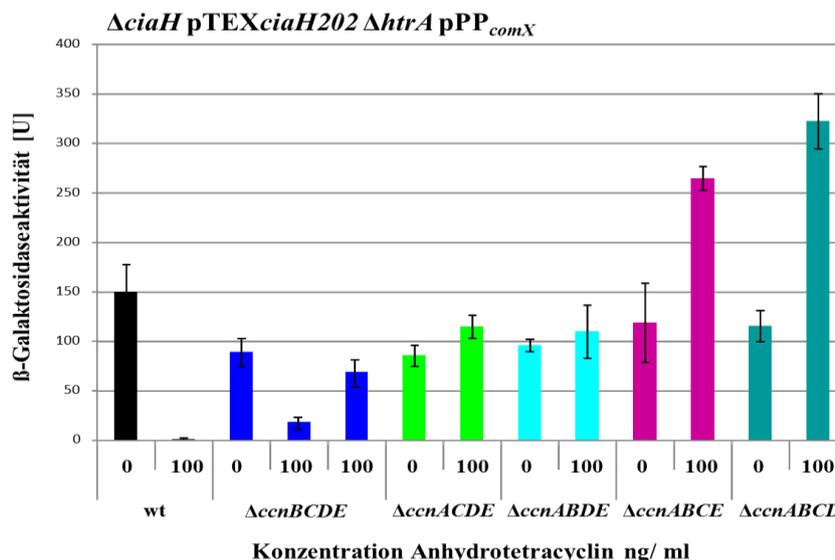


Abbildung 4.19: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaH$ $\Delta htrA$ pTEXciaH202 und seinen Derivaten.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium, welches gegebenenfalls zu Beginn mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt wurde, bis zu einer OD₆₀₀ = 0,4. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaH$ $\Delta htrA$ pTEXciaH202 pPP2comX, *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnCDEAB$ $\Delta ciaH$ $\Delta htrA$ pTEXciaH202 pPP2comX (RKL737), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnCDEAB$ $\Delta ciaH$ $\Delta htrA$ pTEXciaH202 pPP2comX (RKL738), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnAB$ $\Delta ciaH$ $\Delta htrA$ pTEXciaH202 pPP2comX (RKL739), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnAB$ $\Delta ciaH$ $\Delta htrA$ pTEXciaH202 pPP2comX (RKL740) und *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnAB$ $\Delta ciaH$ $\Delta htrA$ pTEXciaH202 pPP2comX (RKL741) ohne und nach Induktion mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin.

Tabelle 4.2: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaH$ $\Delta htrA$ pTEXciaH202 und seinen Derivaten.

RKL- Nummer	Genetik	Induktion (Anhydrotetracyclin ng/ml)	β -Galaktosidaseaktivität [U] ± Standardabweichung
	wt	0	149 ± 28
		100	1 ± 1
737	$\Delta ccnBCDE$	0	88 ± 13
		100	18 ± 3
		100	68 ± 8
738	$\Delta ccnACDE$	0	85 ± 10
		100	114 ± 11
739	$\Delta ccnABDE$	0	95 ± 6
		100	109 ± 26
740	$\Delta ccnABCE$	0	118 ± 39
		100	264 ± 12
741	$\Delta ccnABCD$	0	115 ± 15
		100	322 ± 27

Um diesen additiven Effekt etwas detaillierter zu untersuchen, wurden Stämme konstruiert, welche eine Kombination aus verschiedenen csRNAs enthalten sowie das pTEX Δ ciaH202 zur Aktivierung des CiaRH Systems. Anhand der Ergebnisse aus Abbildung 4.20 und Tabelle 4.3 lässt sich nochmals der positive Effekt der csRNA4 und csRNA5 beobachten. Der Stamm, welcher csRNA4 und csRNA5 (Δ ccnABC) in einer Kombination enthält, zeigt auch nach der Induktion eine comX Expression, also natürliche Kompetenz (Abbildung 4.20 A; Tabelle 4.3). Zuvor konnte gezeigt werden, dass jede dieser beiden csRNAs alleine in der Lage ist die Kompetenz zu unterdrücken (Abbildung 4.18). Zusammen scheint allerdings der positive Effekt beider csRNAs den negativen zu übergehen und es kommt zu einer Aktivität von 174 Units. Die beiden anderen getesteten Kombinationen, in denen jeweils csRNA4 und csRNA5 deletiert sind, zeigen nach Induktion keine Entwicklung der natürlichen Kompetenz. Auffällig ist ebenfalls, dass die Aktivität der Stämme ohne csRNA4 (Δ ccnCDEAB) und csRNA5 (Δ ccnD) ohne Induktion um etwa 50 Units niedriger sind, als die des Stammes mit csRNA4 und csRNA5 (Δ ccnAB).

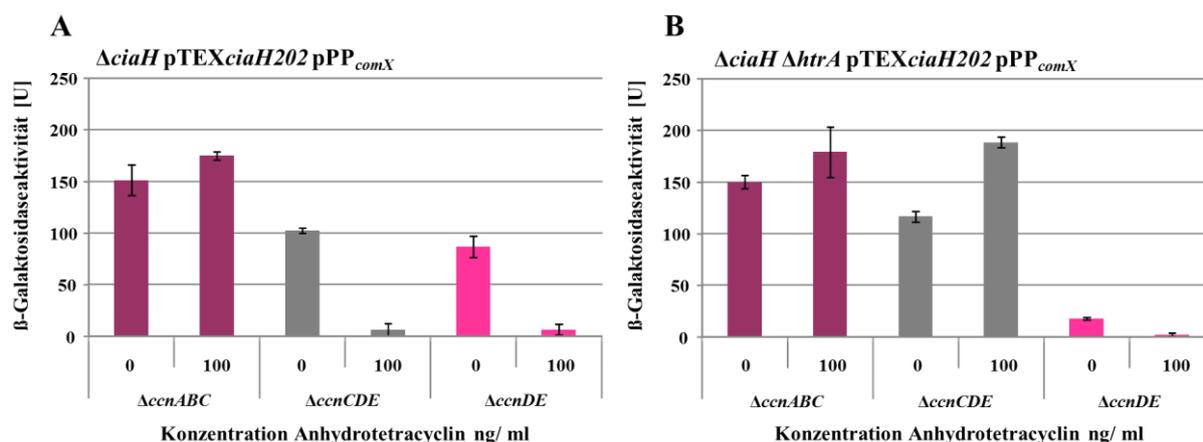


Abbildung 4.20: Durch den Promotor P Δ comX vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 Δ ciaH pTEX Δ ciaH202 (A) und *S. pneumoniae* R6 Δ ciaH Δ htrA pTEX Δ ciaH202 (B) mit den jeweiligen Derivaten.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in C+Y-Medium, welches gegebenenfalls zu Beginn mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt wurde, bis zu einer OD $_{600}$ = 0,4. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 Δ ccnAB Δ ciaH pTEX Δ ciaH202 pPP2comX (RKL734), *S. pneumoniae* R6 Δ ccnCDEAB Δ ciaH pTEX Δ ciaH202 pPP2comX (RKL735), *S. pneumoniae* R6 Δ ccnAB Δ ciaH pTEX Δ ciaH202 pPP2comX (RKL736) in Abbildung A und *S. pneumoniae* R6 Δ ccnAB Δ ciaH Δ htrA pTEX Δ ciaH202 pPP2comX (RKL742), *S. pneumoniae* R6 Δ ccnCDEAB Δ ciaH Δ htrA pTEX Δ ciaH202 pPP2comX (RKL743), *S. pneumoniae* R6 Δ ccnAB Δ ciaH Δ htrA pTEX Δ ciaH202 pPP2comX (RKL744) in Abbildung B ohne und nach Induktion mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin.

Die Deletion von *htrA* (Abbildung 4.20 B; Tabelle 4.3) hat auf den Stamm mit csRNA4 und csRNA5 keinen großen Effekt. Durch eine Deletion von *htrA* wird hier keine Verbesserung der Aktivität erreicht. Allerdings wird der Kompetenz inhibierende Effekt von csRNA1 und csRNA2 in dem Stamm Δ ccnCDE durch die *htrA* Deletion aufgehoben. Hier wird eine Aktivität von 188 Units erreicht. Einen starken Effekt hat die Deletion von *htrA* in dem Stamm Δ ccnDE, welcher csRNA1, 2 und 3 enthält. In

dieser Kombination ist es den csRNAs möglich, die Kompetenzentwicklung auch ohne die negative Wirkung von HtrA zu unterdrücken. Dieser Stamm zeigt eine Aktivität von 2 Units. Auffällig ist allerdings, dass dieser Stamm auch ohne Induktion des *ciaH202*-Allels eine sehr geringe Aktivität von 17 Units vorweist. Hier wäre es möglich, dass die Deletion von *htrA* zu einer Aktivierung des CiaRH Systems führt. Da gleichzeitig die positiv auf die Kompetenz wirkenden csRNAs 4 und 5 in diesem Stamm fehlen, könnte die Aktivierung des CiaRH Systems stark genug sein um die Kompetenz zu unterdrücken.

Tabelle 4.3: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* pTEX*ciaH*²⁰ und *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH* Δ *htrA* pTEX*ciaH202* und ihren Derivaten.

RKL- Nummer	Genetik	Induktion (Anhydrotetracyclin ng/ml)	β-Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung
734	Δ <i>ccnABC</i>	0	150 \pm 14
		100	174 \pm 3
735	Δ <i>ccnCDE</i>	0	102 \pm 2
		100	6 \pm 5
736	Δ <i>ccnDE</i>	0	86 \pm 10
		100	6 \pm 5
742	Δ <i>ccnABC</i> Δ <i>htrA</i>	0	149 \pm 6
		100	178 \pm 24
743	Δ <i>ccnCDE</i> Δ <i>htrA</i>	0	116 \pm 5
		100	188 \pm 5
744	Δ <i>ccnDE</i> Δ <i>htrA</i>	0	17 \pm 1
		100	2 \pm 1

Zusammenfassend ist für die hier, im induzierbaren *ciaH202* Hintergrund, getesteten Phänotypen fest zu halten, dass die csRNAs klar additiv wirken. Wobei im Falle der Kompetenz eine negative Wirkung von csRNA1, 2 und 3 nachgewiesen wurde, allerdings die csRNAs4 und 5 sowohl negativ als auch positiv wirken. Den stärksten inhibitorischen Effekt auf die Kompetenz zeigt csRNA1, da hier zum Teil bei einer Induktion mit 100 ng/ml auch ohne HtrA ein negativer Effekt sichtbar ist. Ob diese Effekte auch im Wildtyp unter kompetenzinhibierenden Bedingungen zu beobachten sind, sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden.

4.4 Der Einfluss der csRNAs und HtrA auf die Entwicklung der natürlichen Kompetenz in *S. pneumoniae* R6

4.4.1 Untersuchung der P_{comX} Expression in brain heart infusion (BHI) und todd hewitt broth (THB)

In den Komplexmedien BHI und THB entwickelt *S. pneumoniae* R6 keine natürliche Kompetenz. Der *ciaR*-Deletionsstamm hingegen entwickelt natürliche Kompetenz unter diesen und weiteren kompetenzinhibierenden Bedingungen (Tsui *et al.*, 2010; Mascher *et al.*, 2003; Müller, 2011). Eine Deletion der Gene *ccnA-E* oder *htrA* zeigte keinen Effekt auf die Kompetenzentwicklung in BHI (Müller, 2011). Allerdings führte eine Doppeldeletion der Gene *ccnA-E* und *htrA* zu einer reproduzierbaren Kompetenzentwicklung. In THB wurde dagegen gezeigt, dass die Deletion von *htrA* ausreicht, um den Kompetenz unterdrückenden Effekt aufzuheben. Die Deletion von *htrA* führte zu einer ähnlichen Transformierbarkeit als die Inaktivierung des gesamten CiaR-Regulons durch die Deletion von *ciaR* (Müller, 2011). Innerhalb dieser Studien wurden die Ergebnisse mittels Transformationstests gewonnen. Hierbei kam es durch einen Wechsel der THB Charge zu Problemen. Somit musste auf die Untersuchung des Effekts der csRNAs auf den Kompetenzphänotyp in diesem Medium verzichtet werden (Müller, 2011).

Mithilfe des Promotors P_{comX} sollte daher im Folgenden nochmals die Kompetenzentwicklung des Wildtyps, des csRNA Deletionsstammes und des Stammes mit einer Doppeldeletion der csRNAs und *htrA* in den Komplexmedien BHI und THB untersucht werden.

Hierfür wurden die Ausgangsstämme der Anhydrotetracyclininduktion verwendet, in welchen das *ciaH*-wt Allel noch auf dem Genom vorliegt, die einzelnen csRNAs allerdings mittels Cheshire-Kassette deletiert wurden (siehe 3.2.25). Diese Stämme enthalten ebenfalls das Promotorprobe Plasmid pPP_{comX} . Über die Expression des frühen Kompetenzgens *comX* kann somit die Kompetenzentwicklung verfolgt werden.

Die Stämme wurden in BHI und THB bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ inkubiert und anschließend die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt (siehe 3.2.17.1). Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 4.21 und Tabelle 4.4 dargestellt.

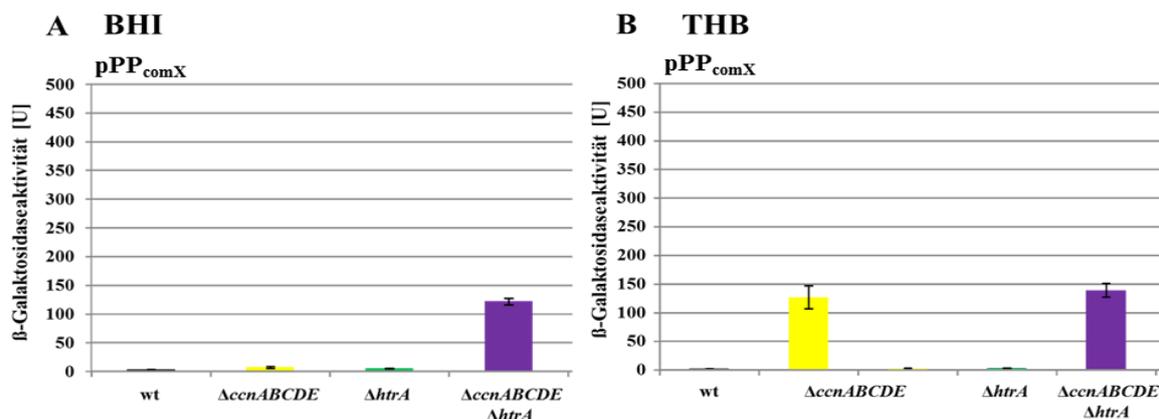


Abbildung 4.21: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 (A) und seinen Derivaten in BHI und THB.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI (A) und THB (B) Medium bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 pPP2 $comX$ (RKL508), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ pPP2 $comX$ (RKL509), *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ pPP2 $comX$ (RKL677), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE \Delta htrA$ pPP2 $comX$ (RKL679).

Mithilfe des Promotors P_{comX} konnten die Ergebnisse in BHI aus früheren Arbeiten bestätigt werden. Der Wildtyp R6 zeigt, wie auch der csRNA Deletionsstamm ($\Delta ccnA-E$) und der $htrA$ -Deletionsstamm ($\Delta htrA$), unter diesen Bedingungen keine natürliche Kompetenzentwicklung (Abbildung 4.21 A; Tabelle 4.5). Die Aktivität liegt in diesen Stämmen zwischen 2 und 6 Units. Ausschließlich die Doppeldeletion aus csRNAs und $htrA$ hebt den inhibitorischen Effekt auf die natürliche Kompetenz auf. Dieser Stamm zeigt eine Aktivität von 121 Units.

Tabelle 4.4: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 und seinen Derivaten in BHI.

<i>RKL-Nummer</i>	<i>Genetik</i>	β -Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung
508	wt	$2,8 \pm 0,5$
509	$\Delta ccnA-E$	$4,5 \pm 0,2$
677	$\Delta htrA$	$6,7 \pm 1,5$
679	$\Delta ccnA-E \Delta htrA$	$121 \pm 5,6$

In THB zeigte sich eine etwas andere Situation. Zwar zeigen der Wildtyp und der $htrA$ Deletionsstamm unter diesen Bedingungen keine natürliche Kompetenzentwicklung, allerdings wurden für den csRNA Deletionsstamm unterschiedliche Ergebnisse ermittelt (Abbildung 4.21 B; Tabelle 4.5). Innerhalb dieser Versuche zeigten vier Messungen dieses Stamms in THB, wie auch schon in BHI beobachtet, keine natürliche Kompetenz. Drei weitere Messungen dagegen zeigt eine deutliche Entwicklung der Transformierbarkeit. Hier konnte eine Aktivität von 126 Units ermittelt

werden. Dies entspricht in etwa der Aktivität des Doppeldeletionsstammes ($\Delta ccnA-E \Delta htrA$) mit 138 Units. Somit führt die Deletion der csRNAs in manchen Fällen zur Transformierbarkeit, in anderen wiederum nicht.

Tabelle 4.5: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 und seinen Derivaten in THB.

<i>RKL-Nummer</i>	<i>Genetik</i>	β -Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung
508	wt	$1,8 \pm 0,3$
509	$\Delta ccnA-E$	126 ± 19 (3X)
509	$\Delta ccnA-E$	$2,3 \pm 0,7$ (4X)
677	$\Delta htrA$	$2,6 \pm 0,2$
679	$\Delta ccnA-E \Delta htrA$	138 ± 11

Die Ergebnisse der BHI Messungen korrelieren mit denen in dieser Arbeit, durch das induzierbare pTEX $_{ciaH202}$ Konstrukt ermittelten Ergebnissen. Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Transformierbarkeit des Stammes durch eine Doppeldeletion der Gene *ccnA-E* und *htrA* wieder hergestellt wurde (siehe 4.3.3). Da in weiteren Versuchen der Effekt einzelner csRNAs auf die Transformierbarkeit des Wildtyps R6 untersucht werden sollte, wurde aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse in THB, lediglich BHI für die weiteren Versuche verwendet.

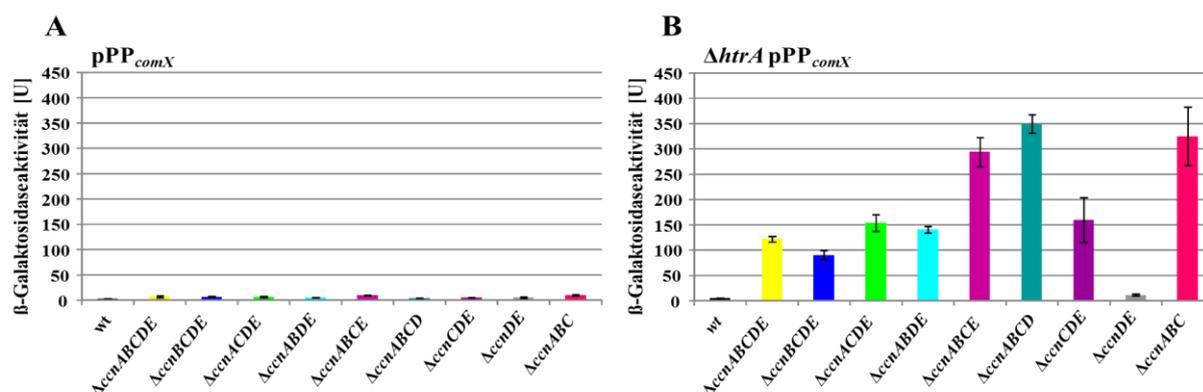


Abbildung 4.22: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 (A) und *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ (B) und ihren Derivaten.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 pPP2 $_{comX}$ (RKL508/677), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ pPP2 $_{comX}$ (RKL509/679), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnBCDE$ pPP2 $_{comX}$ (RKL696/704), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnACDE$ pPP2 $_{comX}$ (RKL697/705), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABDE$ pPP2 $_{comX}$ (RKL698/706), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCE$ pPP2 $_{comX}$ (RKL699/707), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCD$ pPP2 $_{comX}$ (RKL700/708), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnCDE$ pPP2 $_{comX}$ (RKL702/710), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnDE$ pPP2 $_{comX}$ (RKL703/711), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABC$ pPP2 $_{comX}$ (RKL701/709).

Wie in Abbildung 4.22 A zu erkennen ist, zeigt keiner der getesteten Stämme ohne eine *htrA* Deletion natürliche Kompetenzentwicklung in BHI. Die Aktivität von P_{comX} liegt bei allen Stämmen zwischen 2 und 9 Units (Tabelle 4.6). Von einer Transformierbarkeit ist daher nicht auszugehen. Auch der zuvor beobachtete positive Effekt von csRNA4 ($\Delta ccnABCE$) und csRNA5 ($\Delta ccnABCD$) ist, selbst bei dem gemeinsamen Vorkommen im Stamm *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABC$ ohne eine Deletion von *htrA*, nicht ausreichend um die Transformierbarkeit unter diesen Bedingungen zu gewährleisten. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung, dass nur eine gemeinsame Deletion der *ccnA-E* Gene und *htrA* in BHI zur Transformierbarkeit führt (Müller, 2011). Dass die Deletion von *htrA* nur in Kombination mit der Deletion aller oder einzelner csRNAs zu einer Kompetenzentwicklung führt, ist in Abbildung 4.22 B und Tabelle 4.6 zu erkennen. Die Aktivität des Stammes *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ steigt durch die Deletion aller csRNAs von 4 auf 121 Units an. Die Stämme, in welchen csRNA1, 2 und 3 enthalten sind, zeigen in etwa die gleiche Aktivität wie der csRNA Deletionsstamm. Jedoch ist auch hier die geringste Aktivität von 89 Units bei dem Stamm mit csRNA1 ($\Delta ccnBCDE$) zu verzeichnen. Der schon zuvor bei dem Anhydrotetracyclin induzierbaren *ciaH202*-Allel beobachtete positive Effekt der csRNA4 ($\Delta ccnABCE$) und csRNA 5 ($\Delta ccnABCD$) ist auch unter diesen Bedingungen sichtbar. Die Aktivität steigt hier auf 293 bzw. 348 Units an. Allerdings steigt diese Aktivität nicht weiter an, wenn diese beiden csRNAs in Kombination in einem Stamm ($\Delta ccnABC$) enthalten sind. Hier liegt die Aktivität des P_{comX} bei 324 Units. Fehlen nur diese beiden csRNAs ($\Delta ccnDE$), ist keine Kompetenzentwicklung zu beobachten. Deletiert man zusätzlich noch csRNA3 ($\Delta ccnCDE$) ist wieder eine Aktivität, die in etwa der des csRNAs Deletionsstamm entspricht, zu verzeichnen.

Tabelle 4.6: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *htrA* und ihren Derivaten.

<i>RKL-Nummer</i>	<i>Genetik</i>	β -Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung
508	wt	$2 \pm 0,5$
509	$\Delta ccnA-E$	6 ± 1
696	$\Delta ccnBCDE$	$6 \pm 0,89$
697	$\Delta ccnACDE$	6 ± 1
698	$\Delta ccnABDE$	$5 \pm 0,59$
699	$\Delta ccnABCE$	$9 \pm 0,82$
700	$\Delta ccnABCD$	$3 \pm 0,02$
702	$\Delta ccnCDE$	$4 \pm 0,33$
703	$\Delta ccnDE$	4 ± 1
701	$\Delta ccnABC$	9 ± 1

677	R6 $\Delta htrA$	$4 \pm 0,2$
679	$\Delta ccnA-E \Delta htrA$	121 ± 5
704	$\Delta ccnBCDE \Delta htrA$	89 ± 9
705	$\Delta ccnACDE \Delta htrA$	153 ± 16
706	$\Delta ccnABDE \Delta htrA$	139 ± 6
707	$\Delta ccnABCE \Delta htrA$	293 ± 28
708	$\Delta ccnABCD \Delta htrA$	348 ± 18
710	$\Delta ccnCDE \Delta htrA$	158 ± 44
711	$\Delta ccnDE \Delta htrA$	10 ± 2
709	$\Delta ccnABC \Delta htrA$	324 ± 57

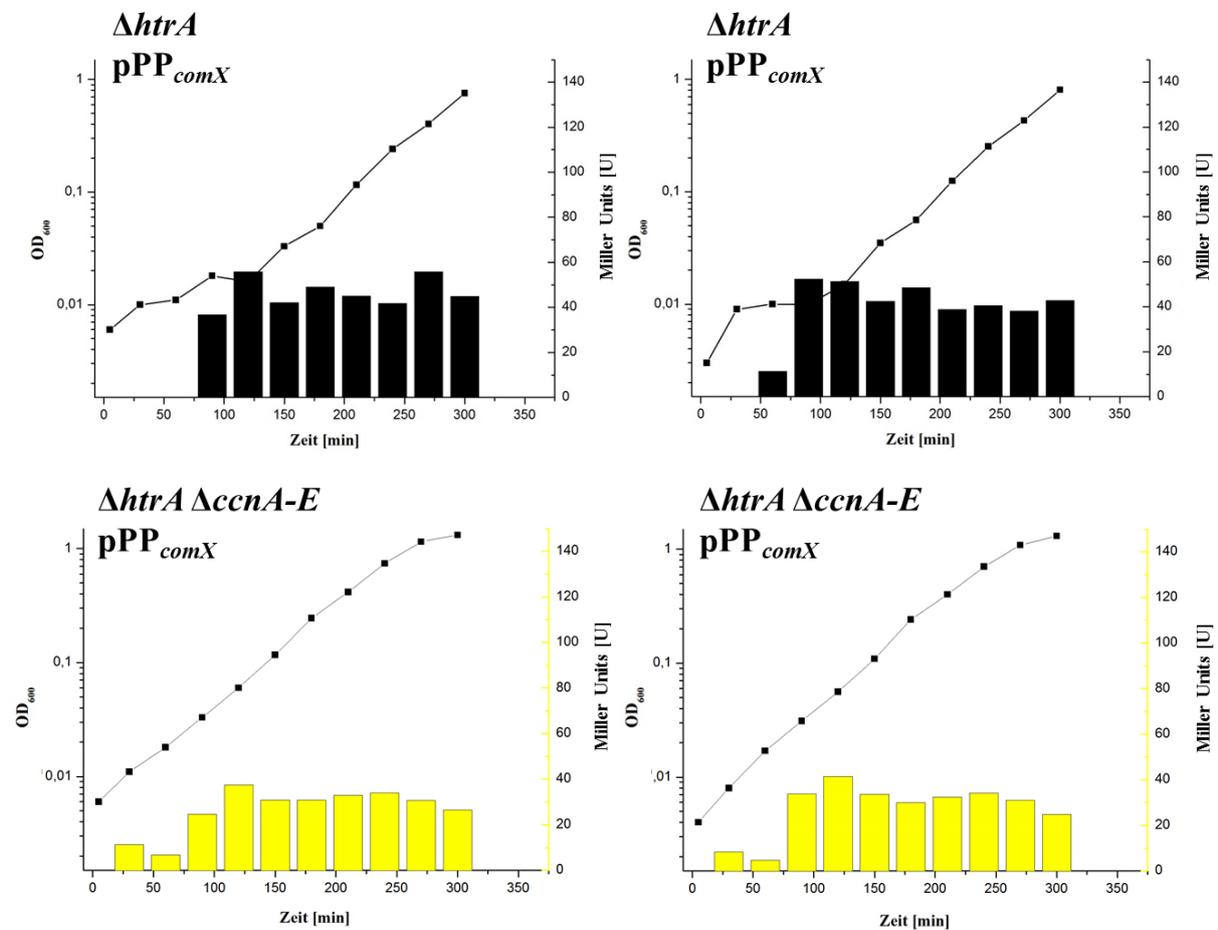
Es wäre denkbar, dass die csRNAs für die Feinregulation der natürlichen Kompetenz verantwortlich sind. CsRNA4 und 5 könnten hierbei dafür verantwortlich sein, die Kompetenzentwicklung zu verstärken, falls ein gewisser Schwellenwert überschritten wird und somit einen reibungslosen Ablauf garantieren.

Um einen genaueren Blick auf den Verlauf der Kompetenzentwicklung in den verschiedenen Stämmen zu haben, wurden β -Galaktosidaseassays über das Wachstum hinweg angefertigt. Hierbei wurde das Protokoll so verändert, dass auch eine Messung bei niedriger OD möglich ist (siehe 3.2.17.4). Die innerhalb dieser Messungen erhaltenen absoluten Miller Units sind allerdings nicht mit den vorher bestimmten β -Galaktosidaseaktivitäten vergleichbar. Um die Kompetenzentwicklung verfolgen zu können, wurde mit nicht-kompetenten Zellen aus C+Y-Medium pH 6,8 angeimpft, 5 min nach Animpfen und anschließend alle 30 min eine Probe entnommen. Die letzte Probe wurde nach 300-330 min entnommen. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Stämme am Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Messungen in der stationären Phase wurden nicht durchgeführt, da das Abschalten der natürlichen Kompetenz in diesem Fall, durch die Stabilität der β -Galaktosidase im Reaktionsansatz, nicht zu beobachten ist. Der Kompetenzverlauf des Stammes *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ pPP_{comX} wurde in C+Y-Medium verfolgt, da dieser in BHI keine natürliche Kompetenz entwickelt. Die Aktivität der übrigen Stämme wurde in BHI bestimmt. Zum besseren Vergleich wurde allerdings der csRNA Deletionsstamm zusätzlich in C+Y-Medium gemessen. Vergleicht man den Kompetenzverlauf des Stammes *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ pPP_{comX} mit dem dazugehörigen csRNA Deletionsstamm, fällt auf, dass im Deletionsstamm schon zu einem früheren Zeitpunkt Aktivität zu verzeichnen ist (Abbildung. 4.23 A). Dieser zeigt teilweise, im Gegensatz zum R6 $\Delta htrA$, welcher erst nach etwa 90 min Kompetenz entwickelt, schon nach 30 min Aktivität. Für den csRNA Deletionsstamm ist in beiden getesteten Medien eine geringere maximale Aktivität zu beobachten. Der Stamm *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ erreicht sein Maximum von 55 Units zwischen 90-120 Minuten,

wohingegen bei den csRNA Deletionsstamm Messungen ein Maximum von 41 Units (C+Y-Medium) bzw. 46 Units (BHI) (Abbildung 4.23 B) zu beobachten ist. Bei den Messungen des csRNA Deletionsstamm in den beiden Medien ist allerdings ein Unterschied im Verlauf der Kurven zu erkennen. In C+Y-Medium erreicht dieser Stamm bei 120 Minuten sein Maximum von 41 Units, wohingegen in BHI die Aktivität dieses Stammes langsam ansteigt und das Maximum erst zu Ende des Experiments zwischen 300 und 330 Minuten (46 Units) erreicht wird. Generell ist kein wesentlicher Unterschied im Kompetenzverlauf des csRNA Deletionsstammes in beiden Medien zu erkennen, was einen Vergleich der Messungen in C+Y-Medium und BHI ermöglicht.

In früheren Studien konnte kein Kompetenzunterschied zwischen dem Wildtyp R6 und der *ciaR*-Deletionsmutante festgestellt werden (Giammarinaro *et al.*, 1999). Die hier erhaltenen Ergebnisse sprechen daher ebenfalls für eine Beteiligung der csRNAs an der Feinabstimmung der Kompetenzentwicklung.

A C+Y-Medium



B BHI

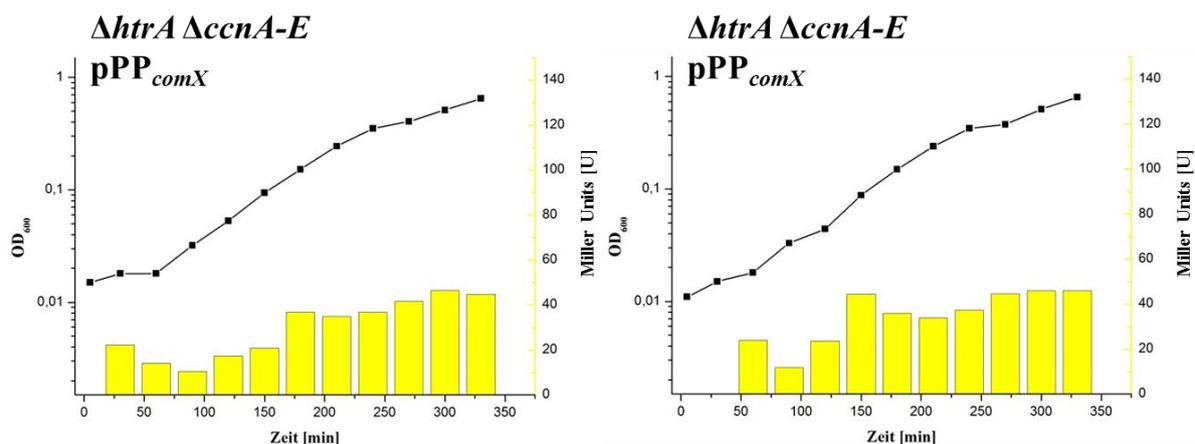
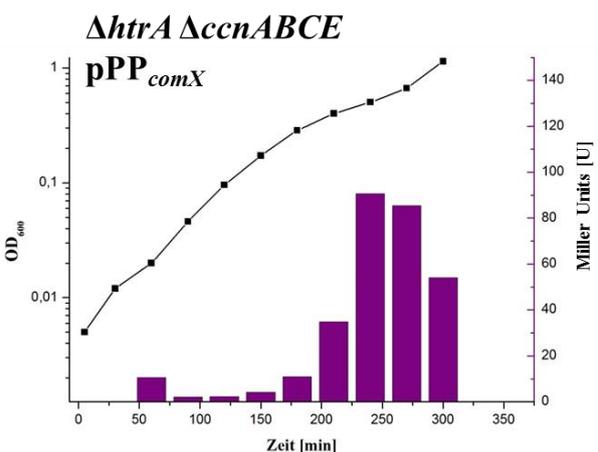
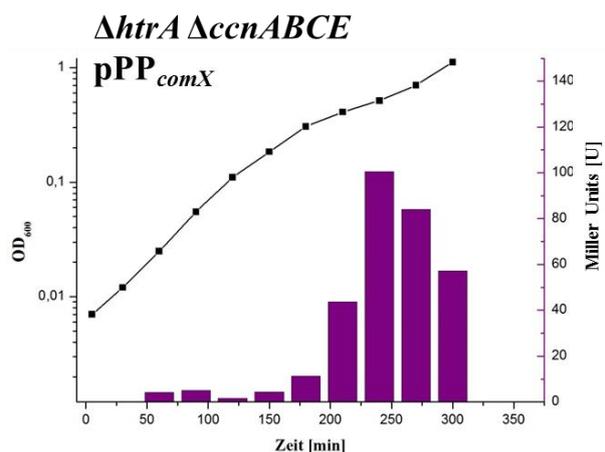
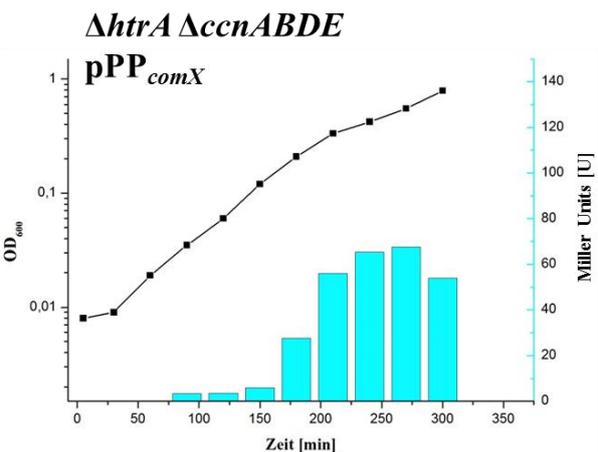
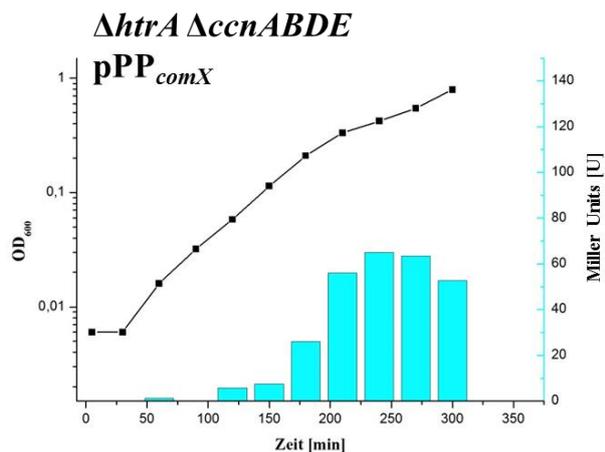
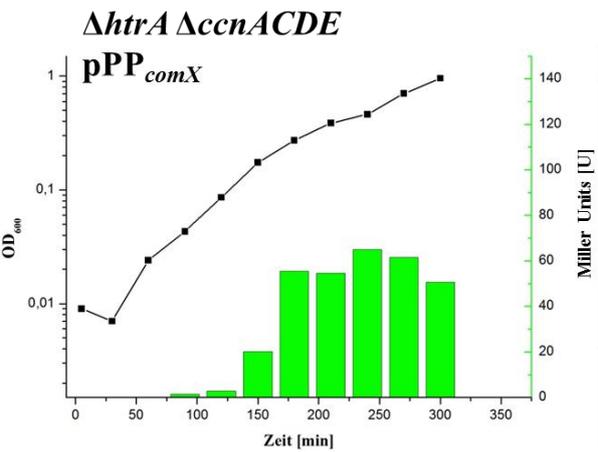
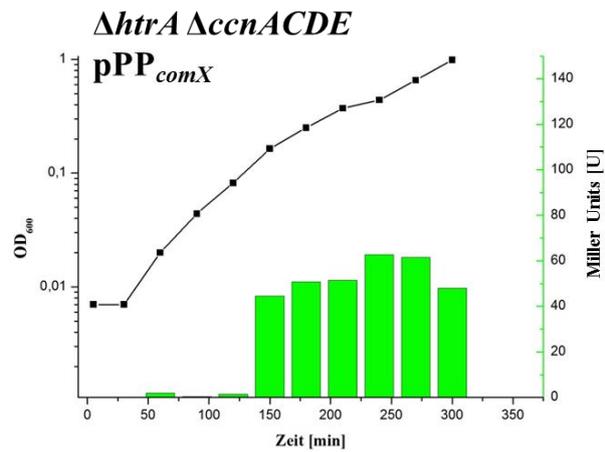
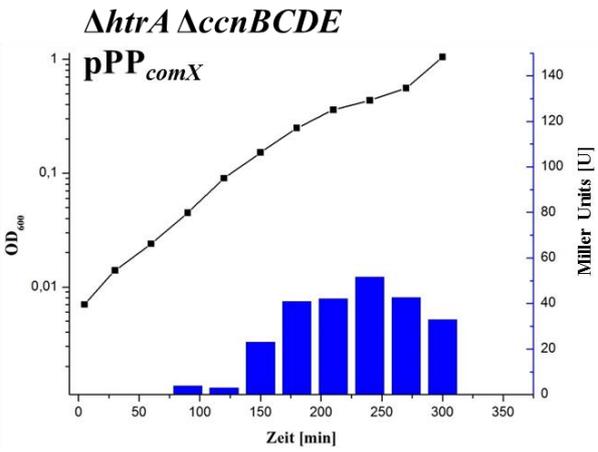
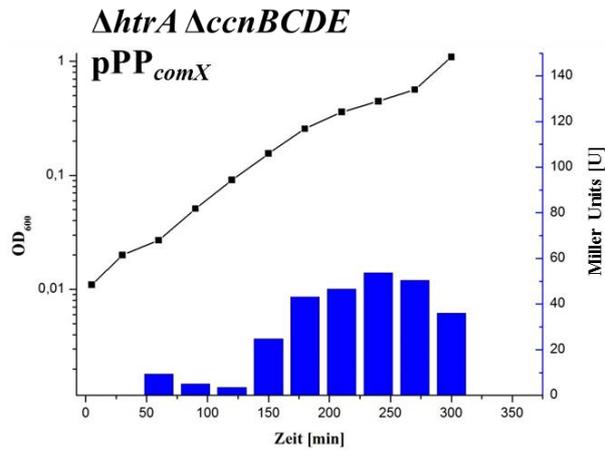


Abbildung 4.23: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ und *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA \Delta ccnA-E$ in C+Y-Medium (A) und *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA \Delta ccnA-E$ in BHI (B).

Das Wachstum des Stammes *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ (RKL677) und *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA \Delta ccnA-E$ (RKL679) erfolgte in C+Y-Medium (A). Das Wachstum des Stammes *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA \Delta ccnA-E$ (RKL679) erfolgte zusätzlich noch in BHI (B). Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Zum Starten des Experiments wurde Medium 1%ig mit einer Glycerinkultur aus C+Y-Medium pH 6,8 beimpft. Proben wurden 5 min nach dem Animpfen, dann im Abstand von 30 min bis zu 330 min geerntet und die β -Galaktosidaseaktivität (Balken) bestimmt. Das Wachstum (schwarze Kurve) wurde mittels der optischen Dichte bei 600 nm photometrisch verfolgt. Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildungen je zwei als repräsentative Beispiele zeigen.

Des Weiteren wurde der Effekt einzelner csRNAs auf den Kompetenzverlauf, wie oben beschrieben, verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.24 dargestellt. Das Vorhandensein jeder einzelnen csRNA wirkt sich auf den Beginn der kompetenten Phase negativ aus. Im Vergleich zum csRNA Deletionsstamm (Abbildung 4.23), welcher schon nach 30 min transformierbar ist, ist in diesen Stämmen eine deutliche Kompetenzentwicklung erst nach 150 min ($\Delta ccnBCDE$ und $\Delta ccnACDE$), 180 min ($\Delta ccnABDE$), 210 min ($\Delta ccnABCE$) bzw. 120 min ($\Delta ccnABCD$) erkennbar. Somit entwickeln diese Stämme, in welchen nur eine der csRNAs enthalten ist, wie der Wildtyp R6, welcher alle csRNAs enthält, erst zu einem späteren Zeitpunkt Transformierbarkeit. Ihr Maximum erreichen alle Stämme mit einzelnen csRNAs nach 240 min. Die maximale Aktivität der Stämme unterscheidet sich hierbei allerdings deutlich. Der Stamm, welcher csRNA1 ($\Delta ccnBCDE$) enthält, erreicht ein Maximum von 53 Units, das in etwa dem Maximum des Wildtyps R6 mit 55 Units entspricht. Die Stämme mit csRNA2 ($\Delta ccnACDE$) und csRNA3 ($\Delta ccnABDE$) erreichen beide eine etwas höhere Aktivität von 65 Units. Der schon zuvor beobachtete positive Effekt von csRNA4 ($\Delta ccnABCE$) und csRNA5 ($\Delta ccnABCD$) ist hier ebenfalls zu beobachten. Diese Stämme erreichen eine Aktivität von 100 (csRNA4) bzw. 141 Units (csRNA5). Allerdings unterscheidet sich der Kompetenzverlauf dieser beiden Stämme sehr, da, wie schon oben erwähnt, der Stamm mit csRNA4 erst sehr spät nach 210 min Kompetenz entwickelt und der Stamm mit csRNA5 dagegen sehr früh nach 120 min. Der negative Effekt auf die Kompetenzentwicklung von csRNA4 ist somit stärker.



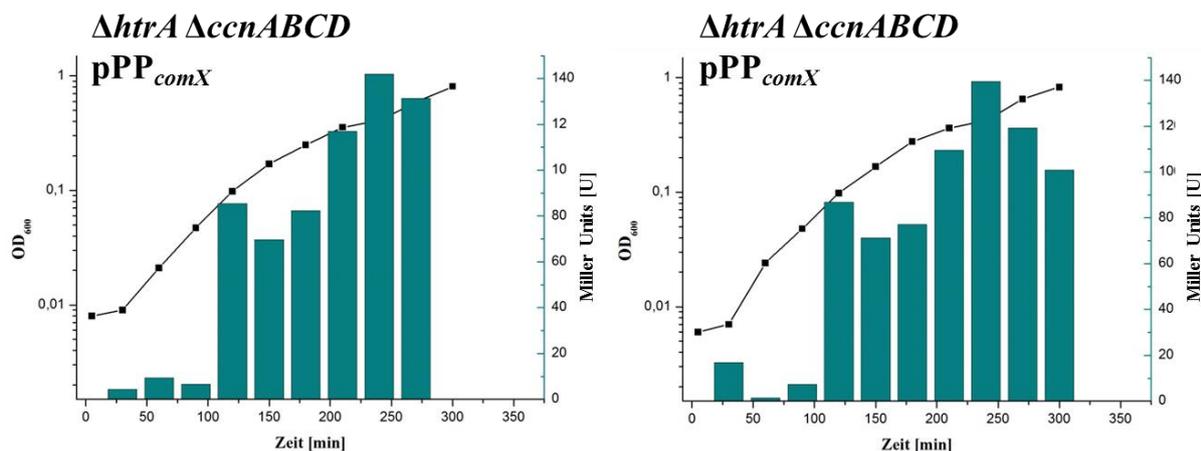


Abbildung 4.24: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität der *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ Derivate.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Zum Starten des Experiments wurde Medium 1 %ig mit einer Glycerinkultur aus C+Y-Medium pH 6,8 beimpft. Proben wurden 5 min nach dem Animpfen, dann im Abstand von 30 min bis zu 300 min geerntet und die β -Galaktosidaseaktivität (Balken) bestimmt. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnBCDE \Delta htrA$ pPP2_{comX} (RKL704), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnACDE \Delta htrA$ pPP2_{comX} (RKL705), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABDE \Delta htrA$ pPP2_{comX} (RKL706), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCE \Delta htrA$ pPP2_{comX} (RKL707), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCD \Delta htrA$ pPP2_{comX} (RKL708). Das Wachstum (schwarze Kurve) wurde mittels der optischen Dichte bei 600 nm photometrisch verfolgt. Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildungen je zwei als repräsentative Beispiele zeigen.

Dass die einzelnen csRNAs einen unterschiedlichen Effekt auf die Kompetenzentwicklung haben, konnte anhand dieser Versuche verdeutlicht werden. Ob der beobachtete positive Effekt der csRNA4 und csRNA5 *comX* spezifisch ist, oder ob dieser Effekt sich ebenfalls in der Expression weiterer früher und später Kompetenzgene niederschlägt, wird im folgenden Abschnitt genauer untersucht.

4.4.2 Untersuchung der P_{comC} und P_{cib} Expression in brain heart infusion (BHI)

Die durch den im vorherigen Abschnitt getesteten Promotor P_{comX} kontrollierten Gene, *comX1* und *comX2*, kodieren für einen alternativen Sigmafaktor, ComX, der die Expression der „späten Kompetenzgene“ reguliert (Peterson *et al.*, 2004), welche für die DNA-Aufnahme, Prozessierung und Integration essentiell sind (Peterson *et al.*, 2004; Claverys *et al.*, 2009). Durch ComX wird somit das CSP induzierte Quorum Sensing System mit der Kompetenzentwicklung verknüpft (Luo *et al.*, 2003). Die späten Kompetenzgene *cibABC*, welche in einem Operon liegen, kodieren für ein Zwei-Peptid Bacteriocin mit entsprechendem Immunitätsprotein (Håvarstein *et al.*, 2006). Die Untersuchung des Promotors P_{cib} sollte daher einen Hinweis darauf geben, ob sich durch den beobachteten positiven Effekt auf die *comX* Transkription Folgen für die Expression später Kompetenzgene ergeben. Hierzu wurde das Promotorprobe Plasmid pPP2_{cib} in die Stämme *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnBCDE$ und *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCD$ eingebracht. Diese beiden Stämme wurden ausgewählt, da die

gemessene P_{comX} Aktivität in diesen am niedrigsten bzw. am höchsten ist. Ein Unterschied sollte daher in diesen Stämmen gut sichtbar sein. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde wie unter 3.2.17.4 beschrieben, verfolgt. Um die Kompetenzentwicklung verfolgen zu können, wurde mit nicht-kompetenten Zellen angeimpft, 5 min nach Animpfen und anschließend alle 30 min eine Probe entnommen. Die letzte Probe wurde nach 300 min entnommen.

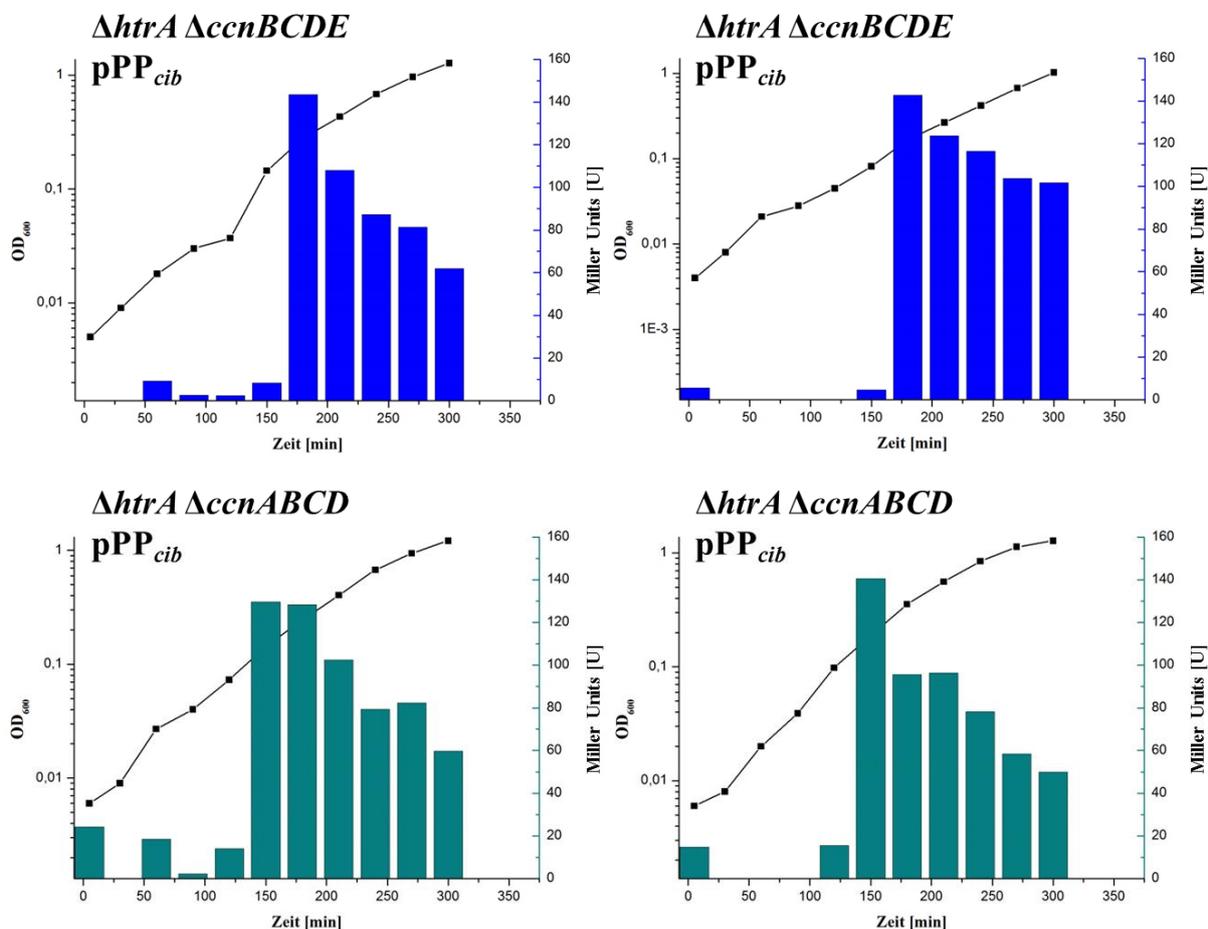


Abbildung 4.25: Durch den Promotor P_{cib} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA \Delta ccnBCDE$ (oben) und *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA \Delta ccnABCD$ (unten).

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Zum Starten des Experiments wurde Medium 1 %ig mit einer Glycerinkultur aus C+Y-Medium pH 6,8 beimpft. Proben wurden 5 min nach dem Animpfen, dann im Abstand von 30 min bis zu 300 min geerntet und die β -Galaktosidaseaktivität (Balken) bestimmt. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnBCDE \Delta htrA pPP2cib$ (RKL754), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCD \Delta htrA pPP2cib$ (RKL756). Das Wachstum (schwarze Kurve) wurde mittels der optischen Dichte bei 600 nm photometrisch verfolgt. Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildungen je zwei als repräsentative Beispiele zeigen.

In Abbildung 4.25 ist die β -Galaktosidaseaktivität des P_{cib} dieser beiden Stämme dargestellt. Auch für diesen Promotor P_{cib} ist zu beobachten, dass in *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCD$ die Aktivität 30 min früher als in *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnBCDE$ ansteigt. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls für den

Promotor P_{comX} beobachtet. Ein Effekt auf die absolute β -Galaktosidaseaktivität der zwei unterschiedlichen csRNAs ist allerdings für P_{cib} nicht feststellbar. In beiden Stämmen wird nach 180 bzw. 150 min eine Aktivität von etwa 140 Units erreicht. Der beobachtete positive Effekt von csRNA5 auf den *comX* Promotor scheint sich daher nicht auf die späten Kompetenzgene zu übertragen. Hier scheint es einen weiteren Regulationsmechanismus zu geben, der die Weiterleitung der Transkriptionsaktivierung unterbindet.

Wie gezeigt, hat die Aktivierung der Transkription von *comX* durch die csRNA5 keinen Effekt auf den Promotor der späten Kompetenzgene *cibABC*. Allerdings könnte dieser Effekt bei weiteren früheren Kompetenzgenen zu beobachten sein. Dies würde dann für einen Mechanismus sprechen, welcher ausschließlich die CSP Signaltransduktionskaskade beeinflusst.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Genprodukt des späten Kompetenzgens *dprA* mit dem phosphorylierten ComE interagiert und somit mit der CSP Signaltransduktionskaskade interferiert. Dadurch wird die Transkription der früheren Kompetenzgene und darunter speziell von *comX* blockiert (Mirouze *et al.*, 2013). Allerdings wirkt sich dieser Effekt auf die späten Kompetenzgene aus und ist darüber hinaus an der Abschaltung der Kompetenz beteiligt.

Im Folgenden wird daher die Aktivität des frühen Kompetenzpromotors P_{comC} in den beiden Stämmen, welche csRNA1 ($\Delta ccnBCDE$) und csRNA5 ($\Delta ccnBCDE$) enthalten, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.26 zusammengefasst.

Der Promotor P_{comC} zeigt, wie für ein frühes Kompetenzgen erwartet, in beiden untersuchten Stämmen ab 5 min eine geringe Basalaktivität. Ab den Zeitpunkten 180 min ($\Delta ccnBCDE$) bzw. 150 min ($\Delta ccnABCD$), auch hier ist eine frühere Induktion in dem Stamm mit csRNA5 zu beobachten, steigt die Aktivität beider Stämme an. Allerdings erreicht der Stamm mit csRNA5 nach 210 min ein Maximum von 352 Units, wohingegen der Stamm mit csRNA1 nach 240 min nur ein Maximum von 144 Units erreicht. Hier ist der positive Effekt der csRNA5 auf die Aktivität des Promotors P_{comC} deutlich zu beobachten. Es ist daher wahrscheinlich, dass csRNA4 und csRNA5 eine positive Wirkung auf die CSP Signaltransduktionskaskade haben und darüber die Feedbackregulation des Systems beeinflussen.

Über diesen Verstärkungsmechanismus wäre es möglich, nach erfolgter Kompetenz-induktion die CSP Synthese zu verstärken ohne die eigenen späten Kompetenzgene stärker zu aktivieren. Die CSP Konzentration im Medium würde somit zunehmen und weitere *S. pneumoniae* R6 Zellen in einen transformierbaren Zustand versetzen.

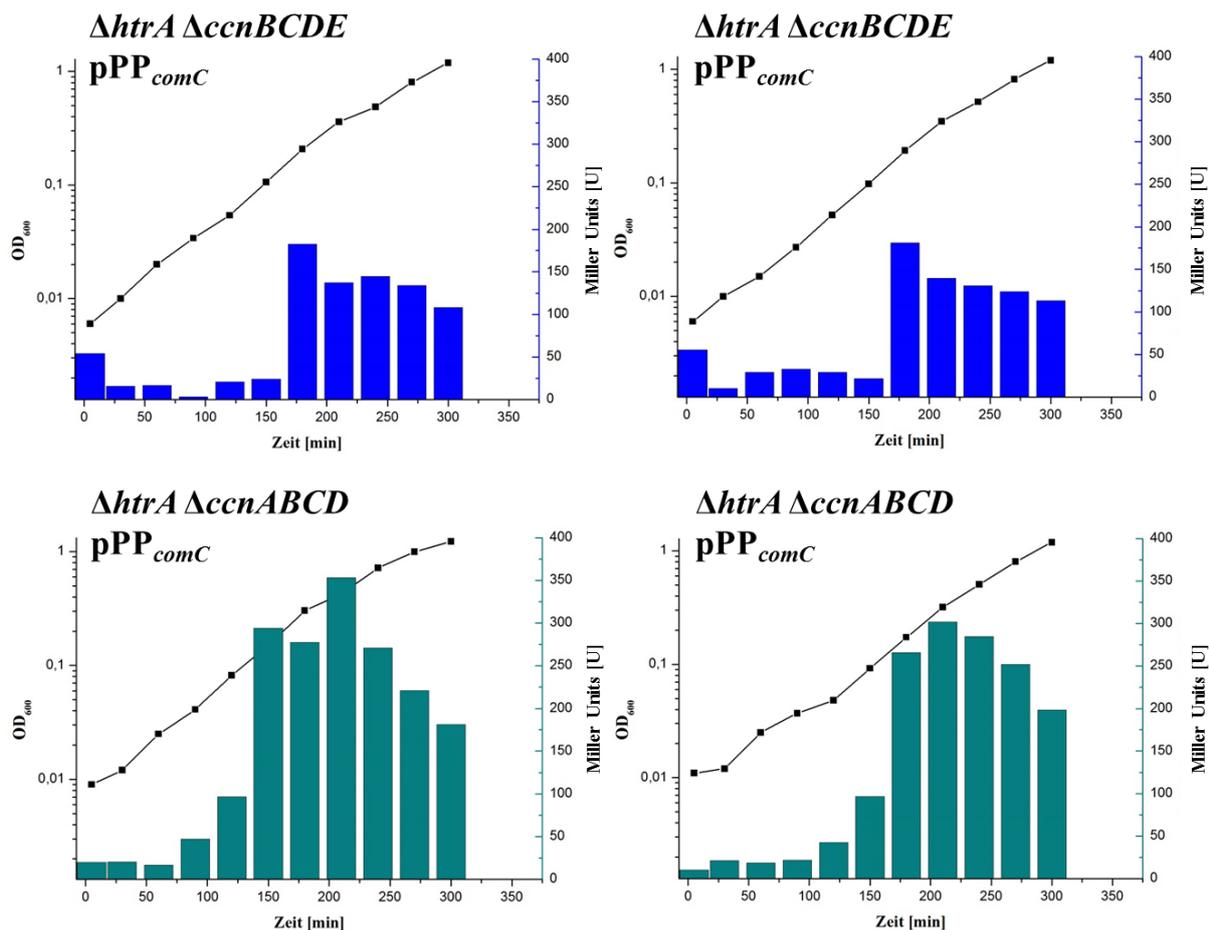


Abbildung 4.26: Durch den Promotor P_{comC} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA \Delta ccnBCDE$ (oben) und *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA \Delta ccnABCD$ (unten).

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Zum Starten des Experiments wurde Medium 1 %ig mit einer Glycerinkultur aus C+Y-Medium pH 6,8 beimpft. Proben wurden 5 min nach dem Animpfen, dann im Abstand von 30 min bis zu 300 min geerntet und die β -Galaktosidaseaktivität (Balken) bestimmt. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnBCDE \Delta htrA$ pPP2cib (RKL755), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCD \Delta htrA$ pPP2cib (RKL757). Das Wachstum (schwarze Kurve) wurde mittels der optischen Dichte bei 600 nm photometrisch verfolgt. Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildungen je zwei als repräsentative Beispiele zeigt.

Ein Gen dieses Quorum-Sensing-Systems, *comC*, zeigt nach bioinformatischen Hybridisierungsstudien der csRNAs die höchste Bindungsenergie innerhalb der frühen Kompetenzgene. Da in dieser Arbeit des Weiteren gezeigt werden konnte, dass die csRNAs unterschiedlich auf die Expression von *comC* wirken, sollte die mögliche Interaktion der csRNAs mit der *comC* mRNA genauer untersucht werden.

4.5 Die Regulation von *comC* – ein möglicher Grund für den CiaRH vermittelten Kompetenzblock

Für die mRNA des Gens *comC*, welches für den Vorläufer des Kompetenzpheromons CSP kodiert, konnte schon in früheren Studien eine Interaktion mit den csRNAs nachgewiesen werden (Kovács, 2009). Auch konnte ein negativer Effekt der csRNA1 auf die Kompetenz beobachtet werden. Allerdings konnte *comC*, obwohl es Hinweise darauf gibt, nicht eindeutig als Zielgen der csRNA1 verifiziert werden (Tsui *et al.*, 2010). In neueren Studien konnte mithilfe von bioinformatischen Zielgensuchen und anschließenden Untersuchungen von Translationsfusionen, Gene identifiziert werden, welche von den csRNAs reguliert werden (Schnorpfeil *et al.*, 2013). Hierbei handelt es sich um die Gene spr0081, spr0371, spr0551, spr1097 und spr0159. Innerhalb dieser bioinformatischen Zielensuche wurde auch *comC* als potenziell csRNA reguliertes Gen identifiziert. Aufgrund der in dieser Arbeit identifizierten unterschiedlichen Wirkungen einzelner csRNAs, wurde *comC* auf eine mögliche Regulation durch einzelne csRNAs hin untersucht.

4.5.1 Regulation der *comC* mRNA durch die csRNAs in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202*

In früheren Studien wurde die post-transkriptionelle Regulation der csRNAs auf unterschiedliche Gene mithilfe des integrativen Translationsprobe Plasmids pTP3 untersucht (Kovács, 2009). Der auf diesem Plasmid enthaltene konstitutiv aktive Promotor P_{vegT} zeigt allerdings eine sehr hohe Aktivität, was in manchen Fällen zu Problemen bei der Klonierung in *E. coli* oder *S. pneumoniae* führt. Aus diesem Grund wurden Mutationen in diesen Promotor P_{vegT} eingebracht, welche zu einer Minderung der Aktivität führen. Für die anschließenden Versuche wurde das pTP3 mit dem veränderten Promotor P_{vegT3} verwendet. Die *comC*-Translationsfusion wurde, wie schon in einer früheren Studie beschrieben, in das Plasmid pTP_{vegT3} integriert (Kovács, 2009). Obwohl die Aktivität des Promotors stark verringert wurde, war es in diesem Fall ebenfalls nicht möglich, das erhaltene Plasmid in *E. coli* zu vermehren. Es wäre möglich, dass das N-terminale Leader-Peptid von *comC* in *E. coli*, obwohl der entsprechende ABC Transporter ComAB fehlt in die Membran integriert wird und dort ebenfalls Signalwirkung hat. Die Anreicherung des Plasmids für die Zelle könnte daher toxisch sein. Daher wurde die Ligation des pTP_{vegT3}-*comC*''*lacZ* direkt in die entsprechenden *S. pneumoniae* Stämme transformiert. Die Transformanten wurden über die Blaufärbung auf D-Agar-Antibiotikaplatten, welche 60 µg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) enthielten, erkannt und anschließend die β-Galaktosidaseaktivität in BHI bestimmt. In diesem Fall kann die Aktivität in BHI gemessen werden, da die Expression von *comC* nicht vom nativen kompetenzinduzierten Promotor P_{comC} , sondern durch den konstitutiv aktiven Promotor P_{vegT3} kontrolliert wird.

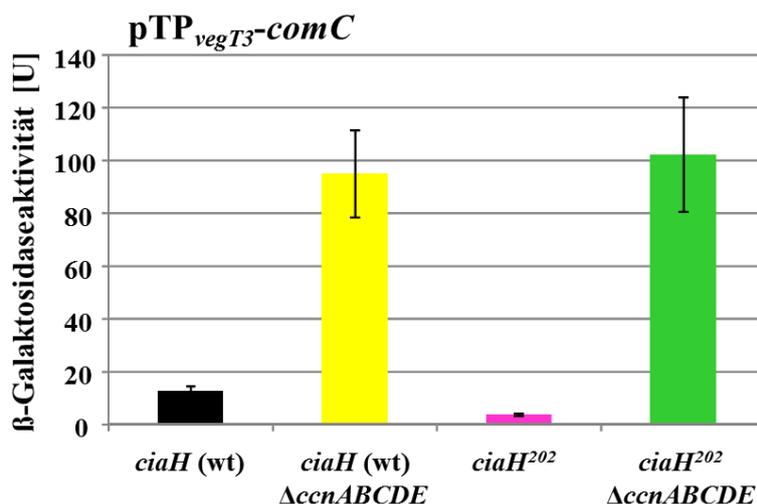


Abbildung 4.27: Durch das pTP_{vegT3-comC}''lacZ-Translationsfusionsprotein vermittelte β-Galaktosidaseaktivität verschiedener *S. pneumoniae* R6 Derivate.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI bis zu einer OD₆₀₀ = 0,4. Die β-Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β-Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 pTP_{vegT3comC} (RKL507), *S. pneumoniae* R6 Δ *ccnABCDE* pTP_{vegT3comC} (RKL762), *S. pneumoniae* R6 *ciaH*²⁰² pTP_{vegT3comC} (RKL665) und *S. pneumoniae* R6 *ciaH*²⁰² Δ *ccnABCDE* pTP_{vegT3comC} (RKL666).

Die Aktivität des Wildtypstammes R6 liegt vor der Deletion der csRNAs bei 12 Units (Abbildung 4.27; Tabelle 4.7). Nach der Deletion aller csRNAs konnte ein deutlicher Anstieg auf 94 Units beobachtet werden. In etwa der gleichen Höhe liegt auch die Aktivität des Stammes *S. pneumoniae* R6 *ciaH*²⁰² nach Deletion der csRNAs (102 Units). Ohne die Deletion der csRNAs zeigt der Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH*²⁰² die niedrigste Aktivität (3 Units). Diese Ergebnisse entsprechen den *in vivo* durch Transformationsassays in dieser und in früheren Studien erhaltenen Ergebnissen (Müller, 2011).

Tabelle 4.7: Durch das pTP_{vegT3-comC}''lacZ-Translationsfusionsprotein vermittelte β-Galaktosidaseaktivität verschiedener *S. pneumoniae* R6 Derivate.

RKL-Nummer	Genetik	β-Galaktosidaseaktivität [U] ± Standardabweichung	Aktivität/Aktivität wt
507	<i>ciaH</i> (wt) pTP _{vegT3-comC}	12 ± 1,9	
762	<i>ciaH</i> (wt) Δ <i>ccnA-E</i> pTP _{vegT3-comC}	94 ± 16,6	7,8
665	<i>ciaH</i> ²⁰² pTP _{vegT3-comC}	3 ± 0,5	0,25
666	<i>ciaH</i> ²⁰² Δ <i>ccnA-E</i> pTP _{vegT3-comC}	102 ± 21,7	8,5

Wie hier nochmals gezeigt werden konnte, ist die Repression der Translation in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* am stärksten und kann durch die Deletion der csRNAs vollständig aufgehoben werden.

Dieser negative Effekt der csRNAs auf die *comC*-Translation lässt sich ebenfalls gut im Wildtyp R6 im Vergleich zu seinem Deletionsstamm *S. pneumoniae* R6 Δ *ccnA-E* erkennen.

Die hier ermittelten Ergebnisse sprechen klar für eine negative Regulation der Translation der *comC* mRNA durch die csRNAs. Da innerhalb dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die einzelnen csRNAs einen unterschiedlichen Effekt auf den *comX* Promotor ausüben, sollte im Folgenden auch ihr Effekt auf die Translation von *comC* beobachtet werden.

In dieser Arbeit konnte bereits beobachtet werden, dass die Stämme mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel in Kombination mit einzelnen csRNAs eine starke Instabilität aufweisen. Daher sollte für die weiteren Versuche der Wildtyp R6 herangezogen werden. Um den Effekt jeder csRNA auf die Translation der *comC* mRNA zu untersuchen, wurden diese über die Plasmide *pCcnA-E* und *pVccnA-E* in den Stamm *S. pneumoniae* R6 Δ *ccnA-E* eingebracht. In den Plasmiden *pCcnA-E* steht die Expression der csRNAs unter der Kontrolle ihrer nativen Promotoren (Schnorpfeil *et al.*, 2013), wohingegen in den Plasmiden *pVccnA-E* der konstitutiv aktive CiaR unabhängige Promotor P_{vegT} diese Funktion übernimmt. Durch diesen Promotor sollte die Expression der csRNAs etwas verstärkt sein (Backes, 2010; Gartmann, 2010; Hummes 2010; Kaysen, 2010; Vatter, 2010), wodurch der Effekt einzelner csRNAs verstärkt sein sollte. In Abbildung 4.28 und Tabelle 4.8 ist zu erkennen, dass durch das Einbringen jeder einzelnen csRNA, unter der Kontrolle ihres nativen Promotors (ausgefüllte Balken) die Translation der *comC* mRNA negativ beeinflusst wird. Den geringsten Effekt zeigt csRNA5 (*pCcnE*), bei welcher mit einer Aktivität von 84 Units nur ein geringer Unterschied zum Deletionsstamm mit 94 Units besteht. Für die Stämme mit csRNA1 (*pCcnA*), csRNA2 (*pCcnB*) und csRNA3 (*pCcnC*) unter Kontrolle des nativen Promotors, konnten Aktivitäten von etwa 68 Units bestimmt werden. Der stärkste reprimierende Effekt auf die *comC*-Translation konnte durch csRNA4 (*pCcnD*) beobachtet werden. Mit 44 Units ist die Aktivität in diesem Stamm im Vergleich zum Deletionsstamm um die Hälfte gesunken.

Die stärkere Expression der csRNAs durch den konstitutiven Promotor P_{vegT} führt in allen Stämmen zu einer stärkeren Repression der *comC*-Translation (Abbildung 4.28; Tabelle 4.8). Am schwächsten ist dieser Effekt in den Stämmen, welche csRNA3 (*pCcnC/pVccnC*) enthalten. Hier fällt die Aktivität lediglich um das 1,1 fache von 67 Units (*pCcnC*) auf 58 Units (*pVccnC*) ab. Allerdings ist der native Promotor der csRNA3 mit etwa 2000 Units mit Abstand der stärkste der csRNAs (Halfmann *et al.*, 2007b). Der stärkste Effekt des konstitutiven Promotors P_{vegT} ist in den Stämmen mit csRNA2 (*pCcnB/pVccnB*) und csRNA5 (*pCcnE/pVccnE*) zu erkennen. In diesen Fällen ist die Repression durch den stärkeren Promotor 1,6 fach stärker. Etwas schwächer ist die Repression in den Stämmen, welche csRNA1 (*pCcnA/pVccnA*) enthalten. Hier ist eine 1,4 fach stärkere Repression zu erkennen. Der Stamm mit csRNA4 zeigt auch mit dem konstitutiven Promotor P_{vegT} , wie auch mit nativem Promotor, die stärkste Repression. Vergleicht man allerdings die beiden csRNA4 Stämme, wird sichtbar, dass die

Repression durch den konstitutiven Promotor (*pVccnD*) nur um das 1,3 fache stärker ist als in dem Stamm mit nativem Promotor (*pCcnD*).

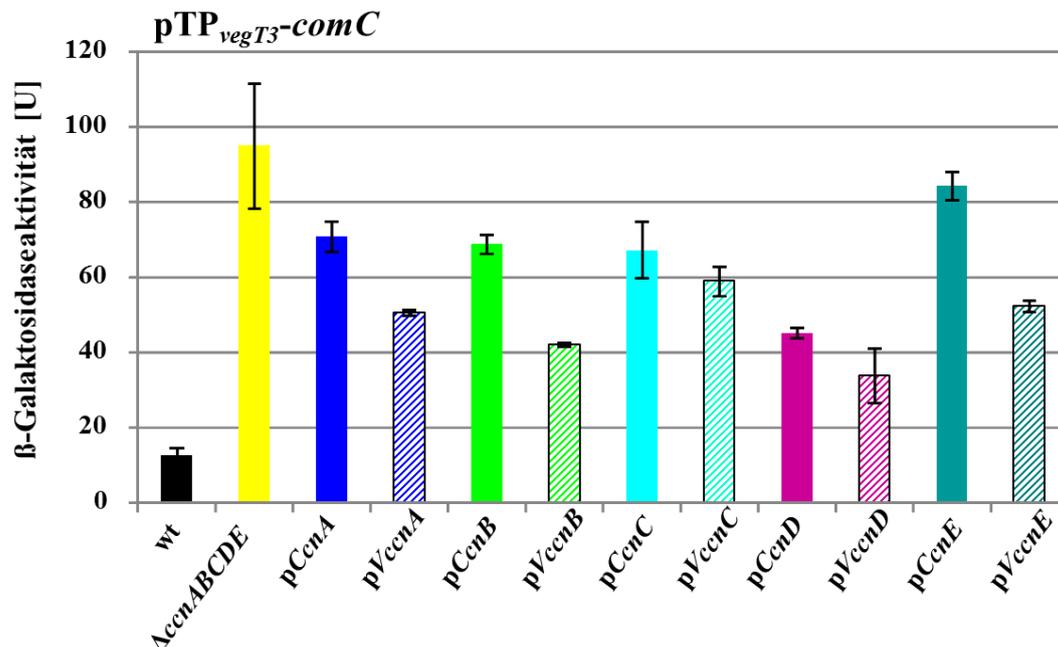


Abbildung 4.28: Durch das $pTP_{vegT3-comC}$ ''lacZ-Translationsfusionsprotein vermittelte beta-Galaktosidaseaktivität verschiedener *S. pneumoniae* R6 Derivate.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die beta-Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Das Signifikanzniveau für die Repression einzelner csRNAs beträgt $P < 0,05$. Dargestellt ist die beta-Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $pTP_{vegT3comC}$ (RKL507), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT3comC}$ (RKL762), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT3comC}$ *pCcnA/pVccnA* (RKL667/763), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT3comC}$ *pCcnB/pVccnB* (RKL668/764), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT3comC}$ *pCcnC/pVccnC* (RKL669/765), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT3comC}$ *pCcnD/pVccnD* (RKL670/766), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT3comC}$ *pCcnE/pVccnE* (RKL671/767).

Tabelle 4.8: Durch das $pTP_{vegT3-comC}$ ''lacZ-Translationsfusionsprotein vermittelte beta-Galaktosidaseaktivität verschiedener *S. pneumoniae* R6 Derivate.

RKL- Nummer	Genetik	beta-Galaktosidaseaktivität [U] ± Standardabweichung	Aktivität <i>pCcn/pVccn</i>
507	$pTP_{vegT3-comC}$	12 ± 1,9	
762	$\Delta ccnA-E$ $pTP_{vegT3-comC}$	94 ± 16,6	
667	$\Delta ccnA-E$ $pTP_{vegT3-comC}$ <i>pCcnA</i>	70 ± 4,1	
763	$\Delta ccnA-E$ $pTP_{vegT3-comC}$ <i>pVccnA</i>	50 ± 0,6	1,4
668	$\Delta ccnA-E$ $pTP_{vegT3-comC}$ <i>pCcnB</i>	68 ± 2,6	
764	$\Delta ccnA-E$ $pTP_{vegT3-comC}$ <i>pVccnB</i>	42 ± 6,4	1,6
669	$\Delta ccnA-E$ $pTP_{vegT3-comC}$ <i>pCcnC</i>	67 ± 7,5	
765	$\Delta ccnA-E$ $pTP_{vegT3-comC}$ <i>pVccnC</i>	58 ± 3,9	1,1

670	$\Delta ccnA$ -E pTP _{vegT3} - <i>comC</i> pCcnD	44 ± 1,3	
766	$\Delta ccnA$ -E pTP _{vegT3} - <i>comC</i> pVccnD	33 ± 7,3	1,3
671	$\Delta ccnA$ -E pTP _{vegT3} - <i>comC</i> pCcnE	84 ± 3,8	
767	$\Delta ccnA$ -E pTP _{vegT3} - <i>comC</i> pVccnE	52 ± 1,4	1,6

Insgesamt wird deutlich, dass alle csRNAs eine negative Wirkung auf die Translation der *comC* mRNA ausüben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es sich bei *comC*, entgegen früherer Studien (Tsui *et al.*, 2010), tatsächlich um ein Kompetenz spezifisches Zielgen der csRNAs handelt. Des Weiteren wurde deutlich, dass die csRNAs additiv wirken, da jede einzelne csRNA einen negativen Effekt auf die Translation der *comC* mRNA ausübt und keine alleine die Translation vollständig unterdrücken kann.

Im Folgenden Abschnitt soll nun die Interaktion der *comC* mRNA mit den csRNAs genauer untersucht werden.

Um die Region, welche für die Bindung der csRNAs an die *comC* mRNA wichtig ist, zu identifizieren, wurden verschiedene Mutationen in die *comC*-Translationsfusion eingebracht. Sind die mutierten Regionen wichtig für die Hybridisierung der csRNA mit der *comC* mRNA, sollte dies den negativen Effekt der csRNAs auf die Translation schwächen oder eine Bindung sogar vollständig verhindern.

4.5.2 Komplementarität der csRNAs mit der *comC* mRNA

Die Hybridisierung der csRNAs und der *comC* mRNA wird im Folgenden genauer untersucht. Hierfür wurden zuerst Regionen in der *comC* mRNA vorhergesagt, welche essentiell für die Bindung der csRNAs sind. Ein Modell dieser Bindung wurde bioinformatisch mithilfe des Mfold Hybridisierungsprogramms von Zuker erstellt (Zuker, 2003). Dieses Programm prognostiziert eine Bindung der csRNAs, welche die Shine-Dalgarno-Sequenz, das Startcodon und eine Region etwas downstream der *comC* mRNA einschließt (Abbildung 4.29 A). Die Frage, welche dieser Regionen für die beobachtete csRNA vermittelte Regulation der *comC* mRNA von Bedeutung ist, sollte mit Hilfe von diversen Mutationen genauer untersucht werden.

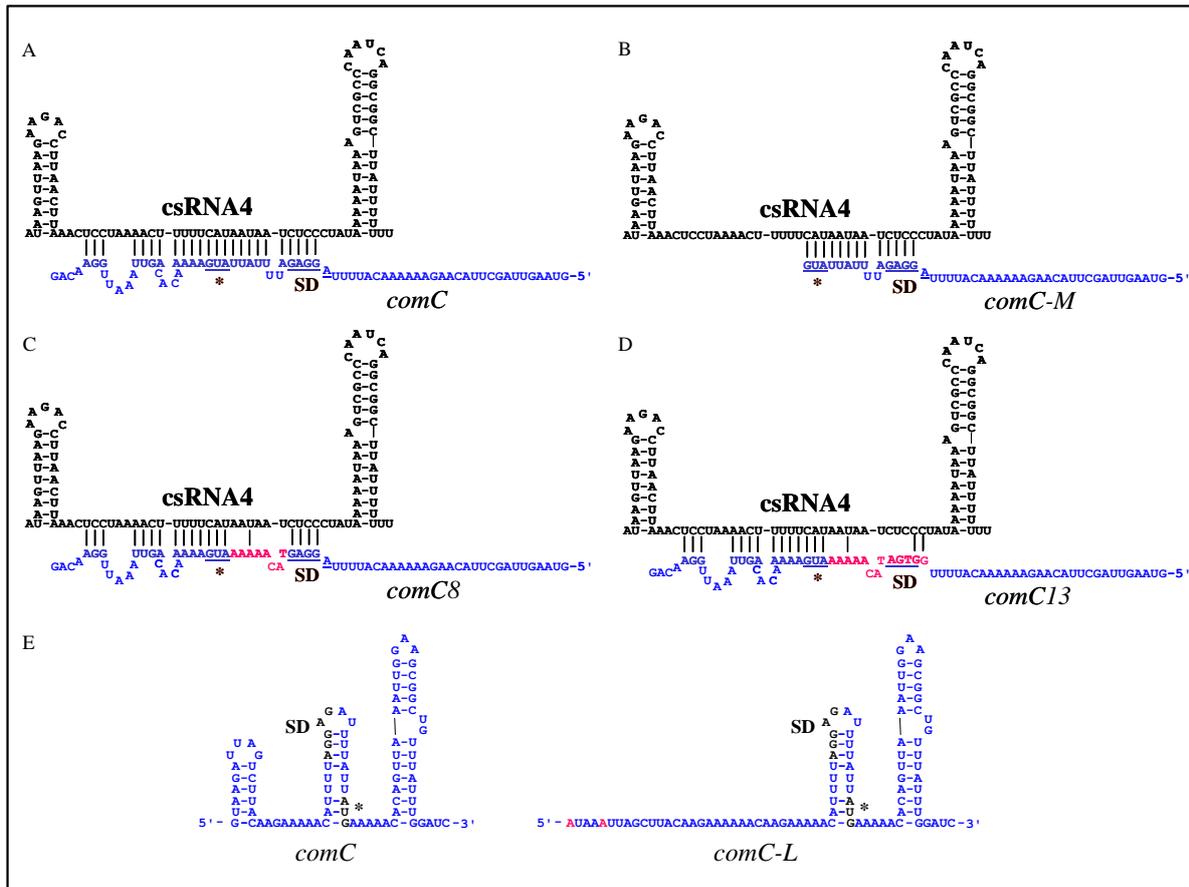


Abbildung 4.29: Veränderungen in der *comC* mRNA und ihre Folgen für die Hybridisierung mit csRNA4 (Zucker, 2003).

Die mögliche Bindung aller csRNAs an die *comC* mRNA ist sehr ähnlich, daher wurde hier vereinfacht nur die Bindung zu csRNA4 gezeigt. Gezeigt ist die Hybridisierung von *comC* (wt) (A), *comC-M* (B), *comC8* (C) und *comC13* (D) an die csRNA4. In Abschnitt E ist die Strukturveränderung der *comC* mRNA gezeigt, welche durch die Mutation *comC-L* entsteht. Die in die *comC* mRNA eingebrachten Mutationen sind rot, die Shine-Dalgarno mit SD und das Startcodon mit (*) gekennzeichnet.

Zum einen wurden innerhalb dieses Bereiches Mutationen eingebracht, (*comC8* und *comC13*) oder die mRNA verkürzt (*comC-M*). Zum anderen wurde eine Mutation in die erste Stammschleife der *comC* mRNA eingebracht, welche die Stabilität der mRNA beeinträchtigen sollte (*comC-L*) (Sharp & Bechhofer, 2005). Die Hybridisierung bzw. die Faltung der *comC* mRNA aller *comC* Mutationen sind der Abbildung 4.29 zu entnehmen.

Bei *comC-M* wurde der Bereich downstream des Startcodons nicht mit in das Plasmid pTP3 fusioniert, wodurch der Interaktionsbereich downstream des Startcodons entfällt (Abbildung 4.29 B).

Die *comC8*-Translationsfusion enthält Mutationen zwischen der Shine-Dalgarno-Sequenz (GGAG) und dem Startcodon (Abbildung 4.29 C).

Eine weitere mutierte Translationsfusion, *comC13*, besteht aus den Mutationen, welche in *comC8* enthalten sind, zusätzlich wurde hier die Shine-Dalgarno-Sequenz selbst verändert (Abbildung 4.29 D).

Durch die *comC-L*-Translationsfusion sollte sich die vorhergesagte erste Stammschleife der *comC* mRNA nicht bilden, was sich auf die weitere Faltung und die Stabilität der mRNA niederschlagen könnte (Abbildung 4.29 E)(Sharp & Bechhofer, 2005). Generell ist allerdings nicht klar, ob sich die *comC* mRNA tatsächlich in der von Zuker vorhergesagten Art und Weise faltet. Dagegen spricht die Tatsache, dass die *comC* mRNA sehr stark translatiert wird, was bei einer Paarung der Shine-Dalgarno Sequenz in einer Stammschleife sehr unwahrscheinlich wäre.

Um die Ergebnisse dieses Versuchsteils besser mit den Ergebnissen früherer Studien vergleichen zu können, wurde hier auf das pTP3 zurückgegriffen, welches den unveränderten Promotor P_{vegT} enthält. Da auch die Klonierung der *comC*-Fusion mit dem veränderten Promotor P_{vegT3} Probleme aufwarf (siehe 4.5.1), sprach nichts dagegen, in diesem Fall auf den unveränderten Promotor zurückzugreifen. Die Konstruktion dieser Stämme ist unter Punkt 3.2.20 beschrieben. Die einzelnen Translationsfusionen wurden in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$ eingebracht und die β -Galaktosidaseaktivität in BHI bei einer OD_{600} von 0,4 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.30 und Tabelle 4.9 dargestellt.

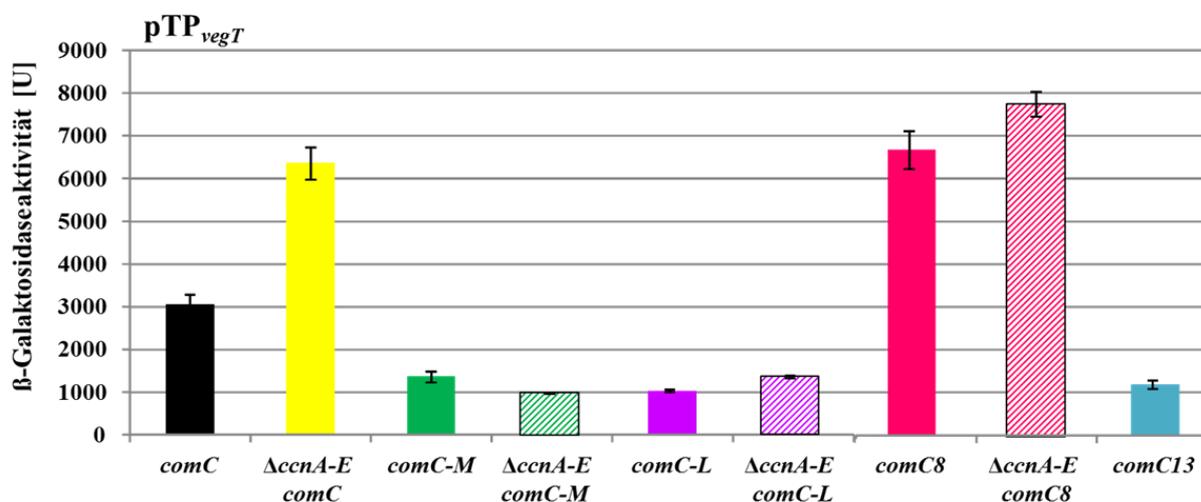


Abbildung 4.30: Durch verschiedene pTP_{vegT} -*comC'*lacZ-Translationsfusionsproteine vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $pTP_{vegT}comC$ (RKL123), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT}comC$ (RKL768), *S. pneumoniae* R6 $pTP_{vegT}comC-M$ (RKL326), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT}comC-M$ (RKL327), *S. pneumoniae* R6 $pTP_{vegT}comC-L$ (RKL333), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT}comC-L$ (RKL334), *S. pneumoniae* R6 $pTP_{vegT}comC8$ (RKL328), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT}comC8$ (RKL329), *S. pneumoniae* R6 $pTP_{vegT}comC13$ (RKL332).

Durch die Deletion der csRNAs steigt die Aktivität der Wildtyp *comC*-Translationsfusion um das Zweifache von 3045 Units auf 6349 Units an (Abbildung 4.30; Tabelle 4.9). Ein deutlich größerer Unterschied konnte zuvor mithilfe des pTP_{vegT3} beobachtet werden (siehe 4.5.1). Der Unterschied

könnte entstehen, da sehr hohe β -Galaktosidaseaktivitäten stärkere Schwankungen aufweisen und sehr niedrige schwieriger zu detektieren sind. Für die weiteren Untersuchungen ist dies nicht von Bedeutung, da hier ein Unterschied zwischen den mutierten Translationsfusionen zum Wildtyp *comC* detektiert werden sollte. In Abbildung 4.30 und Tabelle 4.9 ist deutlich zu erkennen, dass die Translation durch die Mutationen *comC-M*, *comC13* und *comC-L* stark beeinträchtigt wird. In diesen Stämmen sinkt die β -Galaktosidaseaktivität auf 1362 (*comC-M*), 1174 (*comC13*) und 1032 (*comC-L*) Units ab. Auffällig ist dagegen, dass die β -Galaktosidaseaktivität des Stammes mit der *comC8*-Translationsfusion auf 6666 Units ansteigt. Damit zeigt dieser Stamm in etwa die gleiche Aktivität wie der *csRNA* Deletionsstamm (6349 Units). Auf Grund dieses Ergebnisses könnte es daher möglich sein, dass die hier in *comC8* eingebrachten Mutationen die Bindung der *csRNAs* an die *comC* mRNA aufhebt.

Tabelle 4.9: Durch verschiedene $pTP_{vegT-comC''lacZ}$ -Translationsfusionsproteine vermittelte β -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$.

<i>RKL-Nummer</i>	<i>Genetik</i>	β -Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung	Aktivität / <i>wt</i>
123	$pTP_{vegTcomC}$	3045 \pm 247	
768	$\Delta ccnA-E pTP_{vegTcomC}$	6349 \pm 371	2,1
326	$pTP_{vegTcomC-M}$	1362 \pm 125	0,4
327	$\Delta ccnA-E pTP_{vegTcomC-M}$	981 \pm 7	0,1
333	$pTP_{vegTcomC-L}$	1032 \pm 29	0,3
334	$\Delta ccnA-E pTP_{vegTcomC-L}$	1358 \pm 34	0,2
328	$pTP_{vegTcomC8}$	6666 \pm 441	2,2
329	$\Delta ccnA-E pTP_{vegTcomC8}$	7757 \pm 287	1,2
332	$pTP_{vegTcomC13}$	1174 \pm 103	0,3

Um auszuschließen, dass es sich bei der *comC8*-Translationsfusion um eine starke Aktivierung der Translation ohne Beteiligung der *csRNAs* handelt, wurde diese Translationsfusion in dem *csRNA* Deletionsstamm getestet. Sollte der Anstieg unabhängig von den *csRNAs* sein, sollte hier eine noch stärkere Aktivierung zu beobachten sein. Des Weiteren wurden die Translationsfusionen *comC-M* und *comC-L* in den Deletionsstamm eingebracht. In diesen beiden Stämmen sinkt zwar die β -Galaktosidaseaktivität um etwa das Dreifache im Vergleich zum Wildtyp, allerdings könnte es sich hier ebenfalls um eine *csRNA* unabhängige negative Wirkung auf die Translation handeln. Falls die eingebrachten Mutationen die Bindung der *csRNAs* beeinflussen, sollte ein Vergleich mit dem jeweiligen Deletionsstamm dies zeigen. Die mutierte Translationsfusion *comC13* wurde nicht weiter

untersucht, da es sich hierbei um dieselben Mutationen wie in *comC8* handelt und davon auszugehen ist, dass der Abfall der Aktivität durch die veränderte Shine-Dalgarno-Sequenz verursacht wird. Die β -Galaktosidaseaktivitäten der veränderten *comC*-Translationsfusionen in dem csRNA Deletionsstamm sind ebenfalls in Abbildung 4.30 und Tabelle 4.9 dargestellt.

Die β -Galaktosidaseaktivität in dem csRNA Deletionsstamm in Kombination mit der *comC-M*-Translationsfusion liegt bei 981 Units. Damit ist die Aktivität um das 6 fache niedriger, als die des csRNA Deletionsstammes mit der Wildtyp *comC*-Translationsfusion. Auch im Vergleich zum Wildtypstamm mit der *ComC-M* Fusion, welcher eine Aktivität von 1362 Units zeigt (Abbildung 4.30), ist die Aktivität nochmal leicht abgefallen. Hier ist davon auszugehen, dass das Fehlen des Bereiches downstream des Startcodons einen deutlichen Abfall in der Translationseffizienz bewirkt.

Ein leichter Anstieg der Aktivität im csRNA Deletionsstamm auf 1358 Units im Vergleich zum Wildtyp R6 mit 1032 Units (Abbildung 4.30) ist für die *ComC-L*-Translationsfusion zu erkennen. Hierbei handelt es sich lediglich um einen geringen Anstieg, der nicht signifikant für eine Regulation durch die csRNAs ist.

Ein von diesen Stämmen unterschiedliches Ergebnis ergibt sich für die *comC8*-Translationsfusion. Durch diese Veränderung der *comC* mRNA konnte ein 2,1 facher Anstieg der β -Galaktosidaseaktivität im Wildtyp R6 beobachtet werden (Abbildung 4.30). Die β -Galaktosidaseaktivität ändert sich nur leicht durch die Deletion der csRNAs. Mit 7757 Units liegt dies ebenfalls in dem Bereich des csRNA Deletionsstammes, welcher das Wildtyp *comC*- Allel enthält.

Dass sich die Aktivität der hier getesteten *comC* Mutationen durch das Deletieren der csRNAs nicht stark verändert, zeigt, dass alle Mutationen die Bindung der csRNAs an die *comC* mRNA verhindern. Anhand dieser Versuche konnten daher einige Bereiche definiert werden, die für die Hybridisierung der csRNAs an die *comC* mRNA von Bedeutung sind. Hierzu gehört der Bereich zwischen der Shine-Dalgarno-Sequenz und dem Startkodon (*comC8*), sowie der Bereich downstream des AUGs (*comC-M*). Auch die Stabilität der *comC* mRNA scheint eine entscheidende Rolle bei der Bindung an die csRNAs zu spielen (*comC-L*).

Innerhalb dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass die *comC8*-Translationsfusion eine ähnlich starke Expression wie die Wildtyp *comC*-Translationsfusion aufweist. Zudem wurden in dieser *comC*-Variante keine Mutationen in der kodierenden Sequenz vorgenommen. Daher wurde diese Mutation ausgewählt um weitere Versuche zur csRNA Regulation durchzuführen.

Als erstes sollte mithilfe der *comC8* Mutation die stärkere negative Regulation der *comC* mRNA, durch eine erhöhte Menge an csRNAs, in dem hyperaktiven *ciaH202*-Stamm nachgewiesen werden.

Die Wildtyp *comC*-Translationsfusion sowie die *comC8*-Translationsfusion wurden in den hyperaktiven *ciaH202* Stamm eingebracht und die Regulation mittels β -Galaktosidase-Assay untersucht.

Die Ergebnisse dieser Aktivitätsmessung sind in Abbildung 4.31 und Tabelle 4.10 dargestellt.

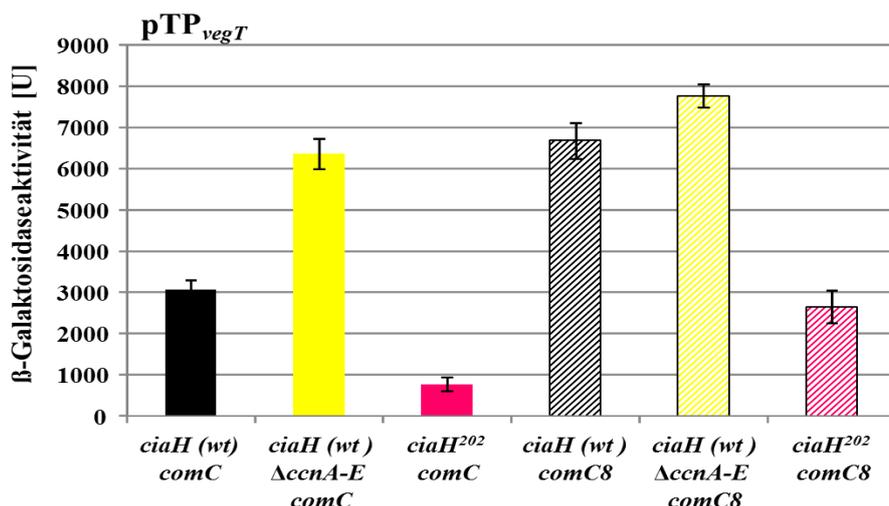


Abbildung 4.31: Durch pTP_{vegT}-*comC*'*lacZ*- und pTP_{vegT}-*comC8*'*lacZ* Translationsfusionsproteine vermittelte β-Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 Δ *ccnA-E* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202*.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI bis zu einer OD₆₀₀ = 0,4. Die β-Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β-Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 pTP_{vegT}*comC* (RKL123), *S. pneumoniae* R6 Δ *ccnABCDE* pTP_{vegT}*comC* (RKL768), *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH202* pTP_{vegT}*comC* (RKL330), *S. pneumoniae* R6 pTP_{vegT}*comC8* (RKL328), *S. pneumoniae* R6 Δ *ccnABCDE* pTP_{vegT}*comC8* (RKL329) *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaH202* pTP_{vegT}*comC8* (RKL331).

In Abbildung 4.31 und Tabelle 4.10 ist zu erkennen, dass das Wildtyp *comC*-Translationsfusionsprotein in dem Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel eine deutlich verringerte β-Galaktosidaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp R6 zeigt. Hier liegt die Aktivität lediglich bei 769 Units. Die veränderte *comC8*-Translationsfusion erreicht allerdings trotz hyperaktivem *ciaH202*-Allel eine β-Galaktosidaseaktivität von 2643 Units. Damit liegt die Aktivität dieses Stammes in etwa auf Höhe der des Wildtyps R6 mit unveränderter *comC*-Translationsfusion (3045 Units).

Tabelle 4.10: Durch pTP_{vegT}-*comC*'*lacZ*- und pTP_{vegT}-*comC8*'*lacZ* Translationsfusionsproteine vermittelte β-Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 Δ *ccnA-E* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202*.

RKL- Nummer	Genetik	β-Galaktosidaseaktivität [U] ± Standardabweichung	Aktivität / wt
123	<i>ciaH</i> (wt) pTP _{vegT} <i>comC</i>	3045 ± 247	
768	<i>ciaH</i> (wt) Δ <i>ccnA-E</i> pTP _{vegT} <i>comC</i>	6349 ± 371	2,1
330	Δ <i>ciaH202</i> pTP _{vegT} <i>comC</i>	769 ± 177	0,2
328	<i>ciaH</i> (wt) pTP _{vegT} <i>comC8</i>	6666 ± 441	2,2
329	<i>ciaH</i> (wt) Δ <i>ccnA-E</i> pTP _{vegT} <i>comC8</i>	7757 ± 287	2,5
331	R6 Δ <i>ciaH202</i> pTP _{vegT} <i>comC8</i>	2643 ± 386	0,9

Hier konnte klar gezeigt werden, dass ein stärkerer Effekt, durch eine erhöhte Menge an csRNAs im hyperaktiven *ciaH202*-Allel auf das Wildtyp *comC* zu beobachten ist. Auch die Translation der *comC8*-Variante wird unter diesen Bedingungen durch die csRNAs negativ reguliert. Diese Regulation konnte im CiaRH Wildtyp nicht beobachtet werden. Nichts desto trotz konnte klar gezeigt werden, dass die negative Regulation durch die csRNAs in der *comC8*-Variante stark beeinträchtigt ist.

Ob diese Veränderung in der *comC* mRNA ausreichend ist um die Kompetenzentwicklung unter kompetenzinhibierenden Bedingungen zu ermöglichen, sollte daher im Anschluss geklärt werden.

4.5.3 Untersuchung der *comC8* Mutation im hyperaktiven CiaRH-Hintergrund

Innerhalb dieser Arbeit und früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Hyperaktivierung des CiaRH Systems durch Mutationen in der Histidinkinase CiaH, zu einer Blockierung der natürlichen Kompetenzentwicklung in *S.pneumoniae* R6 führt (Guenzi *et al.*, 1994). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Deletion aller csRNAs in diesen Stämmen den kompetenzinhibierenden Effekt des CiaRH Systems aufhebt (Müller *et al.*, 2011). In dieser Arbeit konnte eine additive Wirkung der csRNAs auf die *comC* mRNA nachgewiesen werden. Außerdem führte eine Veränderung der *comC*-mRNA zu einem vollständigen Verlust der reprimierenden Wirkung der csRNAs auf eine Translationsfusion.

Auch in dem hyperaktiven *ciaH202*-Allel konnte eine starke Verminderung des inhibitorischen Effekts nachgewiesen werden (siehe 4.5.2). Im Folgenden wird diese Veränderung in das auf dem Genom enthaltene *comC* Wildtyp-Allel eingebracht und die Kompetenz mithilfe eines Transformationstests bestimmt (siehe 3.2.21). Hierfür wurde das veränderte *comC8*-Allel mittels überlappender PCR mit Mutageneseprimern amplifiziert (siehe 3.2.7.1). Dieses *comC8DE* PCR-Produkt wurde anschließend über die Janus-Kassette in den Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 comC::janus* eingebracht (Sung *et al.*, 2001). Der so entstandene Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 comC8* wurde bezüglich seiner Transformierbarkeit in C+Y-Medium untersucht (siehe 3.2.2.3).

Wie in Abbildung 4.32 zu erkennen ist, zeigt der Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel in Kombination mit dem veränderten *comC8*-Allel natürliche Kompetenz. Das Maximum mit einer Transformationseffizienz von etwa 0,04 % wird nach 150 bzw. 120 min erreicht. Somit erreicht dieser Stamm dieselbe Transformationseffizienz wie der Wildtyp R6 und der *ciaH202* csRNA Deletionsstamm (Abbildung 4.5). Allerdings sind Unterschiede in dem Verlauf der Kompetenz zu erkennen. Bis auf einen deutlichen Peak bei 150 min bzw. 120 min, zeigt der Stamm *ciaH202 comC8* nur geringe Transformierbarkeit, wohingegen die anderen beiden Stämme, *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E*, einen breiteren Bereich der Transformierbarkeit aufweisen (Abbildung 4.5). Dass eine Transformierbarkeit dem Wildtyp entsprechend erreicht wird, zeigt allerdings, dass die Veränderungen in *comC8* den inhibitorischen Effekt der csRNAs auf die *comC*-Translation aufheben.

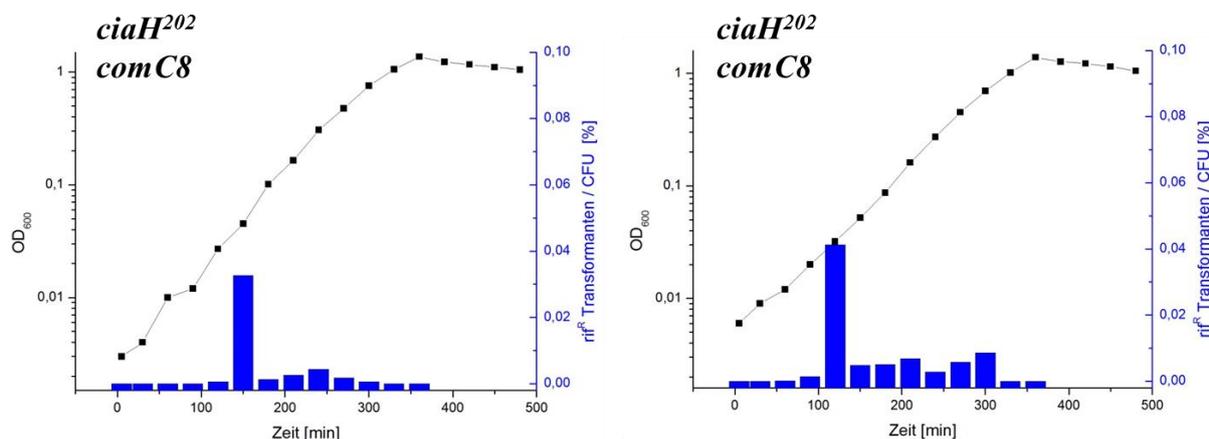


Abbildung 4.32: Einfluss des *comC8*-Allels auf den CiaRH-regulierten Kompetenzverlauf während des Wachstums in C+Y-Medium.

Die Kompetenzentwicklung von *S. pneumoniae*-Stämmen *ciaH202 comC8* (RKL347) wurde in C+Y-Medium untersucht. Zum Starten des Experiments wurde das Medium 1 %ig mit einer Glycerinkultur aus C+Y-Medium pH 6,8 beimpft. Proben wurden 5 min nach dem Animpfen, dann im Abstand von 30 min bis zur Stationärphase geerntet und die Transformationseffizienz mithilfe des Transformationsmarkers RKL222 bestimmt. Die Transformationseffizienz (blaue Balken) ist der prozentuale Anteil der Rifampin-resistenten Transformanten an der Lebendkeimzahl (CFU = Colony forming units). Das Wachstum (schwarze Kurve) wurde mittels der optischen Dichte bei 600 nm photometrisch verfolgt. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildung je zwei als repräsentative Beispiele zeigt.

Da weitere Untersuchungen mit einzelnen csRNAs in diesem Stamm wegen der beobachteten Instabilität dieser Stämme kritisch sind, wurde die Wirkung des *ComC8*-Allels auch im Wildtyp unter kompetenzinhibierenden Bedingungen bestimmt.

4.5.4 Untersuchung der *comC8* Mutation im CiaRH Wildtyp Hintergrund

Wie unter Punkt 4.5.3 gezeigt, führt die Veränderung der *comC* mRNA in *comC8* zu einer Aufhebung des kompetenzinhibierenden Effektes der csRNAs im hyperaktiven *ciaH202*-Allel. Ob dies auch im Wildtyp R6 in dem kompetenzinhibierenden Medium BHI zu beobachten ist, wird im Folgenden mithilfe des schon zuvor verwendeten Promotors P_{comX} bestimmt. Hierfür wurde das *ciaH::janus* Konstrukt in den zuvor verwendeten Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 comC8* (siehe 4.5.3) eingebracht (siehe 3.2.21) und anschließend durch das Wildtyp *ciaH*-Allel ersetzt. Um die Kompetenzentwicklung zu verfolgen, wurde das Promotorplasmid pPP_{comX} in den entstandenen Stamm integriert. In diesem Stamm wurde die β -Galaktosidaseaktivität in BHI Medium bestimmt und mit den zuvor ermittelten Aktivitäten diverser Stämme in BHI verglichen (siehe 4.4.1).

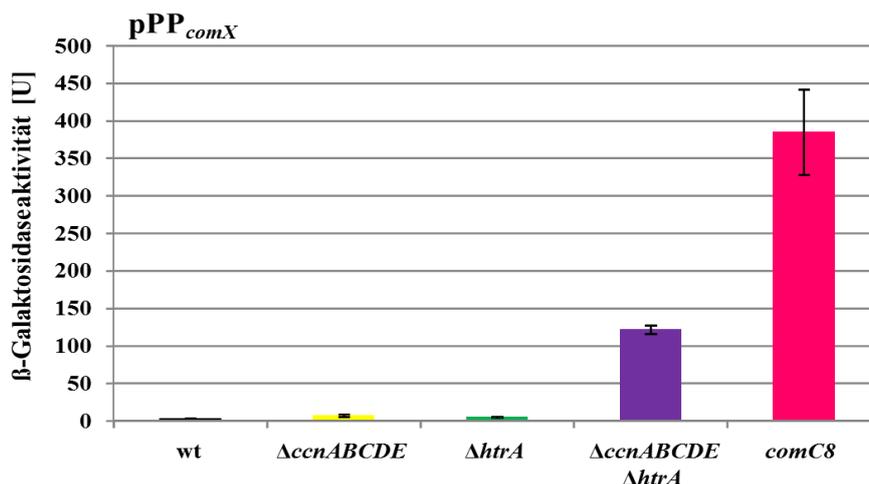


Abbildung 4.33: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 und seinen Derivaten in BHI.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 pPP2 $comX$ (RKL508), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ pPP2 $comX$ (RKL509), *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ pPP2 $comX$ (RKL677), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE \Delta htrA$ pPP2 $comX$ (RKL679), *S. pneumoniae* R6 $comC8DE$ pPP2 $comX$ (RKL556).

Wie in Abbildung 4.33 und Tabelle 4.11 zu erkennen ist, zeigt der Stamm *S. pneumoniae* R6 $comC8$ in BHI im Vergleich zu den anderen Stämmen eine sehr starke Aktivität des Promotors P_{comX} . Wie schon unter Punkt 4.4.1 beschrieben, kommt es nur durch die Doppeldeletion der csRNAs und $htrA$ in dem kompetenzinhibierenden Medium BHI zur Ausbildung der natürlichen Kompetenz. Dieser Stamm *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E \Delta htrA$ pPP $comX$ erreicht eine Aktivität von 121 Units. Mit 385 Units liegt die Aktivität des Promotors P_{comX} in dem Stamm mit veränderter $comC$ mRNA, $comC8$, mehr als das Doppelte über diesem. Dieses könnte daher kommen, dass eine etwas stärkere Expression in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E P_{vegT}comC8$ (7757 Units) als in dem Vergleichsstamm *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E P_{vegT}comC$ (6349 Units) nachgewiesen wurde. Die Veränderungen in der $comC$ mRNA könnten somit einen geringen, csRNA unabhängigen, positiven Einfluss auf die Translation haben. Allerdings konnte im Zuge dieser Arbeit ebenfalls ein positiver Effekt der csRNA4 und csRNA5 auf die Aktivität der Promotoren P_{comX} und P_{comC} nachgewiesen werden (siehe 4.4.2). Die $comC8$ Mutation könnte sich ausschließlich auf den negativen Effekt der csRNAs, welcher durch die Bindung dieser an die $comC$ mRNA erfolgt, auswirken. Da nicht geklärt ist, wie die csRNA4 und csRNA5 positiv auf den Promotor der frühen Kompetenzgene $comC$ und $comX$ wirken, könnte dies den starken Anstieg der Aktivität bedingen.

Tabelle 4.11: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 und seinen Derivaten in BHI.

<i>RKL-Nummer</i>	<i>Genetik</i>	β -Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung
508	wt	2,8 \pm 0,5
509	$\Delta ccnA-E$	4,5 \pm 0,2
677	$\Delta htrA$	6,7 \pm 1,5
679	$\Delta ccnA-E \Delta htrA$	121 \pm 5,6
556	<i>comC8</i>	385 \pm 56,8

Da die Standardabweichung in diesem Stamm sehr deutlich ist und der positive Effekt der csRNA4 und csRNA5 auch innerhalb der Untersuchung des Kompetenzverlaufs beobachtet wurde, sollte auch für den Stamm *S. pneumoniae* R6 *comC8* der Verlauf der Kompetenz ermittelt werden. Hierfür wurde wieder die unter 3.2.17.4 beschriebene Methode der β -Galaktosidasebestimmung verwendet. Die Ergebnisse der β -Galaktosidasebestimmung sind in Abbildung 4.34 dargestellt.

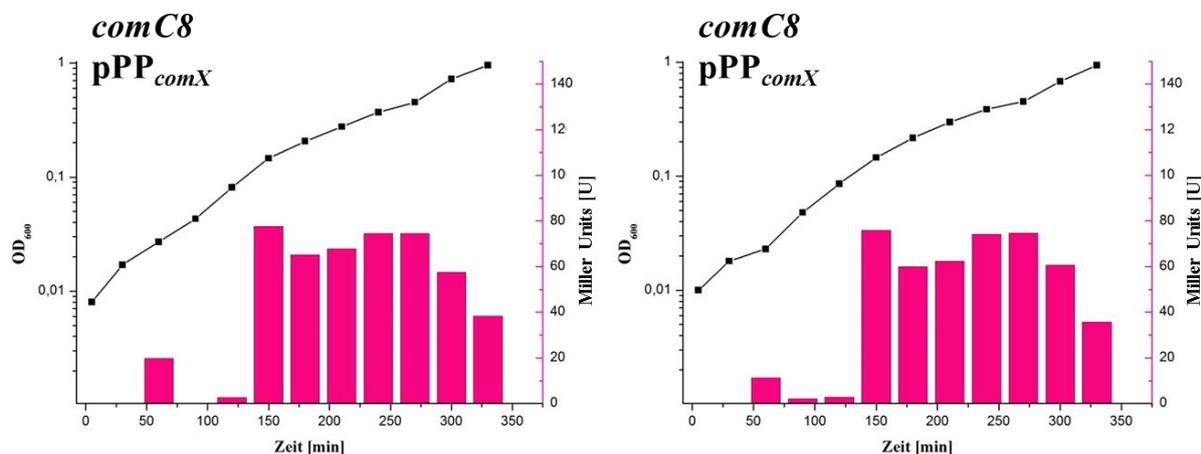


Abbildung 4.33: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 *comC8*.

Das Wachstum des Stammes *S. pneumoniae* R6 *comC8* (RKL556) erfolgte in BHI. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Zum Starten des Experiments wurde Medium 1 %ig mit einer Glycerinkultur aus C+Y-Medium pH 6,8 beimpft. Proben wurden 5 min nach dem Animpfen, dann im Abstand von 30 min bis zu 330min geerntet und die β -Galaktosidaseaktivität (Balken) bestimmt. Das Wachstum (schwarze Kurve) wurde mittels der optischen Dichte bei 600 nm photometrisch verfolgt. Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, wovon die Abbildung je zwei als repräsentative Beispiele zeigt.

Der hier getestete Stamm *S. pneumoniae* R6 *comC8* zeigt die stärkste Aktivierung des Promotors P_{comX} mit 77 Units nach 150 min (Abbildung 4.34). Damit zeigt er eine stärkere Aktivierung als die Stämme R6 (55 Units), R6 $\Delta ccnA-E$ (46 Units), R6 $\Delta ccnBCDE$ (55 Units), R6 $\Delta ccnACDE$ (65 Units) und R6 $\Delta ccnABDE$ (65 Units) (siehe 4.4.1). Allerdings liegt die Aktivierung unter der, der Stämme, welche die positiv wirkenden csRNA4 und csRNA5 enthalten. Diese erreichen eine Aktivität von 100 Units

(R6 $\Delta ccnABCE$) bzw. 141 Units (R6 $\Delta ccnABCD$). Der Verlauf der Kompetenz ähnelt dabei allerdings mehr dem Stamm mit csRNA5, da dieser auch schon früh in der exponentiellen Wachstumsphase nach 120 min eine starke Aktivität aufweist (Abbildung 4.24). Der Stamm mit csRNA4 hingegen entwickelt erst nach 210 Minuten starke Aktivität.

Es besteht die Möglichkeit, dass die positive Wirkung der csRNA4 und csRNA5 durch die Veränderung der *comC* mRNA beeinträchtigt, aber nicht vollständig verhindert wird.

Die Ergebnisse der *comC* Mutationsversuche machen noch einmal deutlich, dass es sich bei *comC* tatsächlich um das Kompetenz spezifische Zielgen der csRNAs handelt. Des Weiteren konnte klar gezeigt werden, dass die Bereiche zwischen der Shine-Dalgarno und dem Startkodon, sowie die Sequenz downstream des Startkodons und die Stabilität der mRNA entscheidend für die Bindung zwischen den csRNAs und der *comC* mRNA sind.

Diese Hybridisierung der csRNAs an die *comC* mRNA sollte im Anschluss mithilfe von Veränderungen in den csRNAs genauer untersucht werden. Hierzu wurden die csRNAs1 und csRNA4 ausgewählt. Schon in früheren Studien wurde ein Effekt der csRNA1 auf die Kompetenz beobachtet, hier konnte allerdings *comC* nicht als Zielgen der csRNA1 bestätigt werden (Tsui *et al.*, 2010). Innerhalb dieser Studie konnten aber deutliche Effekte der csRNA1 auf die *comC*-Translationsfusion nachgewiesen werden. Zum einen sollte daher der Effekt auf die Kompetenzentwicklung einer Mutation, welche den Promotor von *ccnA* verstärkt, getestet werden. Zum anderen wurden zwei unterschiedliche Veränderungen an der csRNA4, welche die Hybridisierung verbessern sollten, durchgeführt. Bei einer dieser Veränderungen wurde *ccnD* so verändert, dass es vollständig komplementär zu der zuvor getesteten *comC8* mRNA ist.

4.5.5 Veränderungen in csRNA1 und csRNA4 und deren Auswirkungen auf die Entwicklung der natürlichen Kompetenz

Innerhalb dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Veränderungen in der *comC* mRNA zu einer verminderten Bindung der csRNAs führen, wodurch der negative Effekt der csRNAs auf die Kompetenzentwicklung aufgehoben wird. Anhand von Translations- und Promotorfusionen sowie Transformationstests konnte gezeigt werden, dass die Veränderung *comC8* die Bindung der csRNAs an die *comC* mRNA vollständig aufhebt. Im Folgenden wurde nun die csRNA4 komplementär zu den Mutationen in der *comC8* mRNA verändert. Dadurch sollte es der veränderten csRNA4, genannt *ccnD-C8c*, möglich sein, die *comC8* mRNA zu binden und die Kompetenzentwicklung zu inhibieren. Hierfür wurde csRNA4 gewählt, da diese den stärksten inhibitorischen Effekt auf die *comC*-Translationsfusion zeigte (Abbildung 4.28).

Die Synthese der veränderten csRNA4-Sequenz mit einer *XbaI*-Schnittstelle am 5'- und einer *KpnI*-Schnittstelle am 3'-Ende wurde von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Die Sequenz wurde im pEX-A Plasmid erstellt (Abbildung: A1 Anhang). Mithilfe einer Restriktion mit den

Enzymen *Xba*I und *Kpn*I wurde die modifizierte Sequenz aus diesem Hintergrund geschnitten und in das mit *Xba*I und *Kpn*I geschnittene pSW1 eingebracht. Das entstandene pSW-*ccnD*-C8c Plasmid wurde in verschiedene *S. pneumoniae* R6 *comC8* Derivate eingebracht. In Abbildung 4.35 ist die Hybridisierung der Wildtyp *ccnD* an die *comC8* mRNA (A) im Vergleich zur Hybridisierung dieser mit der veränderten *ccnD*-C8c (B) dargestellt.

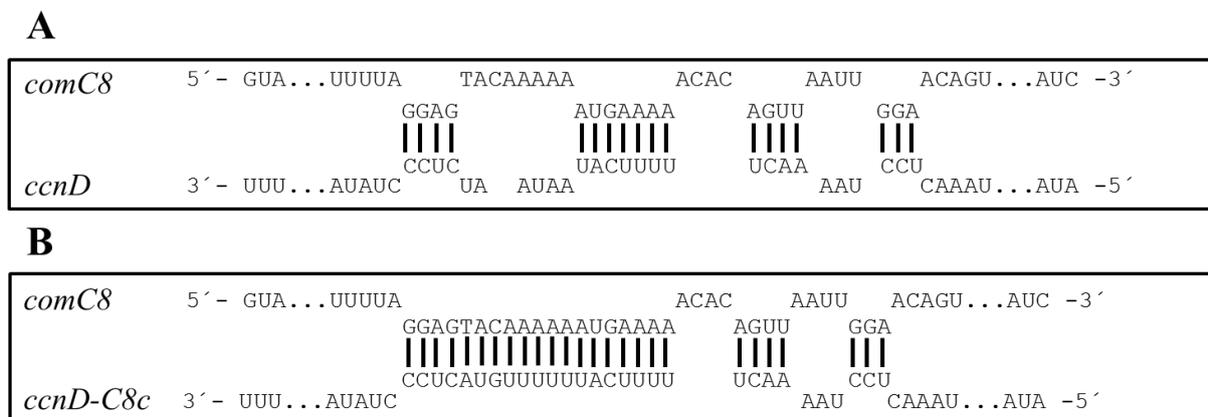


Abbildung 4.35: Hybridisierung nach Zuker (Zuker, 2003) der *comC8* mRNA mit der Wildtyp *ccnD* (A) und der veränderten *ccnD*-C8c (B).

Dargestellt ist die, über das Programm Mfold berechnete, mögliche Hybridisierung der *comC8* mRNA mit der Wildtyp *ccnD* und der veränderten *ccnD*-C8c. Mögliche Basenpaarungen sind durch Balken zwischen den jeweiligen Basen angedeutet.

Nach diesen Klonierungen liegt die veränderte csRNA4 in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *comC8* pPP_{comX} als sechste csRNA und in *S. pneumoniae* R6 *comC8* Δ*ccnD* pPP_{comX} anstelle der unveränderten csRNA4 vor. In diesen und in dem Vergleichsstamm *S. pneumoniae* R6 *comC8* pPP_{comX} wurde die β-Galaktosidaseaktivität bestimmt und die Ergebnisse in Abbildung 4.36 und Tabelle 4.12 dargestellt.

Durch das Einbringen der veränderten *ccnD*-C8c in *S. pneumoniae* R6 *comC8* pPP_{comX} kommt es zu einer deutlichen Verminderung der Aktivität. Diese sinkt von 386 Units auf 148 Units ab. Dieser Stamm, in welchem die veränderte *ccnD*-C8c als sechste csRNA vorliegt, zeigt eine etwas höhere Aktivität als *S. pneumoniae* R6 Δ*ccnD* *ccnD*-C8c pPP_{comX}, welcher diese csRNA als fünfte enthält (161 Units). Klar zu sehen ist, dass egal ob die veränderte *ccnD*-C8c als sechste oder als fünfte csRNA vorliegt, die negative Wirkung auf das veränderte *comC8* wieder zu beobachten ist. Die komplementär zu *comC8* veränderte csRNA ist wieder in der Lage an die mRNA zu binden und die Translation negativ zu beeinflussen.

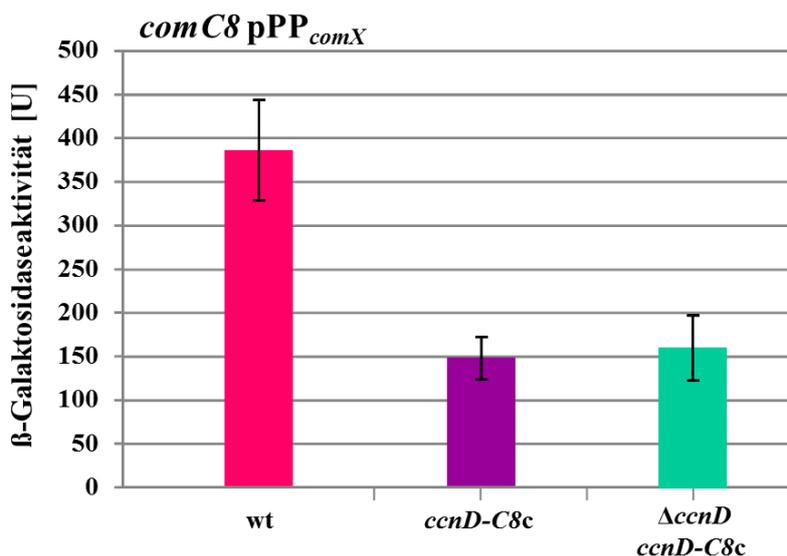


Abbildung 4.36: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 *comC8* und seinen Derivaten in BHI.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 *comC8* pPP2_{comX} (RKL556), *S. pneumoniae* R6 *comC8* *ccnD-C8c* pPP2_{comX} (RKL749), *S. pneumoniae* R6 *comC8* Δ *ccnD* *ccnD-C8c* pPP2_{comX} (RKL748).

Tabelle 4.12: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 *comC8* und seinen Derivaten in BHI.

<i>RKL-Nummer</i>	<i>Genetik</i>	β -Galaktosidaseaktivität [U] ± Standardabweichung
556	<i>comC8</i>	386 ± 57,8
749	<i>comC8</i> <i>ccnD-C8c</i>	148 ± 24,5
748	<i>comC8</i> Δ <i>ccnD</i> <i>ccnD-C8c</i>	161 ± 36,8

Innerhalb dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die csRNA4 zusätzlich zu der negativen Wirkung auf die *comC*-Translation einen positiven Effekt auf die Promotoren *comC* und *comX* ausübt. Dieser positive Effekt konnte nur beobachtet werden, wenn nur csRNA4 in diesen Stämmen enthalten war. Um einen eventuellen positiven Effekt der veränderten *ccnD-C8c* zu überprüfen, wurde daher ein Stamm konstruiert, in welchem nur diese csRNA enthalten ist. Hierzu wurde das veränderte *comC8* in den csRNA Deletionsstamm, welcher das Promotorprobe pPP2_{comX} enthielt, eingebracht. Anschließend wurde in diesen Stamm die veränderte csRNA4 über das Plasmid pSW-*ccnD-C8c* integriert. Die Ergebnisse der folgenden β -Galaktosidaseassays sind in Abbildung 4.37 und Tabelle 4.13 dargestellt.

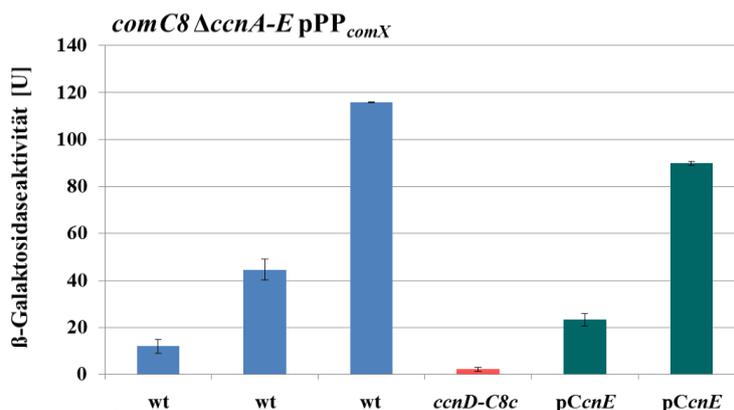


Abbildung 4.37: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 *comC8* Δ *ccnABCDE* und seinen Derivaten in BHI.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 *comC8* Δ *ccnABCDE* pPP2*comX* (RKL750), *S. pneumoniae* R6 *comC8* Δ *ccnABCDE* *ccnD-C8c* pPP2*comX* (RKL751), *S. pneumoniae* R6 *comC8* Δ *ccnABCDE* p*CcnE* pPP2*comX* (RKL769).

Wie schon innerhalb dieser Arbeit in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 Δ *htrA* pPP*comX* in THB-Medium beobachtet, kommt es auch in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 Δ *ccnA-E* *comC8* pPP*comX* zu starken Schwankungen in der β -Galaktosidaseaktivität (Abbildung 4.37, Tabelle 4.13). Drei der zwölf durchgeführten Messungen zeigten lediglich eine Aktivität von 12 Units. In diesen Stämmen ist nicht von einer Transformierbarkeit auszugehen. Bei sieben Messungen konnten dagegen für diesen Stamm 44 Units und bei zwei weiteren Messungen bis zu 115 Units bestimmt werden. Im Fall der 115 Units ist von einer natürlichen Kompetenzentwicklung auszugehen. Dass dieser Stamm nur manchmal natürliche Kompetenz entwickelt, könnte zum einen daran liegen, dass durch das Fehlen aller csRNAs auch der positive Effekt von csRNA4 und csRNA5 entfällt. Das würde allerdings bedeuten, dass die veränderte *ccnD-C8c* nicht in der Lage ist, den zuvor beobachteten positiven Effekt der csRNA4 auf die frühen Kompetenzpromotoren der Gene P_{comC} und P_{comX} auszuüben.

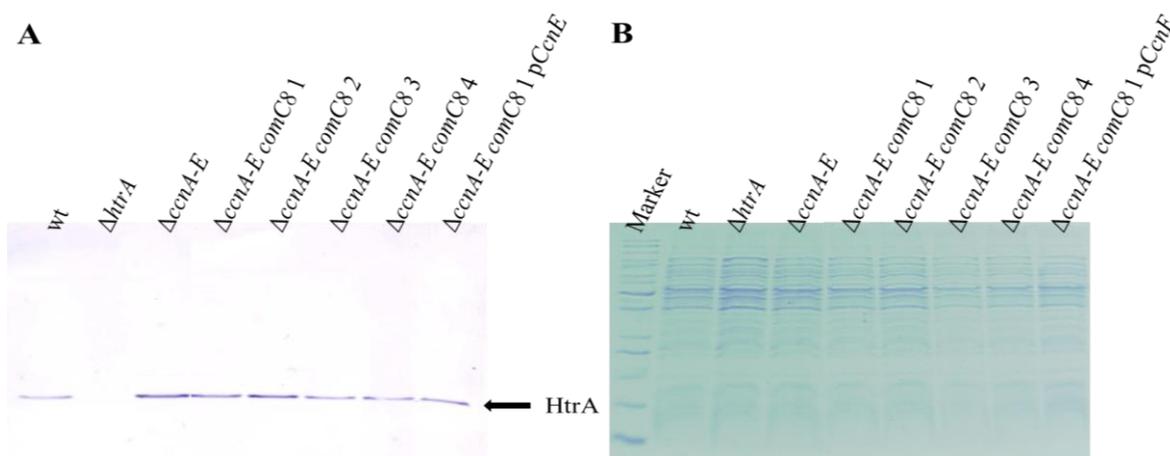
Sollte diese Instabilität nur durch das Fehlen der csRNA4 und csRNA5 zustande kommen, sollte eine Integration der csRNA5 in diesem Stamm zu einer ständigen Transformierbarkeit führen. Aus diesem Grund wurde die csRNA5 über das Plasmid p*CcnE* in diesen Stamm integriert und die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt (Abbildung 4.37, Tabelle 4.13).

In *S. pneumoniae* R6 *comC8* Δ *ccnABCDE* p*CcnE* konnte innerhalb von vier Messungen eine Aktivität von 89 Units, allerdings auch in zwei Messungen nur eine sehr geringe Aktivität von 23 Units nachgewiesen werden. Die Integration der positiv auf die Promotoren wirkende csRNA5 zeigt zwar eine leichte Stabilisierung dieses Stammes in Richtung Transformierbarkeit, allerdings ist dieser Effekt nicht ausreichend um eine vollständige Kompetenzentwicklung unter diesen Bedingungen zu garantieren.

Tabelle 4.13: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 *comC8* $\Delta ccnABCDE$ und seinen Derivaten in BHI.

<i>RKL-Nummer</i>	<i>Genetik</i>	β -Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung
750	$\Delta ccnABCDE$ <i>comC8</i>	12 \pm 2,9 (3X)
750	$\Delta ccnABCDE$ <i>comC8</i>	44 \pm 4,4 (7X)
750	$\Delta ccnABCDE$ <i>comC8</i>	115 \pm 0,1 (2X)
751	$\Delta ccnABCDE$ <i>comC8</i> <i>ccnD-C8c</i>	2,1 \pm 1
769	$\Delta ccnABCDE$ <i>comC8</i> p <i>CcnE</i>	23 \pm 2,5 (2X)
769	$\Delta ccnABCDE$ <i>comC8</i> p <i>CcnE</i>	89 \pm 0,9 (4X)

Einen weiteren Teil zu den beobachteten Schwankungen in diesen Stämmen könnte die Serinprotease HtrA beitragen. Schon in früheren Arbeiten konnte beobachtet werden, dass die Deletion aller csRNAs zu einer etwa zweifachen Aktivierung des CiaRH Systems führt (Müller, 2011). Hierdurch würde auch die Serinprotease HtrA stärker exprimiert werden, welche wiederum einen negativen Effekt auf die Kompetenzentwicklung ausübt. Ob die Serinprotease HtrA in dem csRNA-Deletionsstamm tatsächlich stärker exprimiert wird, sollte mithilfe eines Western Blots bestimmt werden.

**Abbildung 4.38: Western Blot Analyse zur Detektion von HtrA in den verwendeten *S. pneumoniae* R6 Derivaten.**

Gezeigt sind eine PVDF-Membran (A) und das entsprechende Coomassiegel (B) mit dem durch Western Blotting detektierten HtrA. Von links nach rechts sind die Stämme *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$, *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$, *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$ *comC8* (Kolonie 1), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$ *comC8* (Kolonie 2), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$ *comC8* (Kolonie 3), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$ *comC8* (Kolonie 4), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$ *comC8* (Kolonie 1) p*CcnE* dargestellt. Die untersuchten Stämme wurden in C+Y-Medium bei 37°C bis zu $OD_{600} = 0,4$ inkubiert und anschließend lysiert. Nach erfolgter elektrischer Auftrennung der Proteine in einem 10 %igen SDS-Gel wurden diese durch Elektrobloiting auf eine PVDF-Membran übertragen. Der primäre Antikörper (Anti-HtrA) wurde 1:30000 verdünnt, der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen) wurde ebenfalls in einer Verdünnung von 1:30000 eingesetzt. Die aufgetragene Lysatmenge entspricht einem Kulturvolumen von 125 μ l bei $OD_{600} = 0,7$. HtrA von *S. pneumoniae* R6 hat ein Molekulargewicht von ca. 42 kDa.

Wie in Abbildung 4.38 zu erkennen ist, kann tatsächlich eine stärkere HtrA Bande in den csRNA Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. Die Deletion aller csRNAs führt auch in diesem Fall zu einer Aktivierung des CiaRH Systems, wodurch die Menge an HtrA in diesen Stämmen erhöht wird. Allerdings ist eventuell ein geringer Unterschied zwischen den einzelnen *S. pneumoniae* R6 *comC8* Δ *ccnA-E* Stämmen zu erkennen. Es scheint so als enthielten die Kolonie 3 und Kolonie 4 des Stammes *S. pneumoniae* R6 *comC8* Δ *ccnA-E* und der Stamm *S. pneumoniae* R6 *comC8* Δ *ccnA-E* *pCcnE* eine etwas geringere HtrA Menge als die restlichen csRNA Deletionsstämme. Hierbei könnte es sich um einen weiteren Hinweis auf die in diesem Stamm beobachteten Schwankungen bezüglich seiner CiaRH Aktivität und Kompetenzentwicklung handeln. Allerdings ist ebenfalls nicht ausgeschlossen, dass es sich hierbei um ein technisches Problem handelt.

Bei den beobachteten Schwankungen in dem *comC8* csRNA Deletionsstammes scheint es sich tatsächlich um ein Zusammenspiel der csRNAs und HtrA zu handeln. Zum einen fehlt durch das Deletieren der csRNAs der negative Effekt auf die *comC*-Translation, aber auch der positive Effekt der csRNA4 und csRNA5 auf die frühen Kompetenzpromotoren P_{comC} und P_{comX} . Zum anderen kommt es zur Aktivierung des CiaRH Systems, wodurch die Menge an HtrA, welches wiederum negativ auf CSP wirkt, erhöht wird.

Das der hier beobachtete negative Effekt der komplementär veränderten *ccnD-C8c* auf die Kompetenzentwicklung tatsächlich durch eine Bindung an das veränderte *comC8*-Allel vermittelt wird, sollte im Folgenden mithilfe der *comC8*-Translationsfusion überprüft werden.

Hierzu wurde die veränderte *ccnD-C8c* in den Stamm eingebracht, welcher die *comC8*-Translationsfusion unter der Kontrolle des Promotors P_{vegT3} enthält und die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.39 und Tabelle 4.14 dargestellt.

Anhand des in Abbildung 4.39 dargestellten Ergebnisses ist deutlich zu erkennen, dass die Translation des *comC8* durch die Integration der veränderten *ccnD-C8c* stark reprimiert wird. Die Aktivität fällt von 183 Units in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 pTP_{vegT3} -*comC8* durch die Integration von *ccnD-C8c* auf 46 Units ab. Die *comC8*-Translation wird durch das Einbringen einer einzigen komplementär veränderten csRNA um das 4 fache erniedrigt. Wenn man bedenkt, dass es im Falle der Wildtyp *comC*-Translation durch alle csRNAs zu einer 7,8 fachen Reduktion der Translation kommt, ist der negative Effekt dieser einen komplementär veränderten csRNA sehr stark. Es wäre möglich, dass das Einbringen einer weiteren komplementär veränderten csRNA zu einer vollständigen Inhibierung der *comC8*-Translation führt.

Dass der beobachtete negative Effekt der veränderten *ccnD-C8c* auf die Entwicklung der Kompetenz durch einen stärkeren Effekt auf die *comC8*-Translation erfolgt, konnte hier klar gezeigt werden.

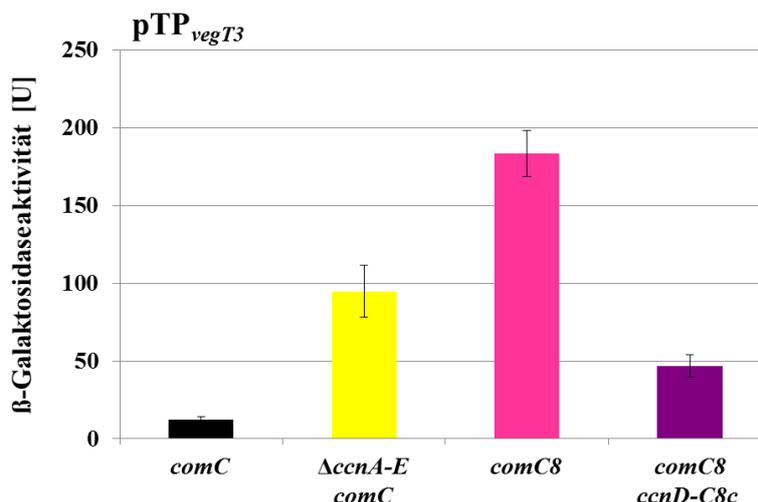


Abbildung 4.39: Durch das pTP_{vegT3}-*comC*- und das pTP_{vegT3}-*comC8''lacZ*-Translationsfusionsprotein vermittelte β-Galaktosidaseaktivität verschiedener *S. pneumoniae* R6 Derivate.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI bis zu einer OD₆₀₀ = 0,4. Die β-Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β-Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 pTP_{vegT3}*comC* (RKL507), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ pTP_{vegT3}*comC* (RKL762), *S. pneumoniae* R6 pTP_{vegT3}*comC8* (RKL770) und *S. pneumoniae* R6 pTP_{vegT3}*comC8 ccnD-C8c* (RKL771).

Tabelle 4.14: Durch das pTP_{vegT3}-*comC*- und das pTP_{vegT3}-*comC8''lacZ*-Translationsfusionsprotein vermittelte β-Galaktosidaseaktivität verschiedener *S. pneumoniae* R6 Derivate.

RKL-Nummer	Genetik	β-Galaktosidaseaktivität [U] ± Standardabweichung
507	pTP _{vegT3} - <i>comC</i>	12 ± 1,9
762	$\Delta ccnABCDE$ pTP _{vegT3} - <i>comC</i>	94 ± 16,6
770	pTP _{vegT3} - <i>comC8</i>	183 ± 14,8
771	pTP _{vegT3} - <i>comC ccnD-C8c</i>	46 ± 7,3

Außer der komplementierten csRNA4 wurden weitere Veränderungen an csRNA4 und csRNA1 vorgenommen. In csRNA4 wurden zwischen der Anti-Shine-Dalgarno und dem Anti-AUG zwei zusätzliche Adenin Nukleotide eingebracht, welche dazu führen, dass diese csRNA4 Variante in dieser Region vollständig mit der *comC* mRNA interagieren kann. Die Hybridisierung der beiden *ccnD*-Varianten, der Wildtyp *ccnD* und der veränderten *ccnD-AA* mit der *comC* mRNA ist in Abbildung 4.40 dargestellt.



Abbildung 4.40: Hybridisierung nach Zuker (Zuker, 2003) der *comC* mRNA mit der Wildtyp *ccnD* (A) und der veränderten *ccnD-AA* (B).

Dargestellt ist die, über das Programm Mfold berechnete, mögliche Hybridisierung der *comC* mRNA mit der Wildtyp *ccnD* und der veränderten *ccnD-AA*. Mögliche Basenpaarungen sind durch Balken zwischen den jeweiligen Basen angedeutet.

Des Weiteren wurde der Promotor der *csRNA1* so verändert, dass dieser eine perfekte extended -10 Region und einen perfekten CiaR-Repeat enthält. Hierdurch sollte die Aktivität des Promotors und somit der Effekt auf die *comC* mRNA verstärkt werden. Hier wurde die *csRNA1* gewählt, da diese zum einen die niedrigste Aktivität des Promotors P_{comX} in BHI vermittelt und zum anderen schon in früheren Studien als kompetenzinhibierend beschrieben wurde (Tsui *et al.*, 2010). Allerdings konnte in dieser Studie keine Bindung der *csRNA1* an die *comC* mRNA nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Arbeit konnte bereits ein negativer Effekt der *csRNA1* auf die *comC*-Translation nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt durch einen stärkeren Promotor erhöht wird (Abbildung 4.28). In Abbildung 4.41 sind die Veränderungen in der Promotorregion der *csRNA1* im Vergleich zur Wildtyp Sequenz dargestellt.

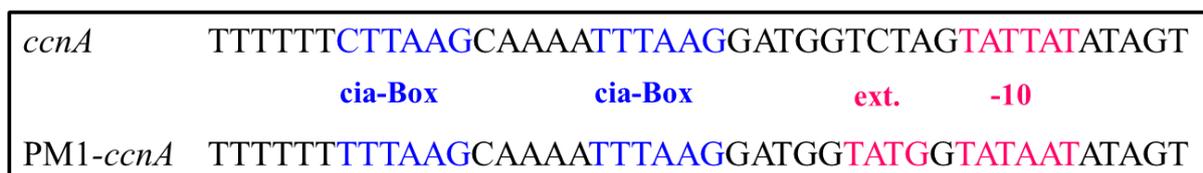


Abbildung 4.41: Vergleich der Sequenzen der Promotorregionen von *ccnA* und PM1-*ccnA*.

Dargestellt ist die Promotorregion der beiden Gene *ccnA* und PM1-*ccnA*. Blau markiert sind die Cia-Boxen, an welche CiaR bindet. In rot ist die -10 bzw. die perfekte extended -10-Region hinterlegt.

Diese beiden Veränderungen der *csRNA4* und der *csRNA1* wurden ebenfalls wie oben beschrieben in *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E \Delta htrA$ pPP_{comX} Derivate eingebracht und anschließend die β -Galaktosidaseaktivität in BHI bestimmt. Als Vergleich wurde jeweils die Aktivität des Stammes,

welcher die entsprechende csRNA in Wildtypform enthält, bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 4.42 und Tabelle 4.15 dargestellt.

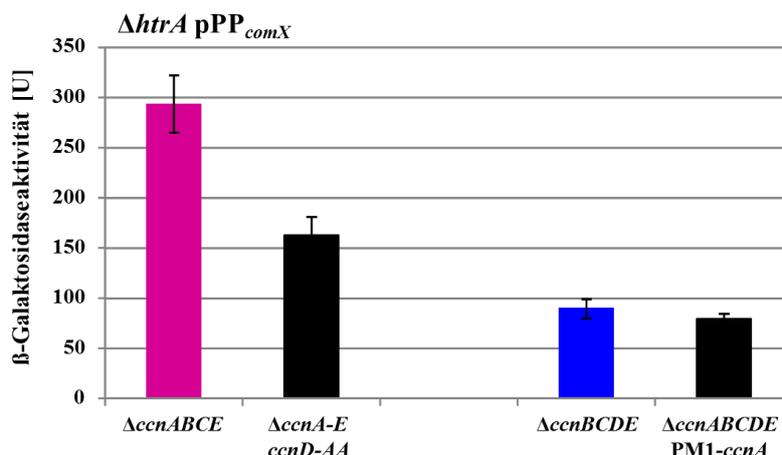


Abbildung 4.42: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ und seinen Derivaten in BHI.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCE$ $\Delta htrA$ pPP2 $comX$ (RKL707), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$ $\Delta htrA$ $ccnD-AA$ pPP2 $comX$ (RKL752), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnBCDE$ $\Delta htrA$ pPP2 $comX$ (RKL704), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $\Delta htrA$ PM1- $ccnA$ pPP2 $comX$ (RKL753).

Durch die Verbesserung des $ccnA$ Promotors ist kaum ein Unterschied in der Aktivität zu erkennen (Abbildung 4.42, Tabelle 4.15). Hier sinkt die Aktivität lediglich von 89 Units im Stamm mit Wildtyp $ccnA$ auf 78 Units im Stamm mit PM1- $ccnA$ ab. Allerdings ist in diesem Fall nicht klar, ob die Veränderungen in der Promotorregion der $ccnA$ tatsächlich zu einer stärkeren Expression dieser csRNA führen.

Im Gegensatz dazu wird durch das Einbringen zweier zusätzlicher Alanine in $ccnD$ der negative Effekt der csRNA4 auf die Kompetenzentwicklung deutlich verstärkt. Der Stamm, welcher die Wildtyp $ccnD$ enthält, zeigt eine Aktivität von 293 Units. Diese Aktivität fällt durch die Veränderung der csRNA4 in $ccnD-AA$ auf 162 Units ab. Zum einen könnte die Veränderung dazu führen, dass der negative Effekt der csRNA4 auf die $comC$ -Translation verstärkt wird. Zum anderen wäre es ebenfalls möglich, dass durch diese Veränderung der positive Effekt der csRNA4 auf die Promotoren erniedrigt wird.

Tabelle 4.15: Durch den Promotor P_{comX} vermittelte β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ und seinen Derivaten in BHI.

<i>RKL-Nummer</i>	<i>Genetik</i>	β -Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung
707	$\Delta ccnABCDE$	293 \pm 28,5
752	$\Delta ccnA-E$ <i>ccnD-AA</i>	162 \pm 18,5
704	$\Delta ccnBCDE$	89,8 \pm 9,3
753	$\Delta ccnABCDE$ PM1- <i>ccnA</i>	78,9 \pm 5,4

Um zwischen einem erhöhten negativen oder erniedrigten positiven Effekt von *ccnD-AA* unterscheiden zu können, wurde der Effekt der veränderten *ccnD-AA* auf die Translation von *comC* untersucht. Hierzu wurde diese veränderte csRNA in einen Stamm eingebracht, welcher eine *comC*-Translationsfusion enthält und die Aktivität im Vergleich zu dem Stamm mit unveränderter *ccnD* bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 4.43 und Tabelle 4.16 dargestellt.

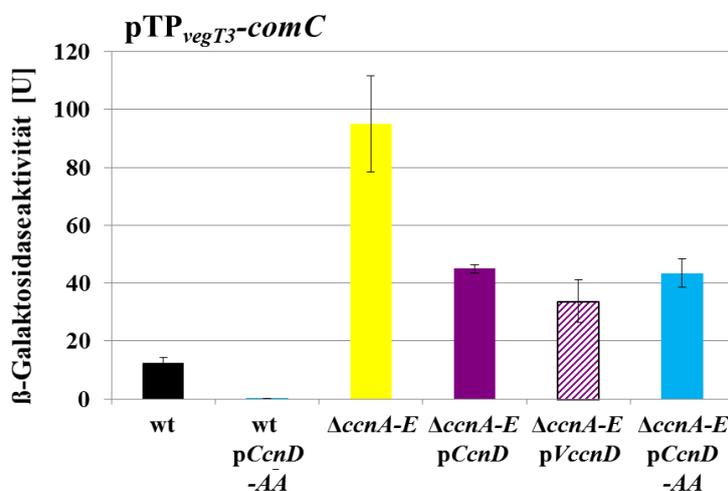


Abbildung 4.43: Durch das $pTP_{vegT3-comC}$ *lacZ*-Translationsfusionsprotein vermittelte β -Galaktosidaseaktivität verschiedener *S. pneumoniae* R6 Derivate.

Das Wachstum der untersuchten Stämme erfolgte in BHI bis zu einer $OD_{600} = 0,4$. Die β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Gesamtprotein. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen ermittelten Units (U), die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität von *S. pneumoniae* R6 $pTP_{vegT3-comC}$ (RKL507), *S. pneumoniae* R6 $pTP_{vegT3-comC}$ pCcnD-AA (RKL772), *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT3-comC}$ (RKL762), *S. pneumoniae* R6 $pTP_{vegT3-comC}$ pCcnD (RKL670), *S. pneumoniae* R6 $pTP_{vegT3-comC}$ pVccnD (RKL766) und *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCDE$ $pTP_{vegT3-comC}$ pCcnD-AA (RKL773).

In Abbildung 4.43 und Tabelle 4.16 ist deutlich zu erkennen, dass die Veränderungen in *ccnD-AA* nicht zu einer stärkeren Inhibition der *comC* Translation führen. Die beiden Stämme, in denen die unveränderte *ccnD* (*S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$ pCcnD) und die veränderte *ccnD-AA* (*S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$ pCcnD-AA) als einzige csRNAs vorliegen, zeigen mit 44 Units und 43 Units die gleiche

Aktivität. Eine etwas niedrigere Aktivität mit 33 Units ist in dem Stamm zu beobachten, der die unveränderte *ccnD* unter Kontrolle des stärkeren Promotors P_{vegT} exprimiert.

Im Gegensatz dazu führt das Einbringen der veränderten *ccnD-AA* in den Stamm *S. pneumoniae* R6 pTP_{vegT3-comC} zu einer Reduzierung der Aktivität von 12 Units (*S. pneumoniae* R6 pCcnD) auf 0,8 Units (*S. pneumoniae* R6 pCcnD-AA). Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass in diesem Stamm die veränderte csRNA als sechste csRNA vorliegt. Die beobachtete Reduktion könnte daher durch eine erhöhte Menge an csRNAs in diesem Stamm zustande kommen und nicht durch eine bessere Bindung der *ccnD-AA* an die *comC* mRNA.

Tabelle 4.16: Durch das pTP_{vegT3-comC}''lacZ-Translationsfusionsprotein vermittelte β -Galaktosidaseaktivität verschiedener *S. pneumoniae* R6 Derivate.

<i>RKL-Nummer</i>	<i>Genetik</i>	β -Galaktosidaseaktivität [U] \pm Standardabweichung
507	pTP _{vegT3-comC}	12 \pm 1,9
772	pTP _{vegT3-comC} pCcnD-AA	0,8 \pm 0,04
762	Δ ccnABCDE pTP _{vegT3-comC}	94 \pm 16,6
670	Δ ccnABCDE pTP _{vegT3-comC} pCcnD	44 \pm 1,3
766	Δ ccnABCDE pTP _{vegT3-comC} pVccnD	33 \pm 7,3
773	Δ ccnABCDE pTP _{vegT3-comC} pCcnD-AA	43,4 \pm 4,9

Die hier ermittelten Ergebnisse zeigen, dass der zuvor beobachtete stärkere negative Effekt der *ccnD-AA* auf die Entwicklung der Kompetenz (Abbildung 4.42) nicht durch eine stärkere Inhibition der *comC* Translation bewirkt wird. Daher ist es wahrscheinlich, dass der positive Effekt der unveränderten *ccnD* auf die frühen Kompetenzpromotoren P_{comC} und P_{comX} durch die Veränderungen in *ccnD-AA* beeinflusst wird. Da nicht bekannt ist, wie die csRNA4 und csRNA5 positiv auf die Promotoren verschiedener Kompetenzgene wirken, kann hier allerdings nur spekuliert werden.

Nachdem es in der vorliegenden Arbeit gelungen ist, *comC* als das kompetenzspezifisches Zielgen der csRNAs zu identifizieren und auch einige Bereiche identifiziert wurden, die für die Hybridisierung von Bedeutung sind, stellte sich immer noch die Frage nach dem β -Laktam spezifischen Zielgen der csRNAs.

Da eine bioinformatische Zielgensuche hier keine brauchbaren Hinweise auf ein mögliches Zielgen zeigte, sollte in diesem Fall ein anderer Ansatz zur Identifikation des Zielgenes angewandt werden. Im nächsten Teil dieser Arbeit wurden daher globale Transkriptomanalysen einiger Stämme mit unterschiedlichem Resistenzphänotyp durchgeführt.

4.6 Identifikation des β -Laktamresistenz spezifischen Zielgenes mittels globaler Transkriptomanalyse

4.6.1 Globale Transkriptomanalyse von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202*

In der ersten in dieser Arbeit durchgeführten globalen Transkriptomanalyse sollte der Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* mit dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* verglichen werden. Beide Stämme enthalten das hyperaktive *ciaH202*-Allel. Allerdings zeigt nur der Stamm, welcher die csRNAs enthält einen deutlichen Anstieg der β -Laktamresistenz. Diese Resistenz bricht nach Deletion der csRNAs zusammen. Mögliche Zielgene sollten so anhand von Unterschieden in der RNA Menge identifiziert werden. Hierbei ist allerdings die Voraussetzung, dass die mRNA Menge durch das Binden der csRNAs betroffen ist und dadurch die mRNA Menge vermindert wird. Eine Vorselektion auf ein hyperaktives *ciaH202*-Allel auf einer erhöhten Cefotaximkonzentration war in diesem Fall nicht möglich, da der csRNA Deletionsstamm trotz hyperaktivem *ciaH202*-Allel keine erhöhte Resistenz aufwies (siehe 4.1.1). Bei der Auswertung dieses Versuchs fiel auf, dass es in dem csRNA Deletionsstamm wieder zu Zusatzmutationen kam, welche CiaR inaktivierten. Da aber die csRNA Regulation ebenfalls innerhalb dieser Daten zu finden sein sollte, wurde die globale Transkriptomanalyse trotzdem ausgewertet. Hierbei handelt es sich daher nun um einen Vergleich zwischen *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* und *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaR*. Die Ergebnisse dieser Transkriptomanalyse sind in den Abbildungen Abbildung 4.44; Abbildung 4.45, Abbildung 4.46, Abbildung 4.47 und den Tabellen 4.17, 4.18 und 4.19 aufgelistet. Zur besseren Übersicht wurden sie unterteilt in Gene, welche in der Kompetenzentwicklung involviert sind, (Peterson *et al.*, 2004; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004) (Abbildung 4.44, Tabelle 4.17) und Gene, die von CiaR-reguliert werden (Halfmann *et al.*, 2007b) (Abbildung 4.45, Tabelle 4.18). Gene, die weder der Kompetenz noch der CiaR-Regulation angehören, bei welchen aber ebenfalls ein Unterschied in der Transkriptmenge festgestellt wurde, wurden auf Grund der Vielzahl in zwei separaten Abbildungen dargestellt (Abbildung 4.46, Abbildung 4.47, Tabelle 4.19).

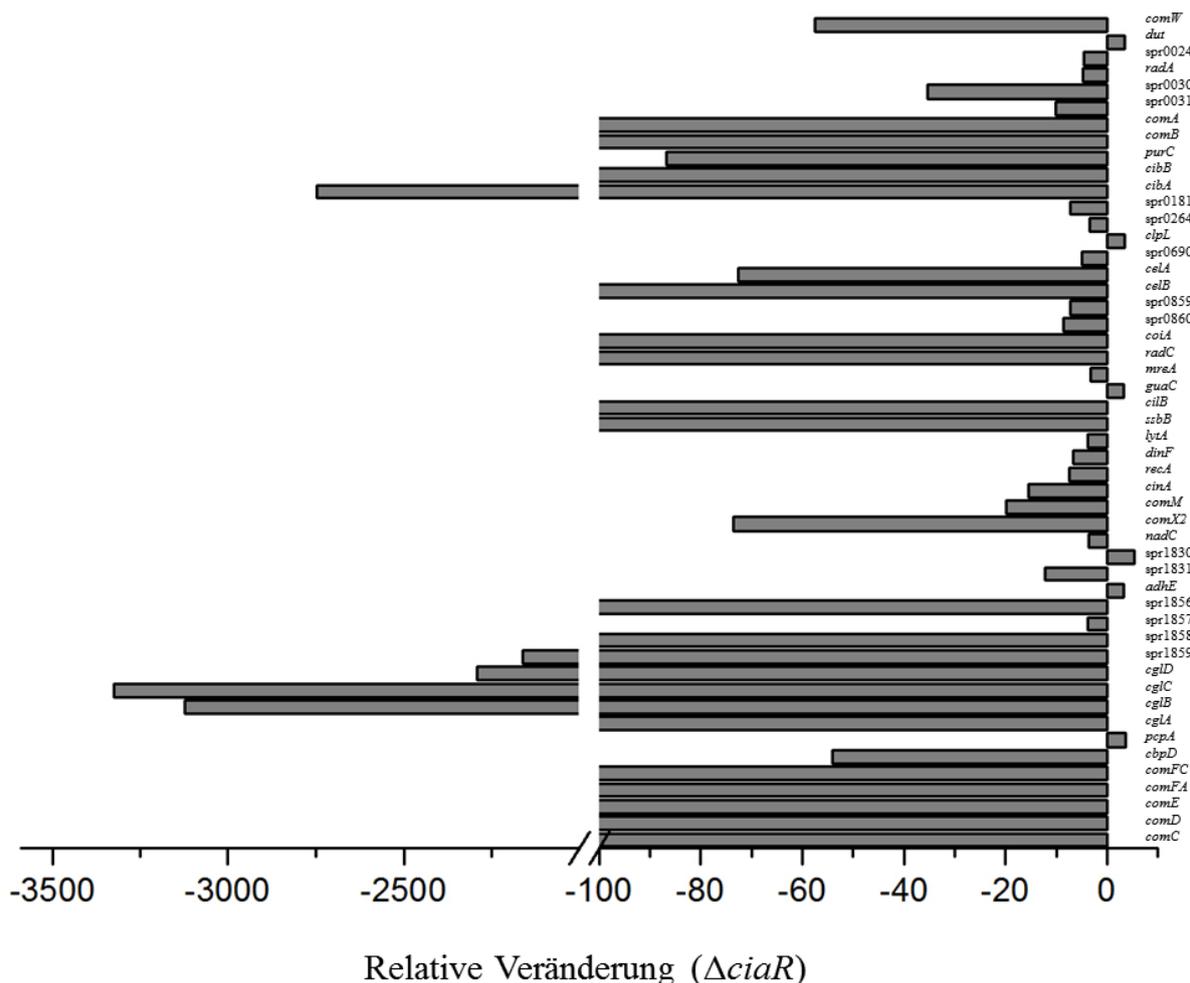


Abbildung 4.44: Relative Veränderung der in der Kompetenz involvierter Gene der globalen Transkriptomanalyse von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* gegen *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaR$.

Dargestellt ist die relative Veränderung der nach Peterson und Dagkessamanskaia (Peterson *et al.*, 2004; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004) in die Kompetenz involvierten Gene von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaR$ mit einem mindestens 3fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 3$ oder $\leq 0,33$) und einem P-Wert unter 0,05 (5%). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C+Y-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,4$ gewonnen. Es wurde das R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinatensachse sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Proteinen) aufgetragen. Die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tabelle 4.17 aufgelistet. Die Expression der rot markierten Gene wurde auf Grundlage dieser Transkriptomanalyse näher untersucht.

In Abbildung 4.44 ist deutlich zu erkennen, dass die Kompetenz in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaR$ stark reprimiert ist. Der Großteil der Kompetenzgene wird in diesem Stamm um mehr als das 100 fache niedriger transkribiert. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Stamm in C+Y-Medium keine Kompetenz entwickelt (Müller *et al.*, 2011). Bei den beiden Genen *dut* (spr0023) und *clpL* (spr0307) handelt es sich ebenfalls um beschriebene Kompetenzgene, allerdings sind sie in dieser Transkriptomanalyse

nicht reprimiert, sondern leicht aktiviert. Beide Gene werden in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* um das 3,4 fache stärker transkribiert als in *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaR*.

Tabelle 4.17: Relative Veränderung und Funktion, der in der Kompetenz involvierter Gene der globalen Transkriptomanalyse von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* gegen *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaR*.

<i>Gene</i>	<i>Relative Veränderung</i>	<i>Funktion</i>
<i>comW</i>	-57,59	ComW
<i>dut</i>	3,44	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase
spr0024	-4,61	hypothetisches Protein
<i>radA</i>	-4,83	RadA , DNA Reparatur-Protein
spr0030	-35,47	hypothetisches Protein
spr0031	-10,02	hypothetisches Protein
<i>comA</i>	-301,63	ComA
<i>comB</i>	-266,45	ComB
<i>purC</i>	-86,67	PurC, Phosphoribosylaminoimidazol- Succinat Carboxamid-Synthetase
<i>cibB</i>	-1250,13	CibB
<i>cibA</i>	-2746,95	CibA
spr0181	-7,33	orf47
spr0264	-3,44	Xanthine/Uracil/Vitamin C Permease
<i>clpL</i>	3,44	clpL
spr0690	-4,93	hypothetisches Protein
<i>celA</i>	-72,65	CelA
<i>celB</i>	-1274,45	CelB
spr0859	-7,17	hypothetisches Protein
spr0860	-8,56	hypothetisches Protein
<i>coiA</i>	-185,22	CoiA
<i>radC</i>	-472,77	RadC, DNA Reparatur-Protein
<i>mreA</i>	-3,27	MreA, Macrolide-Efflux Protein
<i>guaC</i>	3,12	GuaC, GMP Reduktase
<i>cilB</i>	-1236,19	DprA
<i>ssbB</i>	-570,68	SsbB
<i>lytA</i>	-3,85	LytA, Autolysin, N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase
<i>dinF</i>	-6,80	DinF, durch DNA Schäden induziertes Protein
<i>recA</i>	-7,51	RecA, DNA Recombination/Reparatur
<i>cinA</i>	-15,52	CinA
<i>comM</i>	-19,93	ComM
<i>comX2</i>	-73,49	ComX2
<i>nadC</i>	-3,65	NadC, hypothetische Nicotinate-Nukleotid Pyrophosphorylase
spr1830	5,40	konserviertes putative integrales Membranprotein
spr1831	-12,22	hypothetisches Protein
<i>adhE</i>	3,22	AdhE, Alkohol-Acetal-Dehydrogenase
spr1856	-188,65	hypothetisches Protein
spr1857	-3,94	hypothetisches Protein
spr1858	-456,95	hypothetisches Protein
spr1859	-2161,97	Im Zusammenhang mit ComYD
<i>cglD</i>	-2291,32	CglD
<i>cglC</i>	-3323,35	CglC
<i>cglB</i>	-3122,98	CglB
<i>cglA</i>	-286,72	CglA C
<i>pcpA</i>	3,57	PcpA Cholin-bindendes Protein
<i>cbpD</i>	-54,11	CbpD, Cholin-bindendes Protein D

<i>comFC</i>	-1143,15	ComFC
<i>comFA</i>	-478,48	ComFA
<i>comE</i>	-172,79	ComE
<i>comD</i>	-391,91	ComD
<i>comC</i>	-144,50	Kompetenz stimulierendes Peptid (CSP)

Das späte Kompetenzgen Gen *dut*, welches für eine Deoxyuridin-5'-triphosphat-Nukleotidhydrolase kodiert, ist an der Uracil Verwertung, welches auch für die Kapselsynthese benötigt wird, beteiligt. *Dut* katalysiert die Hydrolyse von dUTP in dUMP. Dieses dUMP wird anschließend über verschiedene Enzyme zum DNA-Vorläufer Nukleotid dTTP umgewandelt (Ting *et al.*, 2008). Es liegt im Genom direkt downstream der 4,5S scRNA (siehe 2.5). Die 4,5 S scRNA reguliert die Expression und Sekretion von Virulenzfaktoren in *S. pyogenes* (Trevino *et al.*, 2010). Eine Veränderung der scRNA Transkription könnte sich daher zum einen auf die Virulenz auswirken und gleichzeitig die Transkription des *dut* Genes beeinflussen. Die Menge an scRNA wurde mittels Northern Blot in allen beim β -Laktamresistenztest verwendeten Stämmen bestimmt. Hierbei konnten keine Veränderungen in der scRNA Menge detektiert werden.

Eine weitere Gengruppe, welche in den beiden getesteten Stämmen eine unterschiedliche Expression aufweist, sind die Gene des *CiaR*-Regulons. Durch β -Galaktosidase-Assays konnte bereits in früheren Studien eine etwa 14 fache Erhöhung deren Expression nachgewiesen werden (Müller *et al.*, 2011). Die relativen Veränderungen der RNA Menge dieser Gene sind in Abbildung 4.45 und Tabelle 4.18 aufgeführt.

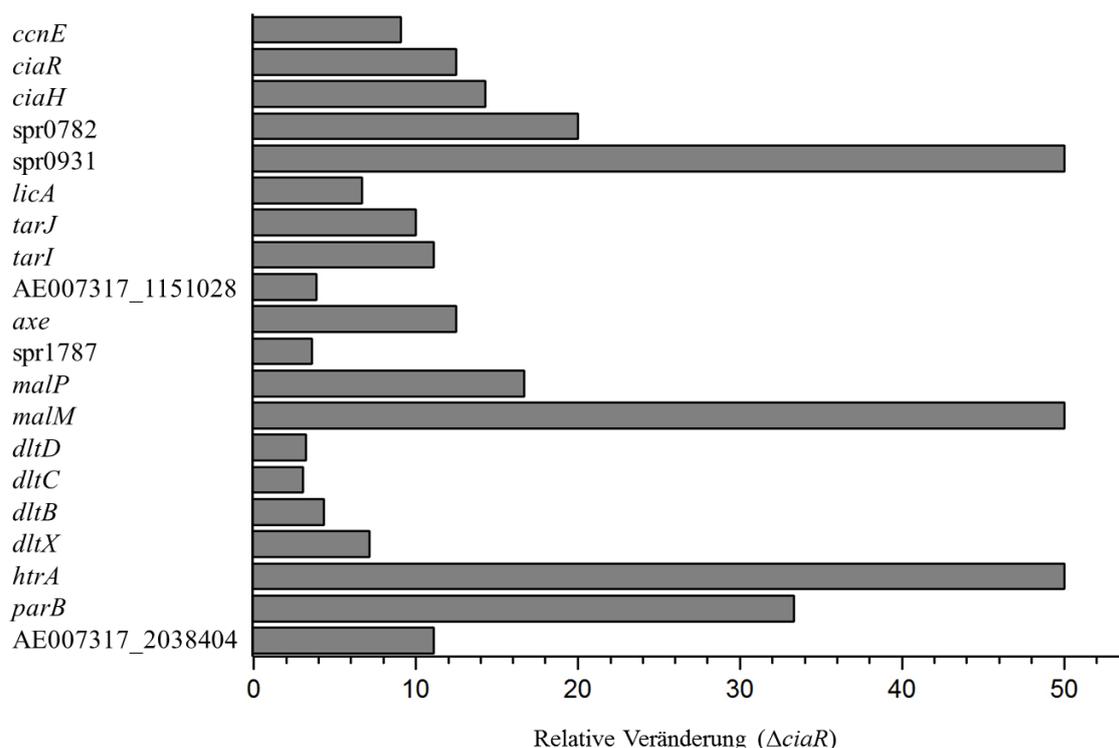


Abbildung 4.45: Relative Veränderung der *CiaR*-regulierten Gene der globalen Transkriptomanalyse von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* gegen *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaR*.

Dargestellt ist die relative Veränderung der CiaR-regulierten Gene nach Halfmann (Halfmann *et al.*, 2007b) von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaR* mit einem mindestens 3fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 3$ oder $\leq 0,33$) und einem P-Wert unter 0,05 (5%). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C+Y-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,4$ gewonnen. Es wurde das R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinatenachse sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Proteinen) aufgetragen. Die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tabelle 4.18 aufgelistet.

Der Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* enthält ein hyperaktives CiaRH System, im Vergleichsstamm wurde das CiaRH System durch Deletion von *ciaR* inaktiviert. Die meisten CiaR-regulierten Gene konnten in dieser Transkriptomanalyse nachgewiesen werden. Allerdings fehlen die Gene der csRNAs 1-4 *ccnA-D*, *ppmA* und *manNML*. Im Falle der csRNA1-4 ist es wahrscheinlich, dass diese während der RNA-Isolierung, welche nicht spezifisch für kleine RNAs geeignet ist, nicht mit extrahiert wurden. CsRNA5 ist die Größte der csRNAs und konnte daher isoliert werden. Die Transkriptmenge spricht allerdings nicht für ein Gen, welches zu den am stärksten von CiaR regulierten Genen gehört. Die Transkriptmenge ist lediglich um das 9 fache in dem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System erhöht. Im Gegensatz dazu ist die HtrA Transkriptmenge um das 50 fache erhöht. Hierbei könnte es sich auch um ein Problem bei der Isolierung handeln, welche wie schon erwähnt, nicht sehr gut für kleine RNA-Fragmente geeignet ist.

Tabelle 4.18: Relative Veränderung und Funktion, der CiaR-regulierten Gene der globalen Transkriptomanalyse von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* gegen *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaR*.

<i>Gene</i>	<i>Relative Veränderung</i>	<i>Funktion</i>
<i>ccnE</i>	9,09	csRNA5
<i>ciaR</i>	12,50	CiaR
<i>ciaH</i>	14,28	CiaH
<i>spr0782</i>	20,00	hypothetischesProtein
<i>spr0931</i>	50,00	hypothetischesProtein
<i>licA</i>	6,66	LicA, Choline kinase
<i>tarJ</i>	10,00	TarJ
<i>tarI</i>	11,11	TarI
AE007317_1151028	3,84	vor TarI, Zwischen den beiden Promotoren
AE007317_2038404	3,22	Nach <i>ppmA</i> , Terminator downstream
<i>axe</i>	12,50	Axe; Acetylesterase
<i>spr1787</i>	3,57	hypothetischesProtein
<i>malP</i>	16,67	MalP, Maltose Phosphorylase
<i>malM</i>	50,00	MalM, Amylomaltase
<i>dltD</i>	3,22	DltD, Beteiligt an Ligation Dcp-D-Alanin
<i>dltC</i>	3,03	DltC, D-Alanyl-Carrierprotein
<i>dltB</i>	4,34	DltB, Transportprotein
<i>dltX</i>	7,14	DltX, Konservierte hyp. Protein
<i>htrA</i>	50,00	HtrA
<i>parB</i>	33,33	ParB

Das Gen *ppmA* und die am Zellwandmetabolismus beteiligten Gene *licBC* zeigen eine erhöhte Transkriptmenge in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* mit einem guten bzw. sehr guten P-Wert von 0,02

(*ppmA*) und 0,00 (*licBC*). Allerdings ist diese Veränderung der Transkriptmenge lediglich zwischen 2,2 und 2,9 fach und fällt somit aus der Analyse, da nur AVG Werte ≥ 3 und $\leq 0,33$ einbezogen werden.

Bei dem *manNML*-Operon handelt es sich um den einzigen, von CiaR negativ regulierten Promotor. Diese negative Regulation lässt sich an einer um das 2,4 fache erniedrigten Transkriptmenge in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* mit einem sehr guten P-Wert von 0,00 beobachten. Aber auch hier ist die Veränderung der RNA Menge zu gering um in die Analyse mit einbezogen zu werden.

Auch wenn diese Werte nicht in diese Analyse mit einbezogen werden, spiegeln sie doch die positive bzw. negative Regulation dieser Gene durch den Response Regulator CiaR wieder.

Die hier aufgeführten Oligos in den Intergenenbereichen AE007317_1151028 und AE007317_2038404 liegen zum einen vor dem CiaR-regulierten Gen *traI*, zwischen beiden Promotoren und zum anderen downstream von dem CiaR-regulierten Gen *parB*, daher kommt es hier zu veränderten RNA-Mengen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nahezu für alle Gene des CiaR-Regulons innerhalb dieser Transkriptomanalyse eine Veränderung in der RNA Menge nachgewiesen wurde. Auch die Unterschiede zwischen einem stark CiaR abhängigen Gen wie *htrA* mit einer 50 fachen Erhöhung und einem nur leicht aktivierten Gen wie *dltC*, mit einer lediglich um das 3,03 fache erhöhten RNA Menge, sind gut zu beobachten.

Anhand dieser globalen Transkriptomanalyse konnte die Repression der natürlichen Kompetenz und die Genregulation durch CiaR in dem Stamm mit hyperaktivem CiaH202-Allel deutlich beobachtet werden.

Da davon auszugehen ist, dass das oder die β -Laktam spezifischen Zielgene der csRNAs weder mit der Kompetenz in Verbindung stehen noch direkt von CiaR reguliert werden, sollten im Anschluss die übrigen Gene, für welche eine unterschiedliche RNA Menge identifiziert wurde, zusammengefasst werden.

Die Abbildungen 4.46. 4.47 zeigen die Gene, die weder der Kompetenz noch dem CiaR-Regulon zugeordnet werden, für die jedoch eine veränderte Transkriptmenge identifiziert wurde. Der Vergleich des Transkriptionsprofils der beiden Stämme *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* und *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaR* zeigt einige Gene, deren mRNA Menge in den beiden Stämmen unterschiedlich ist. Aufgrund der Vielzahl wurden diese der Reihenfolge nach in zwei Graphiken aufgeteilt. Die Funktionen der einzelnen Gene, falls bekannt, sind in Tabelle 4.19 mit aufgeführt.

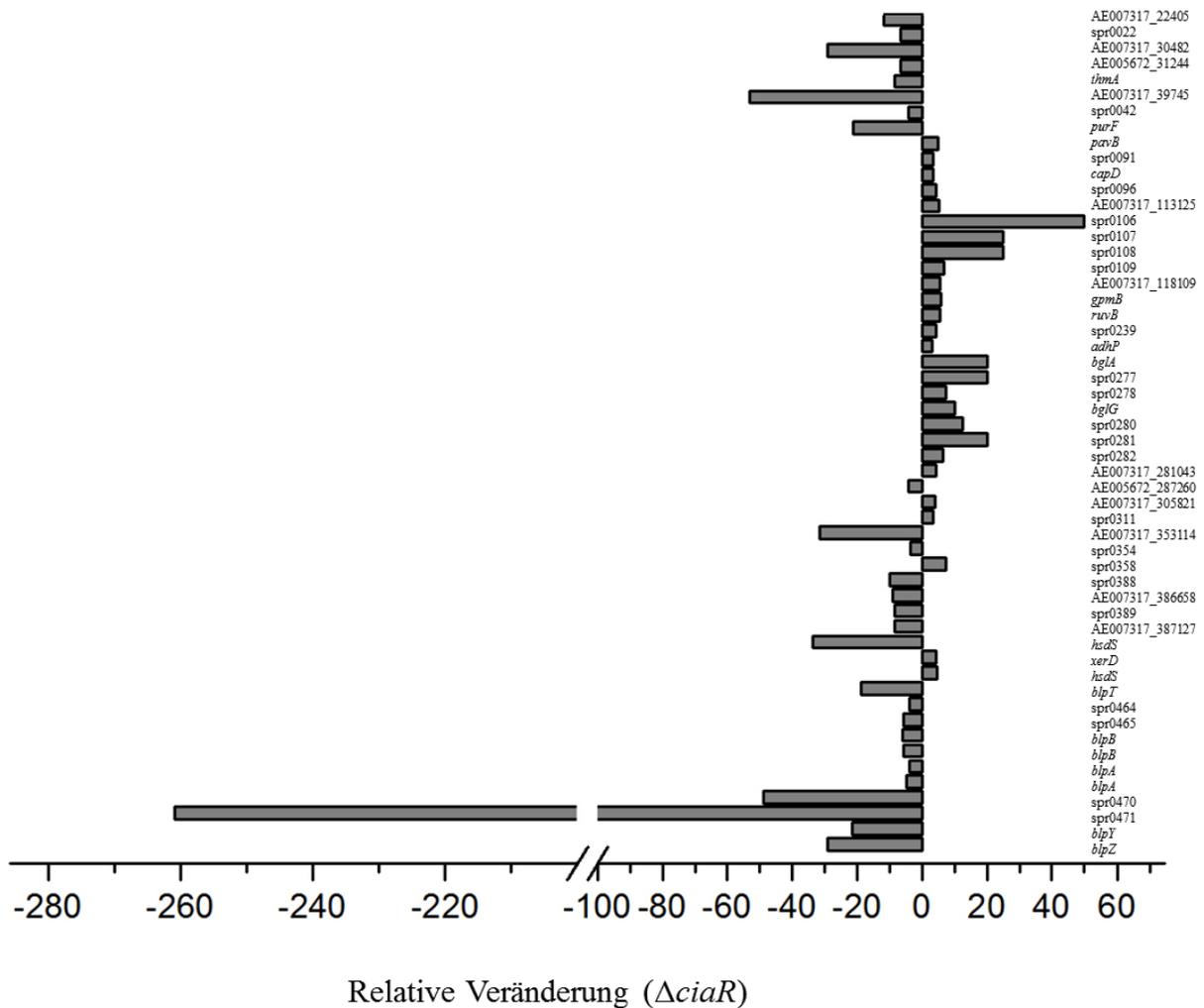


Abbildung 4.46: Relative Veränderung von Genen der globalen Transkriptomanalyse von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* gegen *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaR$.

Dargestellt ist die relative Veränderung der Gene von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaR$ mit einem mindestens 3fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnis ($AVG \geq 3$ oder $\leq 0,33$) und einem P-Wert unter 0,05 (5%). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C+Y-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,4$ gewonnen. Es wurde das R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinatenachse sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Proteinen) aufgetragen. Die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tabelle 4.19 aufgelistet. Die Expression der rot markierten Gene wurde auf Grundlage dieser Transkriptomanalyse näher untersucht.

Die Abbildung 4.47 zeigt den zweiten Teil der Gene, welche Unterschiede in der RNA Menge innerhalb der beiden getesteten Stämme zeigen.

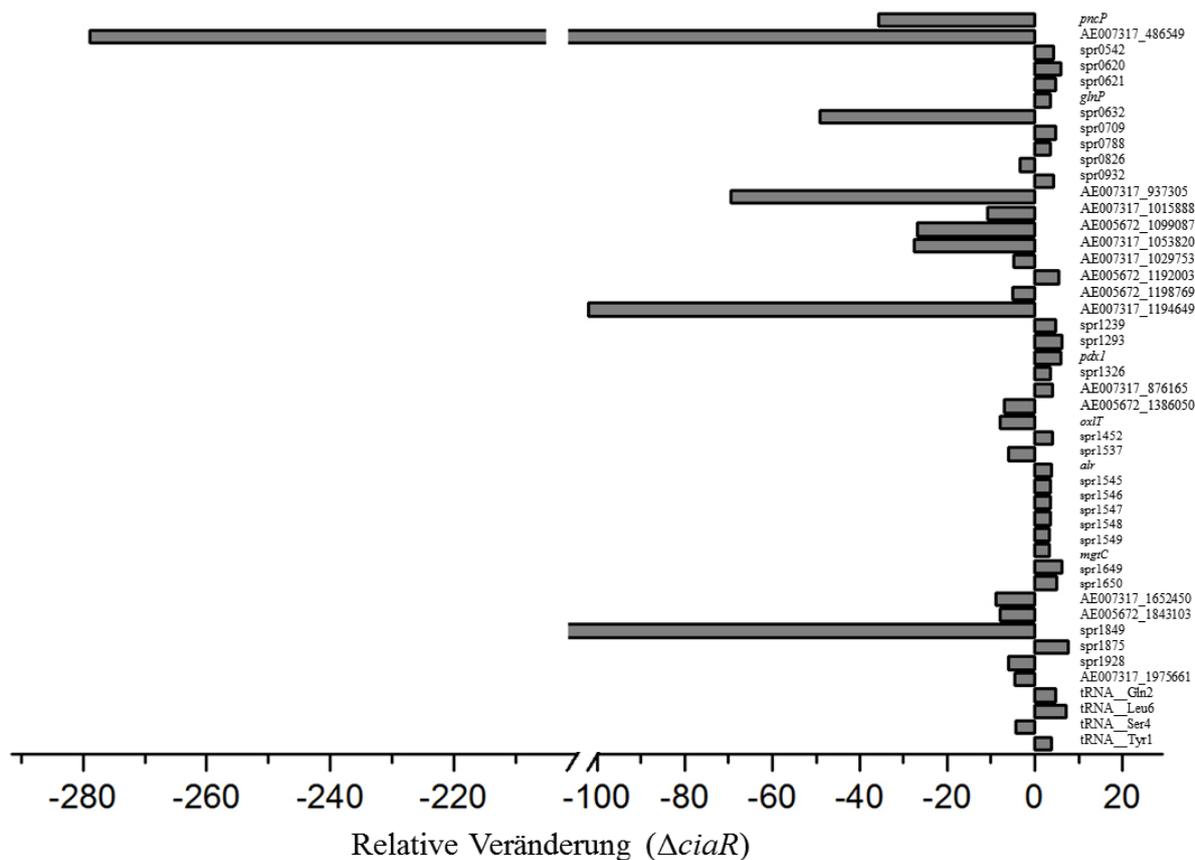


Abbildung 4.47: Relative Veränderung von Genen der globalen Transkriptomanalyse von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* gegen *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaR$.

Dargestellt ist die relative Veränderung der Gene von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaR$ mit einem mindestens 3fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengeverhältnis ($AVG \geq 3$ oder $\leq 0,33$) und einem P-Wert unter 0,05 (5%). Die zur Transkriptomanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C+Y-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,4$ gewonnen. Es wurde das R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinatenachse sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Proteinen) aufgetragen. Die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tabelle 4.19 aufgelistet. Die Expression der rot markierten Gene wurde auf Grundlage dieser Transkriptomanalyse näher untersucht.

Die Funktionen der einzelnen innerhalb der globalen Transkriptomanalyse identifizierten Gene, falls bekannt, sind in Tabelle 4.19 mit aufgeführt.

Tabelle 4.19: Relative Veränderung und Funktion von Genen der globalen Transkriptomanalyse von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* gegen *S. pneumoniae* R6 $\Delta ciaR$.

Gene	Relative Veränderung	Funktion
AE007317_22405	-11,98	Zwischen <i>comW</i> und <i>purA</i>
spr0022	-6,70	Cytidine/Deoxycytidylatdeaminase
AE007317_30482	-28,98	zwischen spr0030 und spr0031, komplementärer Strang
AE005672_31244	-6,79	zwischen spr0031 und spr0032, komplementärer Strang
<i>thmA</i>	-8,41	Bacteriocin-ähnliche amphipathische porenbildende Peptidvorstufe
AE007317_39745	-53,17	zwischen spr0040 und spr0041
spr0042	-4,36	IS1167 Transposase (<i>orf1</i>), komplementärer

<i>purF</i>	-21,35	Strang PurF, Amidophosphoribosyl transferase
<i>pavB</i>	4,76	PavB, Fibronectin-bindend
spr0091	3,44	hypothetische Zuckertransferase, LTA Vorläufer Synthese
<i>capD</i>	3,44	CapD, LTA Vorläufer Synthese
spr0096	4,34	LysM Domainen Proteinn
AE007317_113125	5,26	zwischen spr0104 und spr0105
spr0106	50,00	ABC Transporter, Bacteriocin Exporter
spr0107	25,00	hypothetisches Protein
spr0108	25,00	Involviert im Bacteriocin Export
spr0109	6,66	hypothetisches Protein
AE007317_118109	5,55	zwischen spr0190 und spr0110
<i>gpmB</i>	5,88	GpmB, Phosphoglycerate Mutase 2 Paralog
<i>ruvB</i>	5,55	RuvB,
spr0239	4,34	hypothetisches Protein
<i>adhP</i>	3,03	AdhP, Alkohol Dehydrogenase
<i>bglA</i>	20,00	BglA, 6-Phospho-beta-Glukosidase
spr0277	20,00	hypothetisches Protein
spr0278	7,14	PTS-EII hypothetische PTS Zucker-spezifische EII Komponente
<i>bglG</i>	10,00	BglG, hypothetischer transkriptions Antiterminator
spr0280	12,50	PTS-EII Zucker-spezifische EII Komponente
spr0281	20,00	hypothetisches Protein
spr0282	6,25	PTS-EII verwandt mit transkriptionalen Regulatoren
AE007317_281043	4,16	zwischen spr0282 und spr0283
AE005672_287260	-4,08	zwischen spr0285 und spr0286, komplementärer Strang
AE007317_305821	3,84	zwischen <i>mraY</i> und spr0306
AE007317_353114	-31,52	IS1381, zwischen spr0355 und spr0354
spr0354	-3,54	IS861 degenerierte Transposase (orf2)
spr0388	-10,08	hypothetisches Protein
AE007317_386658	-9,11	zwischen spr0388 und spr0389
spr0389	-8,36	hypothetisches Protein
AE007317_387127	-8,66	zwischen spr0389 und spr0390
<i>hsdS</i>	-33,60	HsdS, Typ I Restriktionsenzyme
<i>xerD</i>	4,16	XerD, Integrase/Rekombinase
<i>hsdS</i>	4,54	HsdS, Typ I -spezifische Deoxyribonuklease
<i>blpT</i>	-18,86	BlpT
spr0464	-3,80	BlpH, Histidinekinase 13
spr0465	-5,85	BlpC, Bacteriocin-ähnliches Peptid
<i>blpB</i>	-5,99	BlpB
<i>blpA</i>	-4,70	BlpA
spr0470	-48,96	hypothetisches Protein
spr0471	-260,84	hypothetisches Protein
<i>blpY</i>	-21,69	BlpY
<i>blpZ</i>	-29,13	BlpZ
<i>pncP</i>	-33,41	PncP, hypothetischer ABC Transporter ATP- binde Protein
AE007317_486549	-269,43	zwischen spr0484 und spr0485
spr0542	4,00	hypothetisches Protein
spr0620	5,55	hypothetisches Protein
spr0621	4,34	hypothetisches Protein
<i>glnP</i>	3,22	GlnP, hypothetischer ABC Transporter,

spr0632	-46,06	Membrane-Permease ABC-NBD hypothetischer ABC Transporter, ATP-bindendes Protein - Kationen Transport
spr0690	-4,93	hypothetisches Protein
spr0709	4,54	hypothetisches Protein
spr0788	3,44	hypothetisches Protein
spr0826	-3,16	hypothetisches Protein
spr0932	4,00	Ähnlich zu RNA Methyltransferase, konserviertes hypothetisches Protein
AE007317_937305	-65,21	vielleicht kleines orf
AE007317_1015888	-10,15	zwischen spr1032 und spr1033
AE007317_1029753	-4,52	zwischen spr1143 und spr1042
AE005672_1099087	-25,07	zwischen spr1049 und spr1050, komplementärer Strang
AE007317_1053820	-25,77	zwischen spr1059 und spr1060, komplementärer Strang
AE005672_1192003	5,26	komplementärer Strang zu spr1138
AE005672_1198769	-4,80	zwischen sr1143 und <i>dprA</i> , komplementärer Strang
AE007317_1194649	-95,56	zwischen spr1197 und spr1198
spr1293	4,34	ABC-NBD hypothetischer ABC Transporter, ATP-bindendes Protein -
<i>pdx1</i>	5,88	Pdx1, Pyridoxin Biosynthese Protein
spr1326	5,55	hypothetisches Protein
AE007317_876165	3,22	downstream von <i>ppmA</i> , Terminator downstream
AE005672_1386050	3,70	zwischen spr1326 und spr1327
<i>oxlT</i>	-6,52	OxlT, Oxalate-Formate Antiporter
spr1452	-7,54	hypothetisches Protein
spr1537	3,84	hypothetisches Protein
<i>alr</i>	-5,54	Alr, Alanine Racemase
spr1545	3,57	hypothetisches Protein
spr1546	3,33	ABC-NBD hypothetischer ABC Transporter ATP-bindendes Protein
spr1547	3,44	hypothetisches Protein
spr1548	3,22	hypothetisches Protein
spr1549	3,12	hypothetisches Protein
<i>mgtC</i>	3,03	MgtC, hypothetischer Mg(2+) Transporter ATPase/Permease
spr1649	5,88	hypothetischer transkriptionaler Regulator (phoU ähnlich)
spr1650	4,76	hypothetisches Protein
AE007317_1652450	-8,38	zwischen spr1680 und spr1681, komplementärer Strang
AE005672_1843103	-7,45	zwischen DinF und RecA, komplementärer Strang
spr1928	-5,58	hypothetisches Protein
AE007317_1975661	-4,24	zwischen spr1983 und spr1984, komplementärer Strang

Aufgrund dieser globalen Transkriptomanalyse wurden einige Gene genauer untersucht.

Zum einen handelt es sich dabei um Gene deren RNA Menge in dem Stamm mit hyperaktiven *ciaH202*-Allel im Vergleich zum Δ *ciaR* Stamm reduziert ist. Hierbei könnte es sich um mögliche Zielgene der csRNAs handeln, deren Translation durch die csRNAs negativ beeinflusst wird. Daher

wäre die Expression in dem Stamm mit *ciaH202*-Allel, welcher eine erhöhte Menge an csRNAs enthält, erniedrigt. Die Komplementarität dieser Gene und der csRNAs wurde mithilfe des Programms IntraRNA berechnet und die Bindungsenergie bestimmt. Die stärksten potentiellen Bindungsenergien konnten für die Gene *spr0022* ($\Delta G = -16,9$), *thmA* ($\Delta G = -15,6$), *spr0264* ($\Delta G = -19,4$) und *oxlT* ($\Delta G = -16,1$) berechnet werden. Aufgrund dieser hohen Bindungsenergien wurde in weiteren Studien eine mögliche Regulation dieser Gene durch die csRNAs untersucht.

Das Gen *spr0264* (Abbildung 4.39, Tabelle 4.14) wird als bei der Kompetenz reprimiert beschrieben (Peterson *et al.*, 2004, Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Daher sollte es in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202*, in welchem die Kompetenz reprimiert ist im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaR*, aktiviert sein. Allerdings ist es in dieser Transkriptomanalyse genau wie andere Kompetenzgene reprimiert. Die Transkriptmenge ist in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* um das 3,4 fache erniedrigt zum Vergleichsstamm. Tatsächlich konnte in weiteren Versuchen gezeigt werden, dass *spr0264* ein Zielgen der csRNAs darstellt, welche in dem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System stark exprimiert werden (Dersidan, 2013).

Für das Gen *oxlT* (Abbildung 4.42), welches für einen Oxalat-Format-Antiporter kodiert (Tabelle 4.16), konnte ebenfalls eine deutliche Regulation durch die csRNAs nachgewiesen werden (Dersidan, 2013).

Im Fall des Gens *thmA* konnte eine 8,4 fache niedrigere Menge an mRNA in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* nachgewiesen werden (Abbildung 4.41, Tabelle 4.16). Hier gibt es Hinweise auf eine negative Wirkung der Serinprotease HtrA, welche ebenfalls durch CiaR reguliert wird (Kochan & Dawid, 2013; persönliche Mitteilung Reinhold Brückner). Tatsächlich enthält *thmA* einen direkten Repeat upstream der -35 Region, welcher von Lange *et al.*, 1999 beschrieben wurde. Alle Gene, die diesen Repeat in ihrer Promotorregion enthalten, werden durch ein Quorum-Sensing System, welches die Bacteriocinproduktion steuert, reguliert. Die mRNA Menge, der Gene dieses Bacteriocinclusters *blpT-pncP* sind ebenfalls in dem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System erniedrigt (Tabelle 4.19)

Für das Gen *spr0022* konnte keine Regulation durch die csRNAs nachgewiesen werden (Bauer, 2012). Des Weiteren konnten auch Gene und intergene Bereiche identifiziert werden, deren RNA Menge in dem Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel im Vergleich zum Δ *ciaR* Stamm ebenfalls stark reduziert ist, aber eine geringe Bindungsenergie mit den csRNAs berechnet wurde. Eine Regulation durch die csRNAs wurde daher ausgeschlossen.

Ein Oligo, (AE007317_1194649) im intergenen Bereich, ist um das 95 fache reprimiert in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaR* (Abbildung 4.42). Dieser intergene Bereich liegt zwischen den Genen *spr1197* und *spr1198*. Hier konnte eine potenzielle ComE-Bindestelle identifiziert werden. Dieser potenzielle frühe Kompetenzpromotor könnte die Regulation einer kleinen RNA, die somit kompetenz reguliert wäre, kontrollieren.

Unter den Genen, deren RNA Menge in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaR* reduziert ist, konnten somit 2 weitere csRNA Zielgene, *oxlT* und *spr0264*, identifiziert

werden. Des Weiteren gibt es Hinweise auf einen negativen Effekt der Serinprotease *htrA* auf das Gen *spr0040*.

Innerhalb dieser globalen Transkriptomanalyse konnten auch eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, deren RNA Menge in dem Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel im Vergleich zum *ciaR* Deletionsstamm erhöht ist. Eine Erklärung hierfür wäre eine direkte positive Regulation dieser Gene durch CiaR. Daher wurde eine CiaR-Bindestelle upstream dieser Gene gesucht.

Tatsächlich konnte upstream der beiden Genen *pavB* und *spr0091* (Abbildung 4.41, Tabelle 4.16), welche für ein Protein aus der Familie der Zellwandoberflächenanker-Proteine (*pavB*) und eine potenzielle Zuckertransferase (*spr0091*) kodieren, eine potenzielle CiaR Bindestelle identifiziert werden. Diese beiden Gene sind in dem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System um das 4,7 fache bzw. 3,4 fache erhöht. Damit würden sie zu den schwächer durch CiaR-regulierten Genen gehören.

Mittels des Transkriptomvergleichs der Stämme *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* und *S. pneumoniae* R6 Δ *ciaR* konnten zwei Gene identifiziert werden, *spr0264* und *oxlT*, welche höchst wahrscheinlich post-translationell durch die csRNAs reguliert werden. Des Weiteren konnten zwei potenzielle neue CiaR-regulierte Gene nachgewiesen werden, sowie eine potenzielle kleine RNA, welche während der Kompetenzentwicklung aktiviert würde. Im Fall des Gens *thmA* ist es wahrscheinlich, dass die CiaR-regulierte Serinprotease HtrA an der beobachteten Erniedrigung der Transkriptmenge beteiligt ist.

Unklar ist jedoch bis jetzt warum die RNA Menge der restlichen Gene verändert ist. Auch das Gen oder die Gene, welche für den starken Anstieg der β -Laktamresistenz verantwortlich sind, konnten innerhalb dieses Transkriptomvergleichs nicht identifiziert werden.

Aufgrund der zu Beginn beschriebenen Instabilität des Stammes *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* sollte in einer weiteren Untersuchung ein Stamm verwendet werden, dessen Vorselektion auf einer erhöhten Cefotaximkonzentration möglich ist. Entschieden wurde sich für einen Transkriptomvergleich der Stämme *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnD*. Da diese beiden Stämme eine hohe bzw. sehr hohe Resistenz gegen Cefotaxim zeigen, ist hier eine Vorselektion möglich (siehe 4.1.1). Da in dem Stamm mit csRNA4 ein deutlicher Anstieg der Resistenz zu beobachten ist, wäre es möglich, dass mit Hilfe dieser Transkriptomanalyse das, oder die β -Laktam spezifischen Zielgene der csRNAs identifiziert werden können.

4.6.2 Globale Transkriptomanalyse von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnD*

In dieser globalen Transkriptomanalyse wurde die Menge an mRNA in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnD* mit *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* verglichen. Beide Stämme enthalten das *ciaH202* Allel und zeigen keine natürliche Kompetenz, was dazu führt, dass die Gene des CiaR-

Regulons und der Kompetenz innerhalb dieses Microarrays nicht als verändert auftauchen sollten. Dies ist auch der Fall, keines der bekannten CiaR-regulierten Gene wurde anhand dieses Microarrays nachgewiesen (Abbildung 4.47; Tabelle 4.20). Auch die beiden neu identifizierten potenziellen CiaR-regulierten Gene *pavB* und *spr0091* sind in diesen beiden Stämmen gleich stark exprimiert. Mithilfe dieses Microarrays konnten allerdings drei späte Kompetenzgene (*cibB*, *cibA* und *ssbB*) nachgewiesen werden (Abbildung 4.47, Tabelle 4.20). In dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD* ist die mRNA Menge um das 4,34; 3,12 bzw. 3,84 fache niedriger als in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202*. Diese drei späten Kompetenzgene werden während der Induktion der Kompetenz sehr stark exprimiert (Abbildung 4.47). Der Unterschied zwischen den beiden in dieser Transkriptomanalyse verglichenen nicht kompetenten Stämmen ist im Vergleich dazu sehr gering.

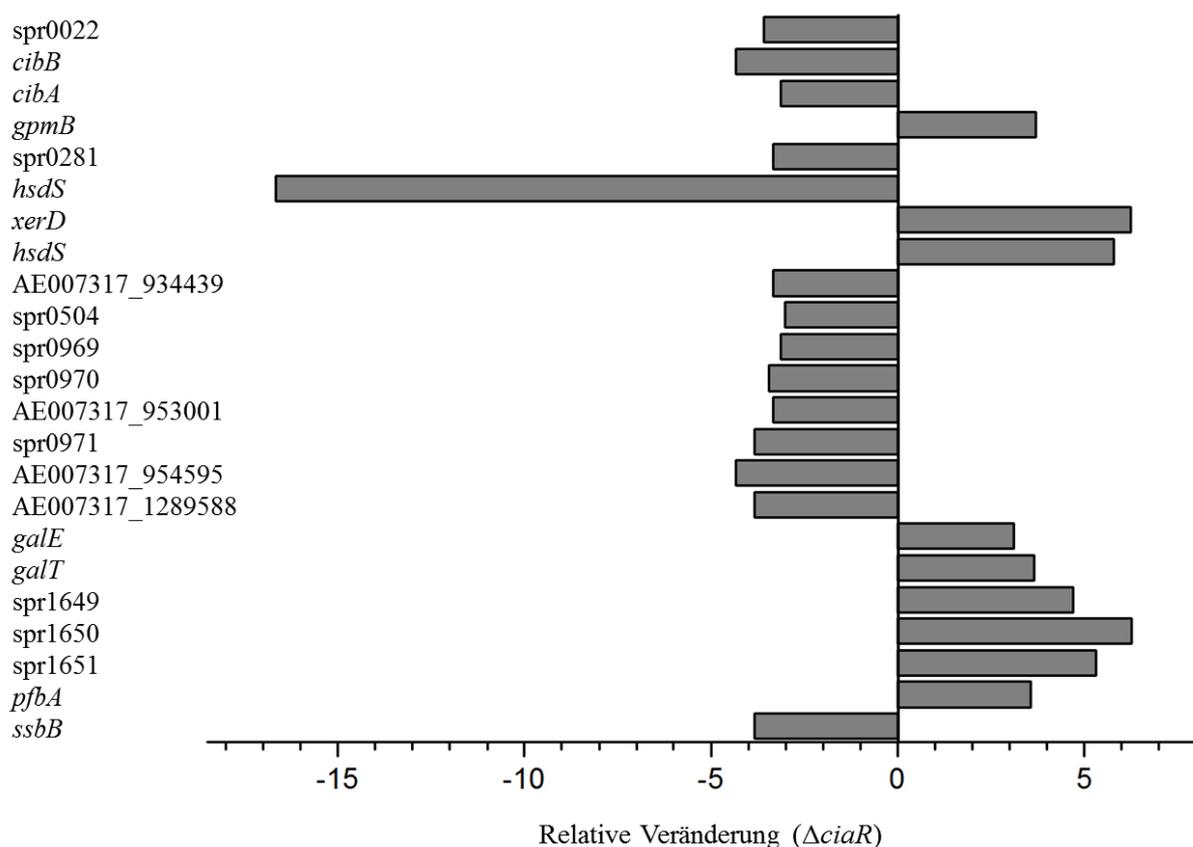


Abbildung 4.47: Relative Veränderung der Gene der globalen Transkriptomanalyse von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD* gegen *S. pneumoniae* R6 *ciaH202*.

Dargestellt ist die relative Veränderung der Gene von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD* im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* mit einem mindestens 3fach erhöhten oder erniedrigten Transkriptmengenverhältnisses ($AVG \geq 3$ oder $\leq 0,33$) und einem P-Wert unter 0,05 (5%). Die zur Transkriptionanalyse eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus in C+Y-Medium wachsenden Kulturen bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,4$ gewonnen. Es wurde das R6/TIGR4-Oligonukleotid-Set mit Zusatzplatte verwendet. Auf der Ordinatennachse sind die Gennamen bzw. -nummern (bei hypothetischen Proteinen) aufgetragen. Die Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in Tabelle 4.20 aufgelistet.

Innerhalb dieser Transkriptomanalyse konnten zwei Gencluster nachgewiesen werden, die im ersten Microarray nicht oder nur zum Teil verändert waren (Abbildung 4.47, Tabelle 4.20).

Eine Blastanalyse der Gene spr0969 bis spr0971 erbrachte eine Ähnlichkeit zu einer Carboxylase (spr0969), einer Acetyltransferase (spr0970) bzw. einem ABC-Transporter (spr0971). Die Transkription dieser Gene ist in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD* im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* um etwa das 3 fache verringert. Auch die Transkription des Oligos (AE007317_953001), welches im intergenen Bereich zwischen spr0970 und spr0971 liegt, ist um etwa das 3 fache erniedrigt.

Ein weiteres verändertes Gencluster bilden die Gene *pfbA* bis *galE* (Abbildung 4.4, Tabelle 4.20). In diesen Fällen ist die mRNA Menge in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD* zum Vergleichsstamm 3-6 fach erhöht. Die Gene *galE* und *galT* kodieren für eine UDP-Glukose-4-Epimerase bzw. eine Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase. Diese beiden Enzyme sind an der Verwertung der Galaktose über den Leloir Pathway beteiligt. Die entstandene UDP-Glukose wird anschließend für die Kapselsynthese benötigt (Carvalho *et al.*, 2011).

Die Gene spr1649 bis spr1651 kodieren für hypothetische Proteine. Eine Blastanalyse dieser Proteine ergab Ähnlichkeiten zu Domänen eines phoU-ähnlichen Transkriptionsregulators (spr1649) und einer Serin/Threonin Phosphatase (spr1650). Das hypothetische Protein, welches durch spr1651 kodiert ist, enthält keine konservierten Domänen. Im Falle von PfbA handelt es sich um ein Plasmin- und Fibronektin-bindendes Protein, dass an der Zelloberfläche über ein LPXTG-Motiv verankert ist. Es konnte gezeigt werden, dass es an der Bindung der Pneumokokken an die Wirtszellen und dem Schutz vor Phagozytose beteiligt ist (Yamaguchi *et al.*, 2008). In Tabelle 4.20 ist die relative Veränderung und die Funktion, der in dieser Transkriptomanalyse identifizierten Gene dargestellt.

Tabelle 4.20: Relative Veränderung und Funktion der in der globalen Transkriptomanalyse von *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD* identifizierten Gene

<i>Gen</i>	<i>Relative Veränderung</i>	<i>Funktion</i>
spr0022	-3,57	Cytidin/Deoxycytidylat-Deaminase
<i>cibB</i>	-4,34	CibB
<i>cibA</i>	-3,12	CibA
<i>gpmB</i>	3,71	GpmB, Phosphoglycerat Mutase 2 Paralog
spr0281	-3,33	Hypothetisches Protein
<i>hsdS</i>	-16,66	HsdS
<i>xerD</i>	6,25	XerD
<i>hsdS</i>	5,8	HsdS
AE007317_934439	-3,33	Zwischen spr0950 und spr0951
spr0504	-3,03	LicT, Transkriptionsantiterminator
spr0969	-3,12	hypothetische Carboxylase
spr0970	-3,44	hypothetische Acetyltransferase
AE007317_953001	-3,33	Downstream von spr0970, Terminator downstream
spr0971	-3,84	hypothetischer ABC Transporter, Makrolid-Efflux
AE007317_954595	-4,34	Downstream von spr0971, Terminator downstream
AE007317_1289588	-3,84	Zwischen spr1293 und spr1294, Gegenstrang
<i>galE</i>	3,12	GalE, UDP-Glukose 4-Epimerase
<i>galT</i>	3,65	GalT, Galaktose-1-phosphat Uridyltransferase

spr1649	4,7	Hypothetisches Protein, putativer Transkriptionsregulator (phoU-ähnlich)
spr1650	6,26	Hypothetisches Protein, putative Serin/threonine Phosphatase
spr1651	5,32	Hypothetisches Protein
spr1652	3,57	PfbA, Plasmin- und Fibronectin-bindendes Protein
<i>ssbB</i>	-3,84	SsbB

Innerhalb dieser Transkriptomanalyse konnten keine Gene identifiziert werden, welche direkt mit dem Resistenzanstieg in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD* (Abbildung 4.2) in Verbindung gebracht werden können. Allerdings konnten einige Gene identifiziert werden, die an Vorläuferprozessen der Kapselsynthese und der DNA Replikation beteiligt sind wie z.B. *galE*, *galT* und *dut* (siehe 4.6.4.1). Für das Phosphattransport Regulatorprotein PhoU konnte dabei gezeigt werden, dass es über die interne Phosphatkonzentration einen Einfluss auf die dUMP Synthese hat (Ting *et al.*, 2008). Für das PhoU-ähnliche hypothetische Protein spr1649 konnte ebenfalls eine erhöhte mRNA-Menge in dieser Transkriptomanalyse nachgewiesen werden. Generell ist davon auszugehen, dass es sich bei der erhöhten Resistenz nicht um einen direkten sondern indirekten Effekt der csRNA4 auf die Expression verschiedener Gene handelt.

Im Laufe dieser Transkriptomanalyse und weiterer Studien war es, im Gegensatz zur Kompetenz, bis jetzt nicht möglich, dass für den β -Laktamphänotyp verantwortliche Zielgen oder die Zielgene zu identifizieren. Allerdings sind die weiterführenden Studien zu dieser Transkriptomanalyse noch nicht abgeschlossen. Daher besteht durchaus die Möglichkeit, dass eine Beteiligung der in der Tabelle 4.19 und Tabelle 4.20 aufgelisteten Gene an der β -Laktamresistenz nachgewiesen wird.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle der csRNAs und HtrA in der β -Laktamresistenz

5.1.1 Additive oder redundante Wirkung der csRNAs?

Das Zwei-Komponenten System CiaRH wurde als erste nicht-PBP-Resistenzdeterminante in *S. pneumoniae* über sukzessiv gesteigerte Antibiotikakonzentrationen identifiziert (Guenzi *et al.*, 1994; Hakenbeck *et al.*, 1999). Mutationen in der Histidinkinase CiaH, welche eine Hyperaktivierung des CiaRH Systems bewirken, führen zu einer starken Aktivierung der CiaR-abhängigen Genregulation (Müller *et al.*, 2011). Diese starke Aktivierung des CiaRH Systems steht in Verbindung mit diversen Veränderungen bezüglich der natürlichen Kompetenz, der Autolyse und der Virulenz von *S. pneumoniae* (Guenzi *et al.*, 1994; Zähner *et al.*, 1996; Giammarinaro *et al.*, 1999; Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Peterson *et al.*, 2004; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Sebert *et al.*, 2005; Giammarinaro *et al.*, 1999; Mascher *et al.*, 2006; Pinas *et al.*, 2008; Moscoso *et al.*, 2010; Trappetti *et al.*, 2011; Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a). Ein weiterer, mit einem hyperaktiven CiaRH System in Verbindung stehender Phänotyp, ist die Erhöhung der Resistenz gegen verschiedene β -Laktamantibiotika (Guenzi *et al.*, 1994; Zähner *et al.*, 2002).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Erhöhung der Resistenz mit der Aktivierungsstärke der CiaR-abhängigen Genexpression verschiedener *ciaH*-Allele korreliert (Müller *et al.*, 2011). Des Weiteren konnte ein deutlicher Effekt einer *ciaR*-Deletion nur in diesen Stämmen dokumentiert werden. Auch die Gene des CiaR-Regulons, welche an diesem Resistenzanstieg beteiligt sind, konnten identifiziert werden. So führte eine Deletion aller fünf csRNAs zu einem nahezu vollständigen Verlust der durch ein hyperaktives CiaRH System, vermittelten Resistenz (Müller, 2011).

Innerhalb dieser Arbeit lag das Augenmerk auf dem Effekt einzelner csRNAs auf die β -Laktamresistenz. Da, wie oben erwähnt, ein deutlicher Effekt nur innerhalb eines Stammes mit hyperaktivem CiaRH System zu beobachten ist, wurde neben dem Arbeiten im genetischen Wildtyp Hintergrund auch mit einem Stamm gearbeitet, welcher das *ciaH202*-Allel enthält. Durch eine 15-fache Aktivierung des CiaRH Systems sind die Phänotypen in diesem Stamm stark ausgeprägt. Außerdem scheint dieser Stamm relativ stabil zu sein, was das Arbeiten mit ihm ermöglicht (Müller, 2011).

Zur Untersuchung der Bedeutung einzelner csRNAs wurden diese über Plasmide in den Wildtyp und in den Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel, in welchen zuvor alle csRNAs deletiert wurden, eingebracht. Anschließend wurden diese resistenzphänotypisch untersucht.

Im Wildtyp R6 sind kaum Unterschiede in der minimalen Hemmkonzentration zu erkennen (Abb. 4.1 A). Wie schon in früheren Arbeiten beschrieben, fällt die Resistenz durch die Deletion aller

csRNAs nur leicht ab. Da eine *ciaR*-Deletion in diesem genetischen Hintergrund ebenfalls nur zu einer leichten, nahezu nicht vom Wildtyp unterscheidbaren Resistenzreduktion führt (Müller, 2011), war hier ein starker Rückgang auch nicht zu erwarten. In den Stämmen mit einzelnen csRNAs ist ein leichter Anstieg der Resistenz zu beobachten. Ein Unterschied zwischen den einzelnen csRNAs ist hier nicht zu erkennen (Abb.4.1 A), was für eine additive Wirkung der csRNAs in diesem genetischen Hintergrund sprechen würde.

Weitere Hinweise über den csRNA vermittelten Resistenzanstieg sollten durch eine stärkere Expression der csRNAs im Wildtyp erbracht werden. Hierzu wurden die csRNAs mit dem konstitutiv aktiven Promotor *vegT* in den Wildtyp Deletionsstamm eingebracht. Hier wurde deutlich, dass eine stärkere Expression der csRNAs in fast allen Fällen zu einer erhöhten Resistenz führt (Abb. 4.1 B). Am deutlichsten ist dieser Effekt für csRNA1 (*pVccnA*) und csRNA5 (*pVccnE*) zu beobachten. Da csRNA1 mit etwa 300 Units den schwächsten nativen Promotor der csRNAs enthält (Halfmann, 2008), könnte die Veränderung der Expression durch den starken Promotor P_{vegT} (1000 Units) hier am stärksten ausgeprägt sein. Dafür spricht auch, dass in dem Stamm mit csRNA3, welche den stärksten nativen Promotor der csRNAs enthält (2000 Units), nahezu keine Erhöhung der Resistenz durch den Promotor P_{vegT} zu beobachten ist.

Allerdings passt der im Vergleich starke Anstieg in dem Stamm mit csRNA5 nicht zu dieser Theorie, da in diesem Fall die native Promotorstärke bei etwa 700 Units liegt. Die Resistenz sollte daher nicht so stark ansteigen wie in den Stämmen mit csRNA1, aber stärker als in den Stämmen mit csRNA3. Das ist in diesem Stamm allerdings nicht zu beobachten. Der Stamm mit csRNA5 unter Kontrolle des Promotors P_{vegT} erreicht eine etwas höhere Resistenz als der Wildtyp mit allen csRNAs unter nativer Kontrolle. Dass csRNA5 einen stärkeren Effekt auf die β -Laktamresistenz ausübt als die übrigen csRNAs, wäre daher denkbar. Hier wäre es interessant zu wissen, ob dieser Effekt auch in dem *ciaR* Deletionsstamm zu beobachten ist. Sollte dies der Fall sein wäre der Effekt unabhängig von weiteren CiaR regulierten Genen.

Tatsächlich zeigte sich bei den Untersuchungen im hyperaktiven Hintergrund, dass csRNA4 und csRNA5 eine starke Erhöhung der β -Laktamresistenz bewirken, wohingegen nahezu kein Anstieg bei den anderen csRNAs zu beobachten ist (Abb. 4.2). Dies würde klar gegen eine additive Wirkung der csRNAs in diesem genetischen Hintergrund sprechen. Dass diese Effekte durch die csRNAs vermittelt werden, wurde durch die Deletion von csRNA4 in diesem Stamm gezeigt. Hierdurch kommt es zu einer deutlichen Reduktion der β -Laktamresistenz. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt csRNA4 abhängig ist, da das Einbringen von csRNA2 in diesen Stamm nicht zu einer deutlichen Resistenzerhöhung führt (Abb. 4.3). Allerdings konnte innerhalb dieser Arbeit eine starke Instabilität dieser Stämme beobachtet werden, die, durch den in diesen Stämmen vermittelten unterschiedlichen *htrA* Deletionseffekt, noch deutlicher wird.

Im Gegensatz zu den csRNAs konnte in früheren Studien nur ein geringer Effekt der *htrA* Deletion in einem ansonsten hyperaktiven Stamm nachgewiesen werden (Müller, 2011). Innerhalb dieser Arbeit

konnte dagegen ein unterschiedlicher Effekt der *htrA* Deletion auf die Stämme mit hyperaktivem CiaRH System und einzelnen csRNAs beobachtet werden. Die Stämme, deren Resistenz vorher nahezu keine Veränderungen in der β -Laktamresistenz aufwiesen, zeigen nach der *htrA* Deletion einen Anstieg der β -Laktamresistenz auf das Niveau des hyperaktiven Stammes mit csRNAs. In den Stämmen mit csRNA4 und csRNA5 führte die Deletion allerdings zu einer Reduktion der β -Laktamresistenz. Dass die Deletion von *htrA* und den csRNAs wiederum ein positives Feedback auf die Aktivität des CiaRH-Systems hat, konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Müller 2011; Shambhu, 2013). Allerdings scheint diese Regulation teilweise unabhängig von *ciaH*, auf den Promotor der *ciaR*-regulierten Gene zu wirken (Shambhu, 2013). Das bedeutet, dass eine *htrA* Deletion auf die Promotoren der csRNAs den gleichen Effekt ausübt. Eine wie in dieser Arbeit beobachtete unterschiedliche Wirkung müsste daher post-transkriptionell ansetzen und die Menge oder die Stabilität der csRNAs beeinflussen. Eine unterschiedliche Menge an csRNAs in den einzelnen Stämmen konnte allerdings nicht beobachtet werden (Abb. 4.11). Die in dem hyperaktiven *ciaH202*-Allel gesammelten Ergebnisse können aus mehreren Gründen angezweifelt werden. Es gab im Wildtyp keine Hinweise auf eine redundante Wirkung, allerdings ist die Resistenzentwicklung hier generell nicht zu stark und eine verbesserte Wirkung der csRNA5 durch den konstitutiven Promotor P_{vegT} war ebenfalls zu beobachten. Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass HtrA die Aktivität der csRNAs unterschiedlich stark reguliert. Außerdem konnte, wie schon erwähnt, eine starke Instabilität dieser Stämme beobachtet werden. In diesen Stämmen konnten immer wieder Zusatzmutationen in *ciaR* und *ciaH* identifiziert werden, welche die Aktivität des CiaRH Systems reduzieren. Aus diesen Gründen sollte die Resistenzentwicklung in den unterschiedlichen csRNA Stämmen nochmals mithilfe eines induzierbaren Systems überprüft werden.

Hierbei konnten die im hyperaktiven Hintergrund gesammelten Ergebnisse widerlegt werden. Innerhalb dieser Versuchsreihe konnte der extreme Anstieg der Stämme mit csRNA4 und csRNA5 nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.15). Auch eine unterschiedliche Wirkung der *htrA*-Deletion war nicht zu beobachten. Die Deletion führt in fast allen Stämmen, auch im Ausgangsstamm, mit allen csRNAs, zu einer leichten Erhöhung der β -Laktamresistenz. Dieser Anstieg könnte wiederum durch den Feedback-Mechanismus, der durch das Fehlen von *htrA* ausgelöst wird, bedingt sein (Müller, 2011; Shambhu, 2013). Eine Ausnahme in diesem Fall stellt der Stamm mit csRNA5 dar. Hier wird die Resistenz durch die *htrA*-Deletion reduziert. Dies wiederum wird wahrscheinlich durch das beobachtete starke Wachstumsdefizit nach Induktion bedingt (Abb. 4.17). Die im induzierbaren Hintergrund erworbenen Ergebnisse sprechen, wie die im Wildtyp gesammelten Ergebnisse, für eine additive Wirkung der csRNAs auf das bzw. die β -Laktam spezifischen Zielgene. Aus den schon erwähnten Gründen können die Ergebnisse der Versuche der Stämme mit *ciaH202*-Allel angezweifelt werden. Nichts desto trotz konnte in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnA-E$ $pCcnD$ klar gezeigt werden, dass in diesem genetischen Hintergrund, in welchem weder eine Mutation in den PBPs, CiaRH oder HtrA identifiziert wurden, ein deutlicher von der csRNA4 abhängiger Anstieg der β -

Laktamresistenz erfolgte. Durch eine genauere Untersuchung dieses Stammes wäre es eventuell möglich, das Zielgen der csRNAs oder weitere Mutationen, die zusammen mit csRNA4 zu einem Resistenzanstieg führen, zu identifizieren.

5.1.2 Identifizierung des β -Laktam spezifischen Zielgenes der csRNAs

Aufgrund des Aufbaues der csRNAs, mit Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz und Anti-AUG, liegt die Vermutung einer negativen Wirkung der csRNAs auf die mRNAs ihrer Zielgene nahe (Schnorpfeil *et al.*, 2013). β -Galaktosidasemessungen der bisher identifizierten Zielgene bestätigten diese Annahme (Schnorpfeil *et al.*, 2013), was allerdings nicht bedeutet, dass es sich immer um eine negative Wirkung handeln muss (Brantl, 2012). Ein Beispiel für eine sRNA, die sowohl positiv als auch negativ auf die mRNA verschiedener Gene wirkt, ist RNAIII aus *S. aureus*. In diesem Fall wird die Translation von *spa* inhibiert und die von *hla* aktiviert (Abb. 2.3)(Huntzinger *et al.*, 2005; Morfeldt *et al.*, 1995).

Keines der sechs bis heute bioinformatisch gefundenen und beschriebenen, negativ regulierten csRNA Zielgene wird mit der β -Laktamresistenz in Verbindung gebracht. Nach der Deletion dieser Gene, unter denen sich 4 Transporter und ein Protein mit DNA-Bindedomäne befinden, konnte kein Anstieg der β -Laktamresistenz beobachtet werden (Bittmann, 2013).

Innerhalb dieser Arbeit konnte anhand des induzierbaren *ciaH202*-Allels (Abb. 4.15) und der Wildtyp Untersuchungen (Abb. 4.1) eine additive Wirkung der csRNAs auf die β -Laktamresistenz nachgewiesen werden. Nichts desto trotz konnte in den Stämmen mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel in Kombination mit csRNA4 und csRNA5 ein starker Anstieg in der β -Laktamresistenz beobachtet werden. Dieser ist, zumindest im Fall der csRNA4, eindeutig vom Vorhandensein dieser csRNA abhängig (Abb. 4.3). Es ist davon auszugehen, dass sich der Stamm mit csRNA5 gleichermaßen verhält. Allerdings wurde dies nicht im Zuge dieser Arbeit untersucht.

Um die Gene zu identifizieren, welche mit der Resistenz generell und der csRNA4 vermittelten Resistenz in Zusammenhang stehen, wurden zwei globale Transkriptomanalysen durchgeführt. In der ersten Transkriptomanalyse wurde der Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel mit dem *ciaR*-Deletionsstamm verglichen (siehe 4.6.1). In der zweiten Transkriptomanalyse wurde der hyperaktive Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* mit dem ebenfalls hyperaktiven Stamm *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* Δ *ccnA-E* *pCcnD* verglichen. Die in diesen Transkriptomanalysen verwendeten Stämme zeigen einen deutlichen Unterschied in der β -Laktamresistenz (Müller, 2011) (Abb. 4.2).

Innerhalb dieser Transkriptomanalysen konnten einige Gene identifiziert werden, deren mRNA in dem Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel im Vergleich zum *ciaR*-Deletionsstamm deutlich erniedrigt war. Da es sich hierbei um potenzielle Zielgene der csRNAs handeln könnte, wurden diese auf eine

mögliche Hybridisierung mit den csRNAs hin untersucht. Tatsächlich konnte für zwei dieser Gene, *spr0264* und *oxlT*, eine negative Regulation der Translation durch die csRNAs mittels β -Galaktosidaseassays nachgewiesen werden (Bauer, 2012; Dersidan 2013). Wie auch schon für vier der bisher fünf bekannten csRNA Zielgene (Schnorpfeil *et al.*, 2013), handelt es sich auch bei diesen Genen um Transporter.

Hierbei kodiert das Gen *oxlT* für einen Oxalat-Format-Antiporter (Kang *et al.*, 2011), welcher zur größten bekannten Transporter Superfamilie (MFS) gehört (Busch & Saier, 2002; Pao *et al.*, 1998). Die Mitglieder dieser Gruppe interagieren mit einer Vielzahl von Substraten, darunter Medikamente, Neurotransmitter, Aminosäuren, Zucker und anorganische Ionen (Kang *et al.*, 2011), teilen sich aber Strukturähnlichkeiten und ähnliche Transportmechanismen (Maloney, 1994; Pao *et al.*, 1998). Zu dieser Superfamilie gehören z.B. der TetA Efflux Transporter und der TetL Antiporter aus *B. subtilis* (Grkovic *et al.*, 2002; Safferling *et al.*, 2003), der LacS Transporter aus *S. thermophilus* (Poolman *et al.*, 1996) und der Glycerin-3-Phosphat Transporter GlpT aus *E. coli* (Auer *et al.*, 2001). Interessanterweise konnte für GlpT in *E. coli* gezeigt werden, dass der Response Regulator CpxR die Expression dieses und eines weiteren Transporters direkt reprimiert (Kurabayashi *et al.*, 2013). Zu ihren nativen Substraten, Glycerol-3-Phosphat und Glucose-6-Phosphat, wird das Antibiotikum Fosfomycin kotransportiert. Durch die Repression wird daher weniger Fosfomycin transportiert, wodurch die Resistenz gegen Fosfomycin erhöht wird. Dieses Antibiotikum inhibiert die Mureinbiosynthese irreversibel, indem es das Enzym MurA hemmt (Olesen *et al.*, 2013).

Für Penicillin-resistente *S. pneumoniae* Stämme konnte bislang gezeigt werden, dass eine Kombination von Fosfomycin mit Cefotaxim, Ceftriaxon, Amoxicillin oder Vancomycin in verschiedenen Dosierungsschemata eine größere Wirksamkeit aufweist als eines dieser Antibiotika alleine (Chavanet *et al.*, 1995; Chavanet *et al.*, 1996; Ribes *et al.*, 2006; Falagas *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte ein stärkerer anti-bakterieller Effekt von Fosfomycin auf ein hoch Cephalosporin-resistentes Pneumokokken Isolat nachgewiesen werden

CpxR und die zugehörige Histidinkinase CpxA zeigen starke Ähnlichkeit mit dem CiaRH System. Zum Beispiel steht die Expression des HtrA-Homologs DegP unter der Kontrolle des Zwei-Komponenten Systems CpxAR (Danese *et al.*, 1995). Auch in diesem Zwei-Komponenten System, wie auch in CiaRH, konnte eine regulatorische Rolle von DegP (HtrA) bei der CpxAR Stimulierung nachgewiesen werden (Buelow & Raivio, 2005; Isaac *et al.*, 2005). Wie auch die Resistenz gegen β -Laktamantibiotika durch ein hyperaktives CiaRH System, konnte auch für die CpxAR vermittelte Fosfomycin Resistenz eine Reduktion der biologischen Fitness beobachtet werden (Kurabayashi *et al.*, 2013; Müller, 2011). Dies deutet auf einen Kompromiss zwischen der Resistenz und der Substrataufnahme hin, welche die biologische Fitness beeinflusst. Dafür spricht ebenfalls die Tatsache, dass die meisten der bis heute identifizierten negativ regulierten csRNA Zielgene Transporter sind (Schnorpfeil *et al.*, 2013).

Allerdings enthält das hier verwendete C+Y-Medium Uridin, welches direkt zu UMP umgewandelt werden kann. Dieses UMP wird weiter verwertet zu UDP. UDP wird für die Biosynthese der Teichonsäuren im Peptidoglykan von *S. pneumoniae* benötigt (Denapaite *et al.*, 2012). Durch diesen im Cytoplasma ablaufenden Prozess könnte die β -Laktamresistenz durchaus beeinflusst werden. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Veränderungen in der Aminosäure-Ligase MurE, welche die Addition der dritten Aminosäure an die wachsende Peptidkette im Cytoplasma katalysiert, die β -Laktamresistenz beeinflussen können (Todorova, 2010).

Veränderungen in MurE führen lediglich zu einer 3- bis 5-fachen Erhöhung der Resistenz gegenüber Cefotaxim, bewirken aber einen 40-fachen Anstieg in Verbindung mit einem Mosaik-PBP2x (Todorova, 2010). Inwieweit sich eine Hyperaktivierung des CiaRH System auf ein verändertes MurE auswirkt ist allerdings nicht bekannt.

Allerdings zeigt ein weiteres, im DNA Vorläufer Metabolismus beteiligtes Gen, eine relativ gute Hybridisierungsenergie mit den csRNAs. Hierbei handelt es sich um die Deoxyuridin 5'-Triphosphat Nukleotiddehydrolyase *dut*. Die mRNA Menge dieses Gens allerdings ist in dem Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel im Vergleich zum *ciaR*-Deletionsstamm erhöht. Wenn die csRNAs dieses Gen regulieren, müsste es sich daher um eine positive Regulation handeln.

Auch dieses Gen wurde auf den post-transkriptionellen Effekt der csRNAs hin untersucht. An Hand dieser β -Galaktosidaseassays konnte allerdings ein Effekt der csRNAs auf die Translation von *dut* ausgeschlossen werden (Bauer, 2012). Bei dem hier beobachteten Effekt auf die mRNA Menge könnte es sich um einen Effekt der Serinprotease *htrA* handeln, welche in dem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System ebenfalls stärker exprimiert ist. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass *degP*, welches das *htrA* Homolog in *E. coli* darstellt, durch seine Chaperonaktivität die Nukleotiddehydrolyase Dut vor Abbau durch andere Proteasen schützt (Ting *et al.*, 2008). Eine größere Menge an HtrA würde somit einen besseren Schutz vor dem Abbau bewirken.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Genprodukte von *phoU* und *pstSCAB* die interne Pyrophosphatkonzentration beeinflussen und darüber einen Effekt auf die Pyrimidinsynthese ausüben. Eine Inaktivierung der *pstSCAB* Gene führt dabei zu einer Reduktion der Pyrophosphatkonzentration, die Inaktivierung von *phoU* zu einer Steigerung der Konzentration (Ting *et al.*, 2008). Tatsächlich konnten innerhalb der in dieser Arbeit durchgeführten globalen Transkriptomanalysen Veränderungen in der mRNA Menge in dem Gen *spr1649*, welches für ein als PhoU-ähnliches hypothetisches Protein kodiert, und den Genen *pstSCAB* ($AVG \geq 2$ oder $\leq 0,5$), nachgewiesen werden. Die Menge an mRNA für *spr1649* ist in dem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System erhöht. Hierdurch sollte es zu einer Reduktion der Pyrophosphatmenge kommen. Die mRNA Menge der *pstSCAB* Gene dagegen ist in dem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System erniedrigt, was zu einer Steigerung der Pyrophosphatmenge führen sollte. Hierbei scheint es sich um einen Regulationsmechanismus zu handeln, bei dem die Zelle darauf bedacht ist, die Menge an Pyrophosphat relativ konstant zu halten.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Doppeldelation von *dut* und *degP* bzw. *phoU* in *E. coli* zum Zelltod führt, was die Rolle dieser Regulation verdeutlicht (Ting *et al.*, 2008).

Die Gene *pstSCAB* konnten schon in früheren Studien mit der Resistenz gegen Penicillin in Verbindung gebracht werden. Allerdings wurde in diesen Studien gezeigt, dass eine Deletion von *pstS*, welches für eine Untereinheit des Phosphat-ABC-Transporters kodiert, die Resistenz gegen Penicillin reduziert (Soualhine *et al.*, 2005). Dies widerspricht denen in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen, da hier der resistente Stamm mit hyperaktivem CiaRH System eine reduzierte Menge an mRNA im Vergleich zum sensitiven *ciaR*-Deletionsstamm aufweist. Allerdings konnte in einer weiteren Studie Mutationen in *pstB*, welches für das ATP-bindende Protein des Phosphat-ABC-Transporters kodiert, in zwei Penicillin resistenten Stämmen nachgewiesen werden. Eine Inaktivierung durch eine insertionale Duplikationsmutagenese im Wildtyp R6 führte hier nicht zu einem Anstieg der Penicillintoleranz (Fani *et al.*, 2011). Es wäre möglich, dass Veränderungen in *pstSCAB* nur in einem bestimmten genetischen Hintergrund zu einer erhöhten Resistenz führen.

Innerhalb der durchgeführten globalen Transkriptomanalysen konnten weitere Gene identifiziert werden, deren Expression durch die Behandlung mit Penicillin verstärkt wird (Rogers *et al.*, 2007) (siehe 4.6). Darunter die Gene *galT*, das schon zuvor beschriebene *spr1649* (PhoU ähnliches Protein) und *pfbA*. Dabei ist anzumerken, dass eine erhöhte Menge an mRNA für den gesamten Genbereich zwischen *pfbA* (*spr1652*) bis *galE* (*spr1647*) nachgewiesen wurde (Abbildung 5.2). Die Genprodukte von *galE* und *galT* sind an der Verstoffwechslung des Galaktose-1-Phosphats in Glukose-1-Phosphat, über den Leloir Stoffwechselweg beteiligt. Das entstandene Glukose-1-Phosphat wird anschließend in der Kapselsynthese verwendet (Carvalho *et al.*, 2011). Dar *S. pneumoniae* R6 eine weitere Kopie der Gene *galE* (*spr1460*) und *galT* (*spr1667*) auf dem Genom enthält, ist davon auszugehen, dass die durch diese Gene kodierten Enzyme eine bedeutende Rolle in der Zelle übernehmen. Zwar kann Galaktose auch über den Tagatose-6-Phosphatweg verstoffwechselt werden, allerdings kann nur das über den Leloir Stoffwechselweg gebildete Glukose-1-Phosphat für weitere Biosynthesen verwendet werden.

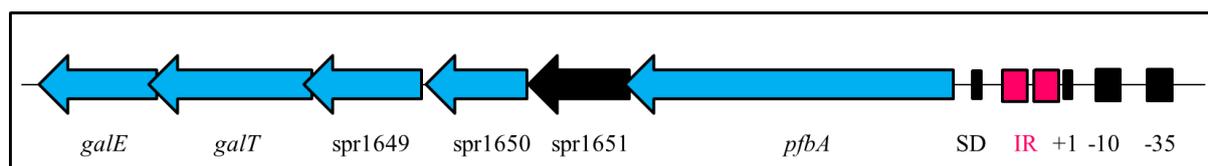


Abbildung 5.2: Genetische Organisation des Operons *pfbA-galE*.

Gezeigt ist die genetische Karte der Region von *pfbA* bis *galE* in *S. pneumoniae*. Die einzelnen Gene auf dem Genom sind durch Pfeile gekennzeichnet: *galE* und *galT*: Verstoffwechslung von Galaktose, *spr1649*: PhoU ähnliches Protein, *spr1650*: Serin/Threonin Phosphatase ähnliches Protein, *spr1651*: Funktion unbekannt, *pfbA*: Plasminogen- und Fibronektinbindende Protein A. Strukturen der Transkription und Translation upstream von *pfbA* sind ebenfalls gezeigt: SD: Shine-Dalgarno Sequenz, IR: Inverted Repeat, +1: Start der Transkription, -10 und -35 Sequenz des Promotors.

Eine Blastanalyse des Gens *spr1651* zeigte keine konservierten Domänen in diesem Protein. Die Gene *spr1650* und *pfbA* kodieren für ein Serin/Threonin Phosphatase ähnliches Protein und das Plasminogen- und Fibronektinbindende Protein A. Bei PfbA handelt es sich um einen wichtigen Faktor der Pneumokokken Infektion (Yamaguchi *et al.*, 2008). Eine Strukturanalyse von PfbA zeigte Bereiche, welche für eine Erkennung von Kohlenhydraten sprechen. Strukturen, die für eine katalytische Aktivität sprechen, konnten nicht identifiziert werden (Suits & Boraston, 2013). PfbA stellt somit einen Virulenzfaktor in *S. pneumoniae* dar und auch für das CiaRH System konnte eine Beteiligung an der Virulenz nachgewiesen werden (Sebert *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2004a). Wie genau die Regulation dieser Gene mit der *csRNA4* in Zusammenhang steht, muss noch genauer untersucht werden. Gegen eine direkte Interaktion der *csRNA4* mit diesen Genen spricht die Tatsache, dass eher von einer negativen Wirkung auf die Translation der Zielgene ausgegangen wird. Dann würde es sich bei dieser Steigerung der mRNA Menge in dem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System um einen indirekten Effekt handeln. Tatsächlich konnte upstream von *pfbA* zwischen dem +1 und der Shine-Dalgarno Sequenz ein Inverted Repeat identifiziert werden (AATGACA-N4-TGTCATT). Mutationen in diesem Bereich führten zu einer Verstärkung der *pfbA-lacZ*-Fusion Expression. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Bindung eines Repressors an diesen Inverted Repeat, dessen Bindung durch die Mutation vermindert wird. Eine erste Blastanalyse ergab keine Ähnlichkeit dieses Inverted Repeat zu weiteren schon in *S. pneumoniae* beschriebenen Repeats. Es wäre denkbar, dass die *csRNA4* die Translation dieses Repressors reprimiert. Durch diese Repression kommt es dann zu einer verminderten Bindung des Repressors an den Inverted Repeat, was eine stärkere Expression der *pfbA-galE* Gene zur Folge hätte.

Für das Gen *thmA* konnte eine 8,4-fach niedrigere Menge an mRNA in *S.pneumoniae* R6 *ciaH202* nachgewiesen werden (Abb.4.46). Auch dieses Gen wurde in weiteren Studien auf eine mögliche negative Regulation durch die *csRNAs* hin untersucht. Allerdings konnte hier ein Effekt der Serinprotease HtrA beobachtet werden (persönliche Mitteilung R. Brückner).

Tatsächlich enthält *thmA* einen direkten Repeat upstream der -35 Region, welcher von Lange *et al.*, 1999 beschrieben wurde. Alle Gene, die diesen Repeat in ihrer Promotorregion enthalten, werden durch ein Quorum-Sensing System, welches die Bacteriocinproduktion steuert, reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Serinprotease HtrA, welche durch CiaR reguliert wird, das Signalpeptid BlpC dieses Systems degradiert (Kochan & Dawid, 2013). Hierrüber ist auch die erniedrigte Menge an mRNA der Gene des Bacteriocinclusters (*blpT-pncP*) zu erklären. Das Quorum Sensing System, welches die Bacteriocinproduktion reguliert ist dem Kompetenz System sehr ähnlich. Hier wird die Histidinkinase BlpH (*spr0464*) durch das Bacteriocin-ähnliche Peptid BlpC aktiviert. Diese wiederum aktiviert den Response Regulator BlpR. Für den Response Regulator BlpR (*spr0463*) konnte innerhalb dieses Microarray ebenfalls eine Veränderung in der mRNA Menge, mit sehr gutem P-Value,

nachgewiesen werden. Allerdings ist diese Veränderung lediglich -2,21 fach und wurde daher nicht in Abbildung 4.46 und Tabelle 4.19 aufgelistet. Ebenso verhält es sich mit *blpS* (spr0462), wo eine -2,69 fache Veränderung in der mRNA Menge identifiziert wurde. Durch die HtrA vermittelte Degradation von BlpC wird die Expression aller durch das Zwei-Komponenten System BplRH regulierter Gene beeinflusst.

Eine zusätzliche Regulation von *thmA* durch die csRNAs wäre trotzdem denkbar. Für das frühe Kompetenzgen *comC* konnte bereits eine negative Regulation sowohl durch die Serinprotease HtrA als auch durch die csRNAs nachgewiesen werden (Sebert *et al.*, 2005, diese Arbeit).

In der globalen Transkriptomanalyse der Stämme *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* und *S.pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD* konnten weitere Gene identifiziert werden, deren mRNA Menge in dem Stamm mit csRNA4 erniedrigt ist. Es wäre möglich, dass es sich hierbei um Zielgene der csRNA4 handelt. Zum einen wäre dies denkbar, falls die Expression der csRNA in diesem Stamm nochmal durch das Fehlen der übrigen csRNAs verstärkt wird. Zum anderen könnten sich die csRNAs auch gegenseitig an der Hybridisierung mit diversen Zielgenen behindern, was ebenfalls eine stärkere Wirkung der csRNA4 in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD* bewirken würde. Zu diesen Genen gehören spr0969, spr0970 und *mefE* (spr0971).

Das Gen spr0969 gehört zu der Gruppe der L-Aminosäureligasen welche die Synthese von Oligopeptiden katalysieren (Arai & Kino, 2010). Diese Aminosäureligasen nutzen vorwiegend verzweigte Aminosäuren. Da die berechnete Bindungsenergie von $\Delta G = -13,8$ nicht gerade für eine Hybridisierung der csRNA4 an die mRNA von spr0969 spricht, könnte es sich hier um einen sekundären Effekt handeln. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Translation des Gens *brnQ*, welches für einen Transporter für verzweigte Aminosäuren kodiert, durch die csRNA negativ reguliert wird (Schnorpfeil *et al.*, 2013). Daher würden weniger verzweigte Aminosäuren für die Oligopeptidsynthese zur Verfügung stehen.

Die Bindungsenergie des zweiten Gens spr0970, welches wahrscheinlich mit spr0969 in einem Operon kodiert ist, mit den csRNAs mit $\Delta G = -18$ relativ hoch. Ein Binden der csRNAs upstream des spr0970 würde bedeuten, dass die csRNAs innerhalb der kodierenden Sequenz von spr0969 binden und somit auch dessen Translation hemmen könnten. Bisher konnte immer nur erste Gene im Operon nachgewiesen werden, dessen Translationen durch die csRNAs reguliert werden (Schnorpfeil *et al.*, 2013).

Das dritte Gen *mefE*, welches wahrscheinlich unabhängig von spr0969 und spr0970 exprimiert wird, kodiert für einen Macrolid-Efflux ABC-Transporter. Diese Transporter erhöhen die Resistenz gegen Makrolidantibiotika wie z.B Erythromycin, indem sie das Antibiotikum ATP-abhängig aus der Zelle transportieren. Die erniedrigte RNA Menge in dem *S.pneumoniae* R6 *ciaH202 ΔccnA-E pCcnD*

Stamm kann in diesem Fall wahrscheinlich nicht durch eine negative Regulation der csRNAs zustande kommen. Die Berechnung der Bindungsenergie ergab hier lediglich einen Wert von $\Delta G = -11,1$.

Neben denen in dieser Transkriptomanalyse identifizierten potenziellen csRNA Zielgene wurden auch Gene identifiziert, die möglicherweise direkt über den Response Regulator CiaR reguliert werden. Hierbei handelt es sich um Gene, deren RNA Menge in dem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System erhöht ist. Diese wurden auf eine mögliche CiaR-Bindestelle hin untersucht. Tatsächlich konnte vor den Genen *pavB* und *spr0091* (Abb. 4.46) eine mögliche CiaR-Bindestelle identifiziert werden. Diese potenziellen CiaR-Bindestellen, sowie die perfekte CiaR-Bindestelle, sind in Abbildung 5.3 dargestellt.

	cia-Box	
perfekte CiaR-Bindestelle	TTTAAG-N5-TTTAAG	-N10- TATAAT -10
potenzielle CiaR-Bindestelle <i>pavB</i>	TGTTTTATAAG-N5-TTTAAG	-N44- TACTAGAGT -10
potenzielle CiaR-Bindestelle <i>spr0091</i>	TTTAATAACAG-N5-TTTAAG	-N10- TATAATGTCAA

Abbildung 5.3: Potenzielle CiaR-Bindestellen der Gene *pavB* und *spr0091* im Vergleich zu einer perfekten CiaR-Bindestelle.

Dargestellt sind die potenziellen cia-Boxen (blau) upstream der Gene *pavB* und *spr0091*. Die -10 der jeweiligen Gene ist rot hinterlegt.

Wie der Abbildung 5.3 zu entnehmen ist, zeigen die beiden Gene kein perfektes CiaR-Bindemotiv. In dem Gen *pavB* weicht eine Base des ersten Repeats von der perfekten CiaR-Bindestelle ab, allerdings ist die potenzielle Bindestelle 44 Basen von der annotierten -10 Region dieses Gens entfernt. Die CiaR-Bindestelle des Gens *spr0091* zeigt zwei Abweichungen im ersten Repeat allerdings liegt das CiaR-Bindemotiv wie im perfekten Fall 10 Basen entfernt der -10. Es wäre denkbar, dass diese beiden Gene aufgrund dieser Veränderungen nur zu den schwächer regulierten des CiaR-Regulons gehören.

Bei *pavB* handelt es sich um ein Oberflächen-exponiertes Fibronectin- und Plasminogen-bindendes Protein, welches eine Rolle bei der Kolonisation und der Atemwegsinfektion von Streptokokken spielt (Jensch *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass eine repetitive Sequenz an der Oberfläche der Streptokokken mit dem Humanfibronectin interagiert. Unterschiede in der Anheftung einzelner Streptokokken kommen durch die Anzahl der Wiederholungen dieser Sequenz zustande. Falls die Expression von *pavB* tatsächlich über den Response Regulator CiaR reguliert werden, könnte dies die Kolonisation der Streptokokken beeinflussen. Hierbei könnte es sich um die Verbindung zwischen dem CiaRH System und der Beobachtung, dass eine Inaktivierung des Response Regulators zu einer verminderten Fähigkeit den Nasopharynx und die Lunge zu besiedeln führt, handeln (Trappetti *et al.*, 2011).

Bei dem Gen spr0091 handelt es sich um eine potenzielle Zuckertransferase, welches wahrscheinlich mit spr0092 in einem Operon kodiert ist. Spr0091 ist ein essentielles Gen (Song *et al.*, 2005), dessen wahrscheinliche Aufgabe darin besteht, GalNAc oder Glc während der Synthese und Polymerisation von Wiederholungseinheiten an das bestehende Gerüst der Lipoteichonsäuren zu verknüpfen (Denapaite *et al.*, 2012). Da dieses hypothetische Protein drei Transmembrandomänen enthält, ist es wahrscheinlich in der Membran lokalisiert. Sollte dieses Gen tatsächlich von CiaR-reguliert werden, wäre es neben den Genen *licA-C*, *tarI*, *traJ* und *dltX-D* ein weiteres, an der Teichonsäuresynthese beteiligte Gen, im CiaR-Regulon.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Transkriptomanalyse stellt eine gute Basis zur Identifikation des β -Laktam spezifischen Zielgenes dar. Anhand der hier ermittelten Daten konnten bereits zwei bis dato unbekannte Zielgene (spr0264 und *oxIT*) identifiziert werden. Allerdings ist anzumerken, dass keines der bisher bekannten Zielgene, welche über bioinformatische Analysen identifiziert wurden, innerhalb dieser globalen Transkriptomanalyse nachgewiesen wurde. Die Gene spr0159 und *brnQ* wurden wegen eines sehr schlechten P-Value Wert aus der Analyse ausgeschlossen. Die Gene spr0081, spr0371 und spr1097 dagegen zeigten einen sehr guten P-Value aber nur eine -1,2 bis -1,9 fache Veränderung der mRNA Menge in dem hyperaktivem CiaRH Stamm. Um ein Zielgen der csRNAs mithilfe einer globalen Transkriptomanalyse zu identifizieren muss nicht nur die Translation sondern auch die mRNA Stabilität durch die csRNAs beeinflusst werden. Dies muss nicht zwangsläufig für jedes csRNA Zielgen der Fall sein, was erklären könnte warum für die bisher identifizierten Zielgene unterschiedliche Effekte innerhalb dieser Transkriptomanalyse beobachtet wurden.

Daher ist es durchaus möglich, dass auch das β -Laktam spezifische Zielgen innerhalb dieser Daten nicht aufgeführt ist. Nichts desto trotz sollten weitere Studien zu den hier ermittelten Daten durchgeführt werden, die gegebenenfalls in Kombination mit bioinformatischen Analysen, zur Identifikation des β -Laktam spezifischen Zielgenes führen.

Da für die Gene *oxIT* und spr0264 bereits gezeigt werden konnte, dass deren Translation negativ durch die csRNAs reguliert wird (Bauer, 2012; Dersidan, 2013), sollten diese in weiteren Versuchen auf einen möglichen Zusammenhang mit der β -Laktamresistenz hin untersucht werden. Dies könnte sich allerdings etwas schwieriger gestalten, da im Wildtyp und auch im induzierbaren pTEX Hintergrund der β -Laktamresistenz Phänotyp nicht stark ausgeprägt ist. Geht man zusätzlich noch davon aus, dass es eventuell mehrere csRNA Zielgene an der β -Laktamresistenz beteiligt sind, wären die Effekte hier sehr gering. Da aber auch Schwierigkeiten beim Arbeiten mit einem hyperaktiven *ciaH202*-Allel, in welchem allerdings der Resistenzphänotyp gut zu beobachten ist, auftreten, sollte man erst einmal auf den Wildtyp und das induzierbare pTEX zurückgreifen. Hier könnte man die Gene einzeln und in Kombination auch mit schon bekannten Zielgenen deletieren und durch Resistenzmessungen in kleinen Abständen eventuell einen Effekt erkennen. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Translation der Gene *pfbA-galE*, *thmA* und spr0970 tatsächlich durch die csRNAs reguliert wird.

Sollte sich dies für eines oder mehrere dieser Gene bestätigen, sollten auch diese auf ihren Zusammenhang mit der β -Laktamresistenz hin untersucht werden. Im Falle von spr0970 wäre es interessant zu wissen, ob eine mögliche Regulation tatsächlich einen Effekt auf spr0969 ausübt und was passiert wenn man die L-Aminosäureligase (spr0969) in Kombination mit dem schon bekannten Zielgen *brnQ*, welches für einen Transporter für verzweigte Aminosäuren kodiert, deletiert. Im Zuge dessen könnte auch eine Kombination der bereits beschriebenen csRNA Zielgene untersucht werden. Da davon auszugehen ist, dass die hohe Resistenz in *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* *pCcnD* zwar abhängig von der csRNA4 aber durch weitere Zusatzmutationen vermittelt wird, sollte hier die Genomsequenz hilfreich sein um diese Mutationen nachzuweisen. So könnten weitere interessante Regulationsmöglichkeiten der csRNA bezüglich der β -Laktamresistenz identifiziert werden.

5.2 Die Rolle der csRNAs und HtrA während der Kompetenzentwicklung

5.2.1 Additive oder redundante Wirkung der csRNAs?

Die natürliche Kompetenz von *S. pneumoniae* ist dank intensiver Forschungen auf diesem Gebiet sehr gut untersucht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Transformierbarkeit von extra- und intrazellulären Bedingungen wie der Temperatur, dem pH-Wert und der Sauerstoffkonzentration abhängig ist (Tomasz & Hotchkiss, 1964; Chen & Morrison, 1987; Echenique *et al.*, 2000). Allerdings konnte auch eine Regulation durch Oligopeptid-Permeasen (Alloing *et al.*, 1998), Proteasen (Chastanet *et al.*, 2001), Oxidasen (Echenique & Trombe, 2001a) und Zwei-Komponenten Systeme (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Echenique & Trombe, 2001b) nachgewiesen werden. Trotzdem gibt es noch einige offene Fragen bezüglich dieses Regulationsmechanismus (Claverys & Håvarstein, 2002).

Für das Zwei-Komponenten System CiaRH wurde eine inhibitorische Wirkung auf die Kompetenzentwicklung beschrieben (Müller *et al.*, 2011). Schon früh konnte gezeigt werden, dass eine stärkere Aktivierung des CiaRH Systems zu einem Verlust der natürlichen Kompetenz von *S. pneumoniae* R6 führt (Guenzi *et al.*, 1994). Ebenfalls konnte eine Kompetenzentwicklung unter verschiedenen kompetenzinhibierenden Bedingungen, nach Inaktivierung des CiaRH Systems beobachtet werden (Giammarinaro *et al.*, 1999; Echenique *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003; Tsui *et al.*, 2010). Somit kann CiaRH durch Veränderungen in der Aktivität regulatorisch auf die Kompetenzentwicklung wirken. Innerhalb von verschiedenen Transkriptomstudien konnte eine Erhöhung der Transkriptmenge einiger Kompetenzgene nach der CiaRH Inaktivierung nachgewiesen werden (Echenique *et al.*, 2000; Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003). Allerdings konnte in keinem dieser Kompetenzgene eine CiaR-Bindestelle identifiziert werden (Halfmann *et al.*, 2007b). Daher muss es sich hierbei um einen indirekten Effekt auf die Kompetenz handeln, welcher durch Genprodukte des CiaR-Regulons vermittelt wird. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sowohl die vom CiaR-regulierte Serinprotease als auch die csRNAs einen Einfluss auf die Kompetenzentwicklung haben.

Für den Effekt der Serinprotease HtrA auf die Kompetenzentwicklung wurden widersprüchliche Beobachtungen gemacht. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von HtrA den Kompetenzeffekt, der durch eine Hyperaktivierung von CiaH (CiaH-T230P) verursacht wird, teilweise aufheben kann (Sebert *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2011). Zum anderen wurde in weiteren Studien ein inhibitorischer Effekt von HtrA auf die Kompetenz beobachtet (Ibrahim *et al.*, 2004b). Die Vermutung, dass HtrA die membranständige Histidinkinase ComD proteolytisch abbaut, konnte anhand von Western Blot Analysen nicht bestätigt werden (Sebert *et al.*, 2005). In neueren Studien

konnte nun gezeigt werden, dass HtrA das Kompetenz stimulierende Peptid CSP abbaut und dadurch negativ auf die Kompetenzentwicklung wirkt (Cassone *et al.*, 2012).

Allerdings konnte gezeigt werden, dass dieser HtrA Effekt nicht stark genug ist um die Kompetenzentwicklung in einem Stamm mit hyperaktiven *ciaH202*-Allel in Kombination mit einer Deletion aller csRNAs weiterhin zu unterdrücken (Müller, 2011). Eine zusätzliche *htrA* Deletion war allerdings nötig, um die Kompetenz des Stammes *S. pneumoniae* R6 Δ *ccnA-E* in dem kompetenzinhibierenden Medium BHI zu gewährleisten (Müller, 2011).

Bei dem beobachteten kompetenzinhibitorischen Effekt des CiaRH Systems scheint es sich um ein Zusammenspiel zwischen der Serinprotease HtrA und den csRNAs zu handeln.

Da bis dato nur der Effekt einer Deletion aller csRNAs untersucht wurde, liegt das Augenmerk in dieser Arbeit nun auf dem Effekt einzelner csRNAs. Aufgrund des beobachteten HtrA Effekts wurde auch eine *htrA* Deletion in diesem Zusammenhang untersucht.

In dieser Arbeit konnten unterschiedliche Ergebnisse der Wirkung einzelner csRNAs auf die Kompetenz ermittelt werden. Die Ergebnisse der Transformationstests in dem Stamm mit hyperaktiven *ciaH202*-Allel lassen auf eine redundante Wirkung der csRNAs schließen, wobei nur bei csRNA4 und csRNA5 ein negativer Effekt auf die Transformierbarkeit beobachtet wurde (Abb. 4.6). Die Ergebnisse des induzierbaren *ciaH202*-Allels und des Wildtyp Stammes in BHI Medium, welche durch β -Galaktosidaseassays ermittelt wurden, sprechen dagegen klar für eine additive Wirkung der csRNAs auf die Kompetenzentwicklung (Abb. 4.19, 4.20, 4.22). Aufgrund der schon im Zusammenhang mit der β -Laktamresistenz diskutierten Instabilität der Stämme mit *ciaH202*-Allel ist von einer additiven Wirkung der csRNAs auszugehen.

Innerhalb dieser Ergebnisse ist weiterhin die Rolle von HtrA als weiterer negativer Faktor auf die Kompetenz, zu beobachten. Die Kombination aus *htrA* und csRNA Deletion führt in beiden Fällen zur Transformierbarkeit. Eine einzelne csRNA ist nicht in der Lage die Kompetenzentwicklung wieder zu unterdrücken. Allerdings ist die Transformierbarkeit in den Stämmen mit den csRNA Kombinationen, csRNA1 und csRNA2 oder csRNA1, csRNA2 und csRNA3 vollständig inhibiert, wenn die Serinprotease aktiv ist. Nach der *htrA* Deletion ist nur noch die Kombination aus csRNA1, csRNA2 und csRNA3 in der Lage, die Kompetenz zu unterdrücken. Diese Ergebnisse sprechen klar für eine additive Wirkung der csRNAs auf die Kompetenzentwicklung. Die Beobachtung, dass die Überexpression oder Deletion einer einzelnen csRNA, csRNA1, nicht zu starken Veränderungen in den CiaRH vermittelten Phänotypen bewirkt (Tsui *et al.*, 2010), kann ebenfalls über diese additive Wirkung erklärt werden.

Eine solch additive Wirkung konnte auch für die Qrr sRNAs in *V. harveyi* nachgewiesen werden. Hier werden alle fünf Qrr sRNAs benötigt, um den von ihnen kontrollierten Transkriptionsregulator zu reprimieren. In *V. cholerae* dagegen ist die Wirkung der vier Qrr sRNAs redundant, was bedeutet, dass das Vorhandensein einer einzelnen sRNA ausreicht um den Transkriptionsregulator zu reprimieren

Lenz *et al.*, 2004; Tu & Bassler, 2007; Svenningsen *et al.*, 2009). Nach neueren Studien gibt es Hinweise darauf, dass die Affinität der Qrr sRNAs und ihre Expression relativ zu dem transkriptionellen Regulator für das Niveau der Redundanz sowohl in *V. harveyi* als auch *V. cholerae* verantwortlich sind. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die additiven und redundanten Qrr Phänotypen Unterschiede in der Hfq-Qrr Konzentration in *V. harveyi* und *V. cholerae* wieder spiegeln (Hunter & Keener, 2013). In allen verfügbaren Streptokokken Genomen konnten csRNA Gene identifiziert werden, wobei in manchen Genomen nur zwei, in anderen bis zu sechs csRNA Gene vorkommen (Marx *et al.*, 2010). Es wäre denkbar, dass auch in manchen Streptokokken eine additive, in anderen eine redundante Wirkungsweise der csRNAs zu beobachten ist.

Außerhalb der beobachteten additiven Wirkung der csRNAs konnte ein positiver Effekt der csRNA4 und csRNA5 auf den hier getesteten frühen Kompetenzpromotor P_{comX} nachgewiesen werden (Abb. 4.19, Abb. 4.22). Schon in früheren Arbeiten wurde beobachtet, dass durch eine Deletion aller csRNAs ein negativer Effekt auf die *comX*-Promotorfusion sowie auf die *comX*-Translationsfusion zu beobachten ist (Kaysen, 2012). Bei der Induktion von csRNA4 und csRNA5 kommt es zu einer 2,3 bzw. 2,8 fachen Steigerung der Aktivität. Hierbei stellt sich die Frage, ob dieser positive Effekt der csRNA4 und csRNA5 auch bei weiteren Kompetenz spezifischen Promotoren zu beobachten ist.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die ComE abhängige Aktivierung der frühen Kompetenzgene durch das Genprodukt des späten Kompetenzgens *dprA* vermindert wird, worüber die Abschaltung der Kompetenz vermittelt wird (Mirouze *et al.*, 2013). Allerdings ist hierbei nicht klar, ob DprA die Bindung des ComE~P an die frühen Kompetenzpromotoren oder die Phosphorylierung selbst beeinflusst.

Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine unterschiedliche transkriptionelle Aktivierung und Repression der frühen Kompetenzpromotoren P_{comC} und P_{comX} . Die Bindung von ComE~P an den frühen Kompetenzpromotor P_{comC} ist wesentlich schwächer als die Bindung an P_{comX} (Martin *et al.*, 2013).

Ein Effekt der csRNAs auf diesen Prozess ist eher unwahrscheinlich. Zum einen konnte in dieser Arbeit kein Unterschied in der positiven Wirkung der csRNA4 und csRNA5 auf die Promotoren P_{comC} und P_{comX} beobachtet werden (Abb. 4.30). Zum anderen konnte auch gezeigt werden, dass dieser positive Effekt nicht auf die späten Kompetenzgene übertragen wird, da kein Effekt auf den Promotor des späten Kompetenzgens P_{cib} zu beobachten ist (Abb. 4.26). Dies würde bedeuten, dass dieser positive Effekt ausschließlich die CSP Produktion und den Transport verstärkt, aber nicht die Aufnahme und Integration der DNA erhöht.

Dass dieser positive Effekt auf die Promotoren und nicht auf eine post-transkriptionelle Kontrolle der *comC*-Translation zurück zu führen ist, zeigen die *comC*-Translationsfusionen (Abb. 4.28). Hier steht die *comC*-Transkription unter Kontrolle des konstitutiven Promotors P_{vegT} . Da innerhalb dieser Versuche kein positiver Effekt von csRNA4 oder csRNA5 zu beobachten ist, muss dieser über den Promotor vermittelt werden. Generell ist aufgrund der Bindung an einzelsträngige DNA/RNA

Moleküle von einer post-transkriptionellen Wirkung der csRNAs auszugehen. Das bedeutet, dass der positive Effekt der csRNA4 und csRNA5 indirekt auf den Promotor vermittelt wird.

5.2.2 Zeitliche Koordination der Kompetenzentwicklung

Im Gegensatz zu bisherigen Daten, in welchen kein Unterschied zwischen der Aktivität in *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ und dem csRNA Deletionsstamm zu erkennen war, zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Tests einen Unterschied im Verlauf der Kompetenz dieser beiden Stämme (Abb.4.23). Der Stamm *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ zeigt erst nach etwa 90 min Kompetenzentwicklung und erreicht sein Maximum schon nach 120 min. Der csRNA Deletionsstamm hingegen zeigt schon nach 30 min Aktivität, die über die gesamte Messung hinweg ansteigt. Es könnte daher sein, dass die csRNAs für die zeitliche Koordinierung der Kompetenzentwicklung verantwortlich sind.

Die Kompetenzinduktion in *S. pneumoniae* wird von einem autokatalytischen Quorum-sensing System gesteuert, welches aus dem Zwei-Komponenten System ComDE, dem Kompetenzpheromon CSP und dem ABC-Transporter ComAB besteht. ComAB exportiert und prozessiert das sogenannte Pre-CSP, das von dem Gen *comC* kodiert wird (Hui *et al.*, 1995; Håvarstein *et al.*, 1995). Erreicht die Konzentration von CSP in der Umgebung einen definierten Schwellenwert, kommt es zur Stimulation der Histidinkinase ComD und darüber zur Phosphorylierung des Response Regulators ComE (Håvarstein *et al.*, 1996; Pestova *et al.*, 1996). Über dieses Quorum-sensing System werden in etwa zweihundert Kompetenz verbundene Gene reguliert (Peterson *et al.*, 2004). Es wäre denkbar, dass die csRNAs an der Feinregulation dieses Quorum sensing Systems beteiligt sind.

Tatsächlich lassen sich Unterschiede im Kompetenzverlauf der Stämme mit einzelnen csRNAs beobachten (Abb. 4.24). Wobei die Stämme, welche lediglich csRNA1, csRNA2 oder csRNA3 enthalten einen relativ gleichen Verlauf zeigen. Eine vollständige Induktion der Kompetenz ist in diesen Stämmen im Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 $\Delta htrA$ und vor allem zum csRNA-Deletionsstamm verzögert. Eine noch stärkere Verzögerung der Kompetenzinduktion lässt sich in dem Stamm mit csRNA4 beobachten. Allerdings erreicht dieser Stamm nach der Kompetenzinduktion eine wesentlich höhere Aktivität. Eine noch stärkere Aktivität lässt sich in dem Stamm mit csRNA5 nachweisen, welcher allerdings wesentlich früher schon Aktivität zeigt. Der positive Effekt von csRNA4 und csRNA5 ist also auch während des Kompetenzverlaufs zu erkennen. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass csRNA1, csRNA2, csRNA3 und vor allem csRNA4 die Kompetenzentwicklung zu einem Teil reprimieren, wohingegen csRNA4 und csRNA5 die Kompetenzentwicklung verstärken.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Basalexpression von *comCDE* von ComD und ComE aber nicht von CSP abhängig ist (Martin *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass das von Pestova *et al.*, 1996 beschriebene überlesen des tRNA_{Arg} Terminators nicht für die CSP Produktion, sondern für das Aufrechterhalten der ComD-ComE Menge entscheidend ist.

Hierbei könnten die csRNAs durch ihre einerseits negative aber andererseits positive Wirkung auf die Kompetenzentwicklung eine bedeutende Rolle spielen. Da die Expression aller Kompetenzgene für die Zelle einen erheblichen Stress darstellt, ist es wichtig den zeitlichen Ablauf genau zu koordinieren. Es wäre denkbar, dass die csRNA1, csRNA2, csRNA3 und csRNA4 die Kompetenzentwicklung zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase eine gewisse Zeit reprimieren. Hierdurch könnte zum Beispiel sichergestellt werden, dass genügend ComD und ComE produziert wurde um anschließend eine vollständige Kompetenzentwicklung in der Zelle zu garantieren. Wird dann ein bestimmter Schwellenwert überschritten, wirken die csRNA4 und csRNA5 verstärkend und garantieren so einen reibungslosen Ablauf der Kompetenz. Allerdings verwendeten Martin et al., 2010 eine *comC* Deletion, bei welcher das Startkodon des *comC* direkt an ComD fusioniert wurde. Da die csRNAs auch upstream des Startkodons an die *comC* mRNA binden, wurde mithilfe des Programms IntraRNA eine mögliche Bindung der csRNAs an die veränderte *comDE* mRNA untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die csRNAs auf diese *comDE* Fusion in etwa mit der gleichen Bindungsenergie bindet, wie zuvor an die *comC* mRNA. Das bedeutet, dass Martin et al., 2010 zwar *comC* deletiert haben, aber wahrscheinlich den negativen Effekt der csRNAs auf die *comDE* Translation übertragen haben. Hierbei kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass csRNA4 und csRNA5 weiterhin einen positiven Effekt ausüben. Eine Interpretation dieser Daten gestaltet sich daher schwieriger.

Generell handelt es sich bei der Wirkung der csRNAs auf die Kompetenz um eine negative Feedback Regulation, da in früheren Arbeiten nicht nur ein negativer Effekt von CiaRH auf die Kompetenz sondern auch ein positiver Effekt der Kompetenz auf CiaRH beobachtet wurde (Kaysen, 2012). Das bedeutet, wenn die Kompetenz stark induziert ist, bewirkt dies eine Aktivierung des CiaRH Systems, welches wiederum über die csRNAs und HtrA negativ auf die Kompetenz wirkt.

Es werden drei Gruppen von negativen Feedback Regulationen beschrieben, welche unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Zum einen reduzieren sie zellulären „Noise“, welcher durch zeitliche Schwankungen oder Zell-Zell Variationen entsteht (Beckskei & Serrano, 2000; Thattai & van Oudenaarden, 2001). Zum anderen können sie die Reaktionszeit negativ beeinflussen (Rosenfeld *et al.*, 2002) oder die Stärke der Antwort reduzieren (Nevozhay *et al.*, 2009).

In neueren Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass die Funktion der Qrr sRNAs aus *V. harveyi* darin besteht, die Sensitivität des Quorum-sensing Systems auf den Reiz anzupassen. Dadurch definieren diese sRNAs den genauen Zeitpunkt, an welchem ein Schwellenwert erreicht wird und regulieren so die zeitliche Koordination, der durch diese Quorum-sensing System regulierten Gene (Tu *et al.*, 2010). Der spezielle Aufbau dieser LuxO-Qrr negativen Feedback Regulation verhindert eine Überproduktion der Qrr sRNAs und vermeidet so, dass ihre Zielgene nicht auf ein extrem niedriges Level absinken. Auch dieser negative Effekt basiert nicht allein auf der post-transkriptionellen Kontrolle der sRNAs, sondern auch auf der Autorepression des zentralen Regulators LuxO.

Dies lässt sich auch bei der durch das CiaRH System vermittelten Repression der Kompetenz beobachten, bei der die Serinprotease HtrA zusammen mit den csRNAs eine negative Wirkung auf die Kompetenz aber auch auf das CiaRH System selbst vermitteln.

5.2.3 *ComC*- das Kompetenz spezifisches Zielgen der csRNAs

Im Gegensatz zu den Qrr sRNAs in *V. harveyi*, für welche das Zielgen, der Transkriptionsregulator LuxR, identifiziert ist, konnte das Kompetenz spezifische Zielgen der csRNAs bis dato noch nicht bestimmt werden.

Eine additive Wirkung, welche wahrscheinlich durch die hohe Ähnlichkeit zustande kommt, konnte bereits nachgewiesen werden. Die csRNAs bestehen aus zwei Stammschleifen mit einem ungepaarten Bereich in der Mitte. In diesem Bereich enthalten alle csRNAs eine Anti-Shine-Dalgarno Sequenz und ein Anti-AUG (Halfmann *et al.*, 2007b). Aufgrund dieses Aufbaus ist davon auszugehen, dass die csRNAs, durch eine Bindung an die Shine-Dalgarno Sequenz (Shine & Dalgarno, 1974), negativ auf die Translation eines Kompetenz spezifischen Gens wirken (Baker *et al.*, 2007). Tatsächlich zeigt eine Computer basierte Hybridisierung der csRNAs mit den bereits bekannten Zielgenen in allen Fällen eine Bindung innerhalb dieser Region (Schnorpfel *et al.*, 2013). Während der Proteinsynthese ist die Initiation der Translation der Geschwindigkeit bestimmende und am stärksten regulierte Schritt (Kozak, 1999). Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die RNA-RNA Interaktion zwischen der mRNA, der 16S rRNA und der Initiator tRNA. Jegliche RNA Struktur, welche diese Interaktion verhindert, wirkt somit negativ auf die Translationsinitiation (de Smit & van Duin, 1990).

Alle bekannten csRNA Zielgene wurden mittels Computer basierter Suche identifiziert und anschließend mithilfe von Translationsfusionen bestätigt. Innerhalb der bei der Zielgensuche identifizierten potenziellen Zielgene befindet sich das frühe Kompetenzgen *comC*.

Eine negative Wirkung der csRNA1 auf die Kompetenz konnte bereits beobachtet werden, allerdings konnte *comC*, obwohl es Hinweise darauf gibt (Kovács, 2009; Tsui *et al.*, 2010), nicht eindeutig als Zielgen der csRNA1 verifiziert werden (Tsui *et al.*, 2010). Durch sogenannte Bandshift-Assays konnte allerdings eine *in vitro* Bindung der csRNAs an die *comC* mRNA nachgewiesen werden (Kovács, 2009).

Innerhalb dieser Arbeit konnte ein negativer Effekt aller csRNAs auf die *comC*-Translation nachgewiesen werden (Abb. 4.27). Durch die Deletion aller csRNAs in *S.pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaH202* steigt die Aktivität von 12 bzw. 3 Units auf etwa 100 Units an. Die Transkription in diesen *comC*-Translationsfusionen ist durch den konstitutiven Promotor P_{vegT} kontrolliert. Des Weiteren konnte auch hier eine additive Wirkung der csRNAs auf die Translation der *comC* mRNA nachgewiesen werden. Hierbei ist wie schon bei den P_{comX} Promotormessungen kein Unterschied in der Stärke zwischen csRNA1, csRNA2 und csRNA3 zu erkennen (Abb.4.28). Die stärkste negative Wirkung auf die *comC*-Translation ist hier bei csRNA4, der schwächste negative

Effekt durch csRNA5 zu beobachten. Diese schwächere negative Wirkung könnte mit ein Grund für die noch stärkere positive Wirkung der csRNA5 auf den Promotor P_{comX} erklären. Es wäre denkbar, dass sowohl csRNA4 und csRNA5 in gleicher Stärke positiv auf den Promotor P_{comX} wirken. Da aber csRNA5 die anschließende *comC*-Translation weniger stark inhibiert, ist die Summe des positiven Effekts hier stärker. Auch die schon sehr früh einsetzende starke Kompetenz in dem Stamm mit csRNA5 (Abb. 4.24) im Vergleich zu dem csRNA4 Stamm, könnte durch die verminderte negative Wirkung der csRNA5 auf die *comC*-Translation vermittelt sein. Eine Verstärkung des negativen Effekts auf die *comC*-Translation konnte für alle csRNAs durch eine stärkere Expression durch den Promotor P_{vegT} nachgewiesen werden. Der geringste Effekt durch diese stärkere Expression ist für csRNA3 zu beobachten. Da csRNA3 den mit 2000 Units stärksten nativen Promotor der csRNAs besitzt (Halfmann *et al.*, 2007b), wird die Expression durch den konstitutiven Promotor P_{vegT} in diesem Fall nicht sehr stark erhöht. In den übrigen Stämmen ist die Repression der *comC*-Translation zwischen 1,3- und 1,6-fach stärker durch den konstitutiven Promotor P_{vegT} . Wie schon bei der β -Laktamresistenz beobachtet, führt eine Erhöhung der csRNA Menge zu einem stärkeren Effekt. Auch hier könnte, wie schon beim Promotor P_{comX} beobachtet, eine Kombination einzelner csRNAs zu einer vollständigen Inhibierung der *comC*-Translation führen. Innerhalb dieser Arbeit konnte somit klar gezeigt werden, dass der beobachtete negative Effekt der csRNAs auf die Kompetenzentwicklung durch eine Reprimierung der *comC*-Translation vermittelt wird.

5.2.4 Komplementarität der csRNAs mit der *comC* mRNA

Im Gegensatz zu früheren Arbeiten konnte innerhalb dieser Arbeit *comC* als ein Kompetenz spezifisches Zielgen der csRNAs identifiziert werden. Allerdings wurde in der früheren Studie ein anderer Ansatz zur Verifizierung von *comC* als Zielgen durchgeführt. Hierbei wurden Mutationen in die *comC* mRNA eingebracht und die *comD* Transkriptmenge bestimmt. Hierbei konnten keine Veränderungen festgestellt werden (Tsui *et al.*, 2010). Als eventuelle Erklärung hierfür wurde ein mögliches Überlagern des csRNA Effekts durch die negative Wirkung der Serinprotease HtrA diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Mutationen in die *comC* mRNA eingebracht. Hierdurch sollten allerdings Bereiche identifiziert werden, welche für die Interaktion mit den csRNAs entscheidend sind. Im Zuge dessen wurden auch die von Tsui *et al.*, 2010 eingebrachten Veränderungen genauer betrachtet. Dabei viel auf, dass diese eingebrachten Veränderungen in der *comC* mRNA eine Basenpaarung mit der Shine-Dalgarno Sequenz ausbilden können. Hierdurch würde sich eine Stammschleife in der mRNA bilden, welche den Zugang der Ribosomen an die Shine-Dalgarno Sequenz verhindert und somit die Translation inhibiert. Es könnte sein, dass daher keine

Unterschiede in den einzelnen Stämmen zu beobachten waren und daher *comC* fälschlicherweise als Zielgen ausgeschlossen wurde.

In dieser Arbeit wurde daher darauf geachtet, dass die eingebrachten Mutationen keine große Komplementarität zur Shine-Dalgarno Sequenz aufweisen (Abb. 4.29).

Die meisten der bis dato identifizierten negativ wirkenden sRNAs binden direkt an die Shine-Dalgarno Sequenz oder das Startkodon, wodurch das Binden der 30S ribosomalen Untereinheit verhindert wird (Desnoyers *et al.*, 2013).

Allerdings gibt es auch Studien die zeigen, dass ein Binden der sRNAs im kodierenden Bereich ebenfalls die Translation inhibieren kann. Ein Beispiel hierfür sind die RybB sRNA aus *Salmonella*, die OmrA sRNA aus *E. coli* und die SR1 sRNA aus *B. subtilis*. Die RybB und die OmrA sRNA binden die mRNA von *ompN* bzw. *optT* downstream des Startkodons (Bouvier *et al.*, 2008; Guillier & Gottesman, 2008). Im Fall von RybB konnte gezeigt werden, dass für die Inhibition der Translation die Bindung der sRNA an die ersten 19 Basen der kodierenden Sequenz entscheidend ist. In diesem Bereich der mRNA, genauer von Base -20 bis +19 vom Startkodon aus gesehen, konnte eine Interaktion der mRNA mit der 30S Untereinheit nachgewiesen werden (Beyer *et al.*, 1994; Hüttenhofer & Noller, 1994). Eine Bindung innerhalb dieses Bereiches verhindert somit die Bindung der 30S Untereinheit an die mRNA.

Eine Ausnahme stellt hier die SR1 sRNA aus *B. subtilis* dar, welche die mRNA seines Zielgenes *ahrC* erst bei der Base +80 bindet. Hierdurch kommt es allerdings zu strukturellen Veränderungen im Bereich downstream des Startkodons (Heidrich *et al.*, 2007).

Die Relevanz dieses Bereiches konnte innerhalb dieser Arbeit auch für die Interaktion zwischen den csRNAs und der *comC* mRNA nachgewiesen werden. Hier zeigte sich, dass die Deletion des Bereiches downstream des Startkodons, in der Mutante *comC-M*, zu einem vollständigen Verlust der Repression durch die csRNAs führt (Abb. 4.30). Ein Unterschied in den Stämmen mit und ohne csRNAs ist nicht zu erkennen. In dieser *comC-L* Variante ist allerdings auch ein deutlicher Abfall der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp *comC* zu beobachten. Da diese Region für die Interaktion der 30S Untereinheit mit der mRNA von Bedeutung ist, wäre es durchaus möglich, dass die direkte Fusion des Startkodons an das *lacZ* Gen diesen Aktivitätsabfall bewirkt.

Durch weitere Mutationen, in der *comC8* Variante, konnte die Bedeutung des Bereiches zwischen der Shine-Dalgarno Sequenz und dem Startkodon nachgewiesen werden. Hierbei wurden, wie schon in der Arbeit von Tsui *et al.*, 2010, sämtliche Basen verändert. Hierdurch sollte die Bindung der mRNA mit den csRNAs gestört werden. Allerdings wurde bei diesen Mutationen darauf geachtet, dass sie keine Komplementarität zu der Shine-Dalgarno Sequenz besitzen. Auch hier ist die Repression der *comC*-Translation durch die csRNAs vollständig aufgehoben (Abb. 4.30). Allerdings ist hier nicht, wie bei der *comC-M* Variante, die Aktivität der Translation an sich betroffen. Schon in früheren Arbeiten

konnte die Relevanz der Bindung innerhalb dieses Bereiches beobachtet werden. So bricht z.B die Regulation der *luxO* mRNA durch die Qrr4 sRNA vollständig zusammen, wenn eine einzige Base zwischen der Shine-Dalgarno Sequenz und dem Startkodon in der mRNA oder in der sRNA verändert wird (Tu *et al.*, 2010). Die Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass Mutationen in der sRNA oder in der mRNA denselben Effekt bewirken. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass das Entfernen einer einzigen Wasserstoffbrücke innerhalb dieses Bereiches das Binden der sRNA an die mRNA verhindert (Papenfort *et al.*, 2012).

Anhand der *comC-L* Variante konnte auch nachgewiesen werden, dass die Stabilität der mRNA einen Effekt auf die Wirkung der sRNA hat. Hier wurden Mutationen in die erste Stammschleife der mRNA eingebracht, wodurch deren Stabilität maßgeblich beeinträchtigt wird. Auch hier zeigen sich keine Unterschiede in den Stämmen mit und ohne den csRNAs (Abb. 4.30). Hier ist, wie auch bei der *comC-M* Variante, ein starker Abfall in der Aktivität zu beobachten. Es ist wahrscheinlich, dass durch die stärkere Instabilität, diese mRNA Form stärker abgebaut wird und daher weniger mRNA für die Translation zur Verfügung steht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Bildung einer 5'-Stammschleife die mRNA von *ompA* und *papA* in *E. coli* maßgeblich stabilisiert (Emory *et al.*, 1992; Bricker & Belasco, 1999). Austausch in der 5'-Stammschleife oder die Gegenwart von drei bis fünf Nukleotiden upstream der Stammschleife, wodurch ein zugängliches 5'-Ende zustande kommt, heben diese Stabilisierung auf (Emory *et al.*, 1992; Bouvet & Belasco, 1992). Obwohl in Eukaryoten der 5'-3'-mRNA Abbau gut beschrieben ist, bestand die weitgehende Meinung, dass bakterielle RNasen die mRNA nur in 3'-5'-Richtung abbauen können (Mathy *et al.*, 2007). Allerdings konnte bereits in *E. coli* gezeigt werden, dass RNase E an das 5'-Monophosphat der mRNA bindet und den Abbau der mRNA in 5'-3'-Richtung katalysiert (Coburn & Mackie, 1999; Grunberg-Manago, 1999; Kushner, 2002).

Auch in *B. subtilis* konnte die stabilisierende Wirkung der 5'-Stammschleife nachgewiesen werden (Sharp & Bechhofer, 2005), allerdings enthält das *B. subtilis* Genom kein RNase E Homolog. Neuere Studien konnten aber nachweisen, dass die weit verbreitete RNase J1 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt (Mathy *et al.*, 2007).

Die Anwesenheit solcher 5'-3'-Exoribonukleasen wäre eine Erklärung für die beobachtete stabilisierende Wirkung von 5'-mRNA Stammschleifen. In *S. pneumoniae* konnten zwar homologe Gene identifiziert werden, zu deren Funktionen ist allerdings noch nichts bekannt.

Zusammenfassend konnten mithilfe der in dieser Arbeit konstruierten *comC* Mutanten gezeigt werden, dass die Stabilität, der Bereich zwischen Shine-Dalgarno Sequenz und Startkodon, sowie der vom Startkodon downstream gelegene Bereich der mRNA für die Interaktion mit den csRNA relevant sind.

Die Ergebnisse der Translationsfusionen lassen den Schluss zu, dass die *comC8* Variante in etwa die gleiche Expressionsstärke wie das Wildtyp *comC* aufweist, allerdings nicht mehr durch die csRNAs reguliert wird. In weiteren Versuchen mit dieser *comC8* Variante konnte gezeigt werden, dass diese verminderte Wirkung der csRNAs ausreichend ist um zum einen eine Kompetenzentwicklung in dem Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel zu gewährleisten (Abb. 4.32). Zum anderen ist die Kompetenzentwicklung in dem Kompetenz inhibierenden BHI Medium sogar ohne *htrA* Deletion ermöglicht (Abb. 4.33). Die etwas höhere Expression der *comC8* Variante (Abb. 4.31) könnte zu einer erhöhten CSP Produktion führen. Da keine Veränderungen in die kodierende Sequenz von *comC* eingebracht wurden, ist davon auszugehen, dass HtrA auch hier in der Lage ist das produzierte CSP zu prozessieren (Cassone *et al.*, 2012). Wahrscheinlich ist die Menge an CSP, welches in der *comC8* Variante akkumuliert, zu hoch. HtrA ist dann nicht mehr in der Lage die CSP Konzentration unterhalb des Schwellenwerts zu halten und es kommt zur Kompetenzinduktion.

Zum Kompetenzverlauf dieses Stammes lässt sich sagen, dass dieser sich von den zuvor getesteten Stämmen unterscheidet. Eine Gemeinsamkeit mit *S. pneumoniae* R6 ist der Verlauf des Aktivitätsanstieges. In beiden Stämmen wird das Maximum relativ direkt nach der Kompetenzinduktion erreicht (Abb. 4.34 und Abb. 4.23). Allerdings ist die Aktivität in dem *comC8* Stamm deutlich höher, was für eine Gemeinsamkeit mit den Stämmen *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCE$ und *S. pneumoniae* R6 $\Delta ccnABCD$ spricht. Trotzdem wird keine so starke Aktivität wie in diesen beiden Stämmen erreicht. Dies könnte darauf hindeuten, dass durch die Veränderung in *comC8* nicht nur der negative Effekt auf die *comC*-Translation, sondern auch der positive Effekt auf den Promotor leicht beeinträchtigt wird.

Da es bisher keinen Hinweis darauf gibt, wie die csRNAs auf die Promotoren der frühen Kompetenzgene wirken, kann hier nur spekuliert werden.

Einen weiteren Hinweis auf diese positive Regulation konnte durch die Veränderungen in den csRNAs gewonnen werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die *comC*-Translation nicht durch die *ccnD-AA* Veränderung beeinflusst wird (Abb. 4.43). Ganz im Gegensatz zur Kompetenzinduktion, welche anhand des Promotors P_{comX} ermittelt wurde. Hier ist ein starker Abfall in der Aktivität zu beobachten (Abb. 4.42). Obwohl die eingebrachte *ccnD-AA* Mutation die berechnete Bindung der csRNA4 an die *comC* mRNA im Bereich zwischen der Shine-Dalgarno und dem Startkodon verbessern sollte (Abb. 4.40), konnte keine Verbesserung des reprimierenden Effekts auf die *comC*-Translation detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass durch diese Mutation, der über die csRNA4 positiv auf den Promotor P_{comX} vermittelte Effekt, reprimiert wird.

Da die *comC8* Mutation, in welcher die Veränderungen ebenfalls in diesem Bereich liegen, einen deutlichen Effekt zeigte, ist schon davon auszugehen, dass die berechnete Bindung für diesen Bereich korrekt ist. In wie weit sich diese Veränderungen in der csRNA4 auf die Stabilität dieser auswirkt, ist allerdings nicht klar.

Dass die Stabilität von sRNAs einen Einfluss auf deren regulatorische Wirkung hat, konnte bereits für die MicA sRNA in *E.coli* nachgewiesen werden (Andrade *et al.*, 2013). Unterschiede in der Sekundärstruktur werden hier genutzt um die verschiedenen Zielgene zu regulieren.

Auch konnte gezeigt werden, dass eine sRNA an mehrere Bindestellen in der mRNA eines Zielgenes binden und darüber die Effizienz und Stringenz ihrer Regulation steuert (Rice *et al.*, 2012). Hier wurde vermutet, dass diese Art der Bindung für die Koordination der Regulation von mehreren Genen in einem Operon nützlich sein könnte.

Für die *comC8*-Translationsfusion konnte eine deutliche Reprimierung der *comC8*-Translation nachgewiesen werden. Hierdurch wird deutlich, dass die veränderte csRNA4 (*ccnD-C8c*) wieder an die veränderte *comC8* mRNA binden kann und darüber einen negativen Effekt auf die Translation ausübt (4.39). Daher ist auch die Kompetenzentwicklung in dem Stamm *S. pneumoniae* R6 *comC8* pPP_{*comX*} durch das Einbringen dieser *ccnD-C8c* stark reprimiert. Da kein Unterschied zu erkennen ist, wenn diese veränderte csRNA4 als fünfte oder sechste RNA vorliegt, ist davon auszugehen, dass nur diese veränderte csRNA in der Lage, ist die Translation der veränderten *comC8* mRNA zu reprimieren. Es ist bekannt, dass schon kleine Veränderungen in dem hybridisierenden Bereich zum vollständigen Verlust der Regulation führen können. So bricht z.B die Regulation der *luxO* mRNA durch die Qrr4 sRNA vollständig zusammen, wenn eine einzige Base zwischen der Shine-Dalgarno Sequenz und dem Startkodon in der mRNA oder in der sRNA verändert wird (Tu *et al.*, 2010).

Innerhalb dieses Versuches lässt sich allerdings beobachten, dass die Aktivität des Stammes *S. pneumoniae* R6 *comC8* pPP_{*comX*} *ccnD-C8c* bei etwa 150 Units liegt. Dies entspricht der Aktivität des Promotors P_{*comX*} in den Stämmen mit csRNA1, csRNA2 und csRNA3 in Kombination mit einer *htrA* Deletion (Abb. 4.22). Für den Stamm mit csRNA4 in Kombination mit der *htrA* Deletion konnte eine doppelt so hohe Aktivität nachgewiesen werden. Entweder die Veränderungen in der csRNA4 haben auch einen Effekt auf die positive Wirkung der csRNAs, oder dieser Abfall ist der Aktivität der Serinprotease *htrA* zuzuordnen.

Einen Hinweis darauf, dass hier die HtrA Aktivität entscheidend ist, zeigt die Deletion der csRNAs in diesem Stamm. Zuvor konnte die Kompetenzinduktion durch die *comC8* Veränderung auch in einem Stamm mit negativ wirkender Serinprotease und den csRNAs deutlich gezeigt werden. Durch eine Deletion der csRNAs innerhalb dieses Stammes sollte sich daran kaum etwas ändern, da der negative Effekt der csRNAs durch die *comC8* Mutation aufgehoben wird. Tatsächlich lässt sich aber eine starke Instabilität dieses Stammes bezüglich der Kompetenz beobachten (Abb.4.37). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das Zusammenspiel von *htrA* und den csRNAs sein und ihre regulatorischen Effekte bezüglich des CiaRH Systems. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion der csRNAs sowie die Deletion von *htrA* zu einem Aktivitätsanstieg im CiaRH System führen (Müller, 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt unabhängig von der Histidinkinase CiaH vermittelt wird (Kaysen, 2012). In dem csRNA Deletionsstamm kommt es daher zu einem zu

einer stärkeren Expression der Serinprotease HtrA, welche wiederum das CSP abbaut. Da innerhalb der kodierenden Sequenz hier keine Veränderungen in *comC* durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, dass auch das vom *comC8* Gen exprimierte CSP abgebaut wird. Zum anderen fehlen in dem csRNA Deletionsstamm auch die positiv auf die Kompetenz wirkenden csRNA4 und csRNA5, was nochmals zu einer Verminderung der Kompetenz führt. Es ist durchaus denkbar, dass ein Zusammenspiel dieser beiden Regulationen für den csRNA Deletionseffekt verantwortlich ist. Tatsächlich konnte innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die csRNA Deletionsstämme eine erhöhte Menge an HtrA aufweisen (Abb. 4.37). Dass sich diese Art der Regulation direkt an dem kritischen Schwellenwert der Kompetenzentwicklung befindet, wird durch die starke Instabilität deutlich.

Bringt man nun in diesen Stamm die negativ auf die *comC8*-Transaktion wirkende *ccnD-C8c*, ein wird diese Instabilität in Richtung der vollständigen Reprimierung stabilisiert (Abb. 4.37). Das Gegenteil wird durch das Einbringen der unveränderten csRNA5 erreicht. Diese csRNA5 ist nicht in der Lage, auf die *comC8*-Transaktion reprimierend zu wirken und eine weiterhin positive Wirkung auf die Promotoren der frühen Kompetenzgene ist aber wahrscheinlich gegeben. Tatsächlich konnte die Instabilität von *S. pneumoniae* R6 *comC8* pPP_{comX} in Richtung einer aktivierten Kompetenzentwicklung relativ stabilisiert werden. Schwankungen sind hier immer noch zu beobachten, allerdings ist die minimale, in diesem Stamm erreichte, Aktivität doppelt so hoch wie die minimale Aktivität in dem Stamm ohne p*CcnE*. Auch handelt es sich bei diesen Ergebnissen um lediglich zwei aus acht Messungen. Daraus lässt sich schließen, dass die csRNA5 hier durchaus noch ihre positive Wirkung entwickeln kann. Da bisher kein Grund dafür besteht anzunehmen, dass csRNA4 und csRNA5 unterschiedlich auf die Promotoren der Kompetenzentwicklung wirken, ist davon auszugehen, dass auch die veränderte *ccnD-C8c* die Kompetenzentwicklung positiv beeinflusst. Was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die in *S. pneumoniae* *ComC8* pPP_{comX} *ccnD-C8c* beobachtete niedrigere Aktivität als in *S. pneumoniae* R6 Δ *ccnABCE* Δ *htrA* tatsächlich auf die Aktivität von HtrA zurück zu führen ist.

Anhand dieser Ergebnisse wird noch einmal der komplexe Aufbau der über das CiaRH System vermittelten Kompetenzregulation deutlich.

5.2.5 Durch die csRNAs vermittelte Kompetenzregulation – ein Überblick

Innerhalb dieser Arbeit konnten wesentliche Aspekte der csRNA abhängigen Kompetenzregulation aufgeklärt werden. Schon in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die Aktivität des CiaRH Systems auf die Kompetenzentwicklung auswirkt (Guenzi *et al.*, 1994).

Die Abbildung 5.4 zeigt einen schematischen Überblick einiger Aspekte der CiaRH vermittelten Kompetenzregulation, in welche die innerhalb dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse aufgenommen sind.

Die Kompetenz in *S. pneumoniae* wird durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren und Bedingungen beeinflusst. Zum Beispiel wird die Kompetenzentwicklung bei niedrigem pH, bei niedriger Sauerstoffkonzentration und in BHI Medium unterdrückt. Für diese Kompetenz unterdrückenden Bedingungen konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von *ciaR* wieder zur Kompetenzentwicklung führt (Echenique *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003; Tsui *et al.*, 2010).

Allerdings ist diese Inhibition der Kompetenz anscheinend nicht direkt über das CiaRH System vermittelt. Es gibt Hinweise darauf, dass die Regulation der Kompetenz durch Sauerstoff über die NADH-Oxidase vermittelt wird, welche sowohl CiaRH, als auch ComDE beeinflusst (Echenique & Trombe, 2001a). Auch konnte gezeigt werden, dass der pH des Mediums einen Effekt auf die Aktivität des CiaRH Systems hat. Die Aktivität des Promotors *htrA* P_{htrA} steigt zwar von pH 7,0 auf pH 7,8 an, fällt dann aber bei höheren pH-Werten ab (Kaysen, 2012).

Auch steigt die Aktivität des CiaRH Systems in den Kompetenz inhibierenden Medien BHI und THB an (Halfmann *et al.*, 2011), allerdings ist dieser Anstieg zu gering um die Kompetenz zu unterdrücken, wie Untersuchungen an ähnlich stark aktivierten *ciaH*-Allelen zeigen (Marx, 2013).

Es wurde vermutet, dass unter den beschriebenen Bedingungen eine Kombination aus einer CiaRH vermittelten und Umwelt bedingten abhängigen Kompetenzinhibition erfolgt.

Tatsächlich konnte in weiteren Arbeiten gezeigt werden, dass die über das CiaRH System vermittelte Kompetenzinhibition zum einen über die csRNAs und zum anderen über die Serinprotease HtrA vermittelt wird (Müller, 2011).

Serinproteasen der HtrA-Familie sind bifunktional, da sie Protease- sowie Chaperonaktivität besitzen (Lipinska *et al.*, 1990; Spiess *et al.*, 1999). Die Möglichkeiten der Serinprotease HtrA in die Kompetenzentwicklung einzugreifen, sind aufgrund der extrazellulären Lokalisation begrenzt. Die Vermutung, dass HtrA die membranständige Histidinkinase ComD proteolytisch abbaut, konnte anhand von Western Blot Analysen nicht bestätigt werden (Sebert *et al.*, 2005). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass HtrA für den Abbau des Kompetenz spezifischen Peptids CSP verantwortlich ist und darüber einen negativen Effekt auf die Kompetenzentwicklung ausübt (Cassone *et al.*, 2012). Dieser negative Effekt von HtrA auf die Kompetenzentwicklung konnte auch innerhalb dieser Arbeit beobachtet werden. Unter kompetenzinhibierenden Bedingungen, in BHI Medium oder im induzierbaren *ciaH202* Hintergrund, ist eine Kompetenzentwicklung der einzelnen csRNA-Deletionsstämme nur in Kombination mit einer *htrA*-Deletion zu beobachten.

Außerdem hat die Aktivität von HtrA wiederum einen Effekt auf die Aktivität von CiaR. So konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung der Serinprotease HtrA zu einem Aktivitätsanstieg CiaR-abhängiger Promotoren führt (Müller, 2011). Dieser negative Effekt von HtrA auf die Aktivität tritt medienunabhängig auf und ist zum Teil unabhängig von der Histidinkinase CiaH (Shambhu, 2013). Wie genau die extrazelluläre Serinprotease HtrA die Aktivität des im Cytoplasma lokalisierten Response Regulator CiaR beeinflusst, ist hierbei unklar.

Für die csRNAs war bis dato bekannt, dass eine Deletion aller csRNAs die Kompetenzentwicklung unter sonst kompetenzinhibierenden Bedingungen ermöglicht (Müller, 2011; diese Arbeit). Innerhalb dieser Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine additive Wirkung der csRNAs handelt. Einzelne csRNAs sind nicht in der Lage, die Kompetenzentwicklung zu unterdrücken, wohingegen eine Kombination aus mehreren csRNAs durchaus die Transformierbarkeit inhibiert (diese Arbeit). Allerdings ist durchaus ein Unterschied im Verlauf und der Stärke der Kompetenzentwicklung zwischen den einzelnen csRNAs zu beobachten.

Des Weiteren konnte das Gen *comC*, welches für das Kompetenz stimulierende Peptid CSP kodiert, als Zielgen der csRNAs identifiziert werden. Jede einzelne csRNA ist in der Lage, post-transkriptionell die Translation der *comC* mRNA zu vermindern (Abbildung 5.4). Des Weiteren konnten Bereiche auf der *comC* mRNA identifiziert werden, welche für eine Hybridisierung der *comC* mRNA mit den csRNAs bedeutend sind. Hierbei handelt es sich um den Bereich zwischen der Shine-Dalgarno Sequenz und dem Startkodon, sowie der kodierenden Sequenz downstream des Startkodons. Auch die Stabilität der mRNA ist für die Interaktion entscheidend.

Außerhalb dieser negativen Wirkung aller csRNAs auf die *comC* Translation konnte auch ein positiver Effekt der csRNA4 und csRNA5 auf die Promotoren früher Kompetenzgene nachgewiesen werden (Kaysen 2012, diese Arbeit). Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese positive Wirkung nicht auf die späten Kompetenzgene übertragen wird. Dieser Mechanismus erhöht daher die CSP Produktion und den Transport, die Aufnahme von DNA in die eigene Zelle wird allerdings nicht erhöht. Wie genau diese beiden csRNAs einen positiven Einfluss auf die Promotoren der frühen Kompetenzgene nehmen, ist nicht klar. Dass es sich hierbei um einen direkten Prozess handelt kann allerdings ausgeschlossen werden, da sRNAs post-transkriptionelle Regulationen vermitteln, indem sie an einzelsträngige mRNA binden.

Wie auch schon für die Serinprotease HtrA, konnte auch für die csRNAs ein negativer Effekt auf die CiaR Aktivität nachgewiesen werden (Shambhu, 2013; diese Arbeit). Es konnte klar gezeigt werden, dass die Deletion aller csRNAs zu einer Erhöhung der HtrA Menge führt.

Diese beiden beschriebenen Feedback Loops, der Serinprotease HtrA und der csRNAs, sind nicht die einzigen, die die Aktivität des CiaRH Systems beeinflussen. Auch das Kompetenzsystem selbst hat einen Effekt auf die Aktivität des CiaRH Systems. Allerdings hat die Deletion des ABC-Transporters *comAB* oder des Zwei-Komponenten Systems ComDE im Gegensatz zur HtrA oder csRNA Deletion einen negativen Effekt auf die CiaRH Aktivität (Müller, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Serinprotease HtrA, welche stark von CiaR reguliert wird, nach Zugabe von CSP ansteigt (Kaysen, 2012). Allerdings ist unklar, ob die Abwesenheit von ComDE oder ComAB registriert wird, oder ob diese Regulation durch ein Gen vermittelt wird, welches durch ComE oder ComX reguliert wird. Innerhalb der ComX regulierten späten Kompetenzgene befinden sich einige, die offensichtlich nicht für die Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* benötigt werden (Peterson *et al.*, 2004; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Darunter könnten sich durchaus Gene befinden, welche für Proteine

kodieren, die physiologische Aufgaben übernehmen. Im Unterschied zu den HtrA oder csRNA Feedback Loops konnte hier gezeigt werden, dass der Kompetenz vermittelte Feedback stärker von der Histidinkinase CiaH abhängt (Kaysen, 2012). Hierbei wurde gezeigt, dass die Phosphataseaktivität der Histidinkinase CiaH durch die Kompetenz reguliert wird.

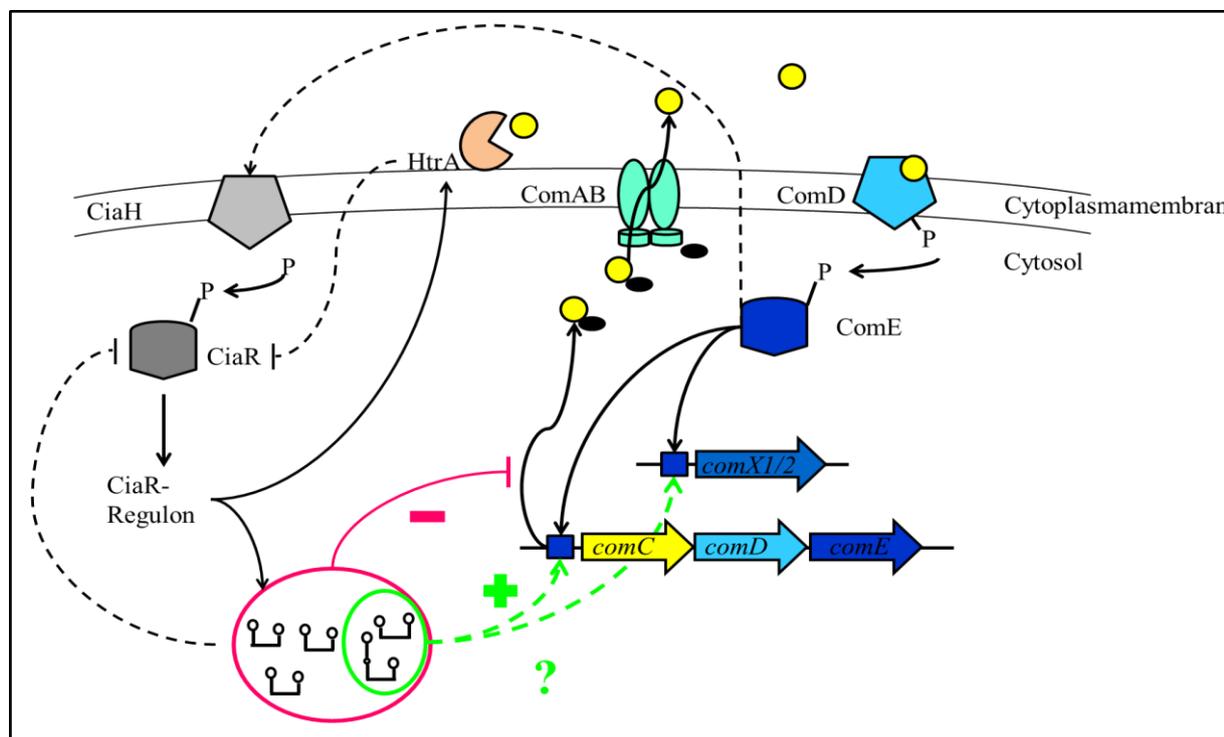


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der csRNA und HtrA vermittelten Kompetenzinhibierung.

Entwicklung der natürlichen Kompetenz in *S. pneumoniae*. Dargestellt ist das Peptid-Pheromon CSP, dessen Vorläufer (gelb/schwarz) durch ComAB prozessiert und in die Umgebung abgegeben wird. CSP bindet an die Histidinkinase ComD, welche dadurch autophosphoryliert wird. Dieses Phosphat wird auf den Response Regulator ComE übertragen, welcher durch eine Konformationsänderung als Transkriptionfaktor die Expression der „frühen“ Kompetenzgene steuert. Unter diesen Genen befindet sich auch *comX*, welches für einen alternativen Sigmafaktor kodiert, der die Expression der „späten“ Kompetenzgene kontrolliert. Die csRNAs und HtrA haben einen reprimierenden Effekt auf die Kompetenzentwicklung, wobei die Serinprotease HtrA das CSP abbaut und die csRNAs negativ auf die *comC*-Translation wirken. Des Weiteren wirken die csRNA4 und csRNA5 positiv auf die Promotoren der frühen Kompetenzgene *comC* und *comX*. Zwischen der Kompetenz und dem CiaRH System kommt es zu einigen Feedback Regulationen. So aktiviert die Deletion der csRNAs oder *htrA* das CiaRH System teilweise unabhängig von der Histidinkinase CiaH. Wohingegen eine Deletion von *comAB* oder *comDE* zu einer CiaH abhängigen Reprimierung des CiaRH Systems führt. Regulationen deren Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind, werden durch gestrichelte Linien dargestellt.

Aus den in dieser Arbeit beobachteten Effekte der einzelnen csRNAs lässt sich schließen, dass die csRNA vermittelte Kompetenz Regulation für die Feinabstimmung der Kompetenzentwicklung in *S. pneumoniae* verantwortlich ist. Die vielen Feedback Loops sprechen dafür, dass eine gewisse Homöostase zwischen der HtrA und csRNA Menge, der Aktivität des CiaRH Systems und der Kompetenzentwicklung aufrecht erhalten werden soll. Dass *S. pneumoniae* nur zu einem bestimmten

Zeitpunkt Kompetenz entwickelt und diese auch aktiv wieder abschaltet, spricht dafür, dass es für die Zelle erheblichen Stress darstellt (Mirouze *et al.*, 2013). Auch eine Hyperaktivierung des CiaRH Systems führt zu erheblichen Problemen. Zum einen zeigen die Zellen eine stark verlangsamte Generationszeit. Zum anderen konnten oft Pseudorevertanten nachgewiesen werden, in denen die Aktivität des CiaRH Systems wieder reprimiert wurde (Müller, 2011; diese Arbeit). Die Regulierung einer ausgeglichenen Aktivität dieser Systeme scheint eine essentielle Bedeutung für die Fitness einer Zelle darzustellen.

Außer der Kompetenz sind noch weitere Phänotypen durch die csRNAs beeinflusst. Dazu gehören unter anderem die β -Laktamresistenz und die Autolyse. Im Falle der Autolyse ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass es sich hierbei um einen indirekten über die Kompetenz laufenden Effekt der csRNAs handelt. Ein Zusammenhang der Autolyse und der Kompetenz konnte bereits beschrieben werden (Moscoso & Claverys, 2004; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Pinas *et al.*, 2008). Wie der Anstieg der β -Laktamresistenz durch die csRNAs vermittelt wird, ist allerdings weitgehend unklar. Im nächsten Abschnitt werden alle bisher bekannten csRNA Regulationsmechanismen innerhalb der Zelle im Zusammenhang der CiaRH vermittelten Genregulation zusammengefasst.

5.3 Überblick über die CiaRH vermittelte Regulation in *S. pneumoniae*

Im vorherigen Abschnitt lag das Augenmerk auf der Regulierung der Kompetenzentwicklung in *S. pneumoniae*. In diesem Zusammenhang wurde der Effekt der CiaR regulierten csRNAs und HtrA auf die Kompetenz genauer beleuchtet. Allerdings führen sowohl die csRNAs, als auch die Serinprotease HtrA weitere kompetenzunabhängige Regulationen in der Zelle durch. Eine Zusammenfassung der bisher bekannten csRNA und HtrA vermittelten Regulationen ist in Abbildung 5.5 schematisch dargestellt.

CiaR reguliert über die sogenannte cia-Box die Expression von bisher bekannten 15 Promotoren (Halfmann *et al.*, 2007b). Des Weiteren wurde das *dltX-D* Operon als CiaR reguliert beschrieben. Allerdings ist dessen Regulation in *S. pneumoniae* R6 nicht bedeutsam, da in diesem Stamm eine Mutation in dem *dltA* Gen nachgewiesen wurde. Hierdurch kommt es kurz nach dem Start der Translation zu einem Stoppsignal (Denapaite *et al.*, 2012).

Die Aktivierung des Response Regulators CiaR kann auch ohne die Histidinkinase CiaH über Phosphodonatoren wie Acetyl-Phosphat erfolgen (Marx, 2013). Von den 16 regulierten Promotoren werden 15 Promotoren positiv und einer negativ reguliert. Innerhalb der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen konnten zwei weitere Gene, *pavB* und *spr0091*, identifiziert werden, welche eine potenzielle CiaR Bindestelle enthalten. Ob diese Gene tatsächlich durch den Response Regulator CiaR reguliert werden, muss in weiteren Studien überprüft werden.

Das Gen *htrA*, welches für eine Serinprotease kodiert, konnte bereits als CiaR reguliert bestätigt werden (Halfmann *et al.*, 2007b). Die Aktivität von HtrA wiederum hat einen negativen Einfluss auf die CiaRH Aktivität (Müller, 2011; Shambhu, 2013). Wie genau der Effekt der extrazellulären Serinprotease auf die Aktivität des CiaRH System abläuft, ist nicht bekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt teilweise unabhängig von der Histidinkinase CiaH abläuft (Shambhu, 2013). Des Weiteren reduziert die Serinprotease HtrA durch Proteolyse die Menge des Kompetenz spezifische Peptid CSP, des Signalpeptid der Bacteriocinproduktion BlpC und wahrscheinlich des essentielle Penicillin-bindende Protein 2x (Cassone *et al.*, 2012; Kochan & Dawid, 2013; Peters, 2013). Über das Signalpeptid BlpC wird wahrscheinlich das ebenfalls in der Transkriptomanalyse identifizierte Gen *thmA* reguliert, da dieses einen direkten Repeat upstream der -35 Region enthält. Alle Gene, die diesen Repeat in ihrer Promotorregion enthalten, werden durch ein Quorum-Sensing System mit dem Signalpeptid BlpC, welches die Bacteriocinproduktion steuert, reguliert (Lange *et al.*, 1999).

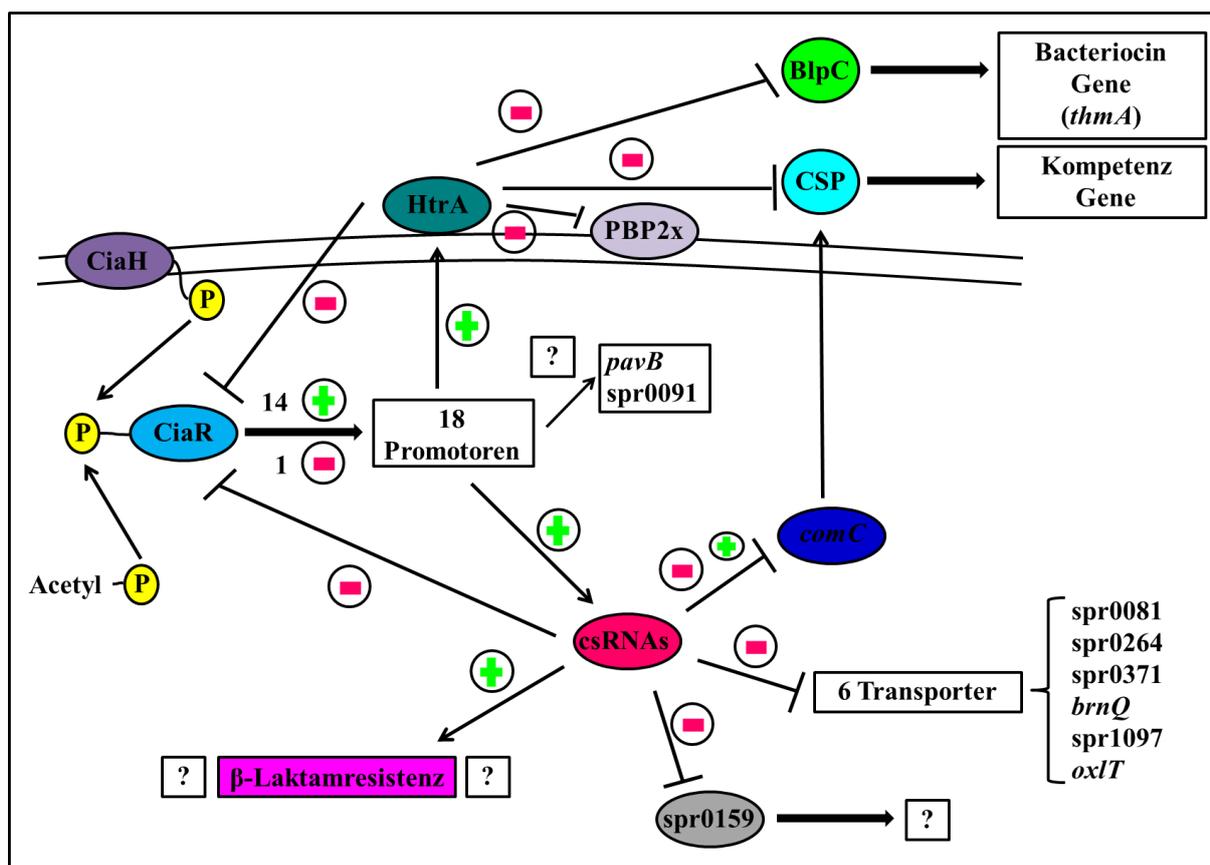


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der CiaRH vermittelten Regulation.

Die Abbildung zeigt die CiaRH vermittelte Regulation, welche über die csRNAs und die Serinprotease HtrA wesentliche Regulationswege in *S. pneumoniae* beeinflussen. Positive Regulation ist durch ein grünes Plus, negative Regulation durch ein rotes Minus gekennzeichnet. Weitere Erläuterungen zu den einzelnen Regulationen sind dem Text zu entnehmen.

Die csRNAs, welche wie HtrA positiv von dem Response Regulator CiaR reguliert werden, regulieren ihrerseits selbst post-transkriptionell die Translation verschiedener Zielgene. Die Gene *spr0081*, *spr0159*, *spr0371*, *brnQ* und *spr1097* konnten bereits als Zielgene der csRNAs identifiziert werden (Schnorpfeil *et al.*, 2013). Hierbei handelt es sich um vier Transporter (*spr0081*, *spr0371*, *brnQ* und *spr1097*) und einen potenziellen Transkriptionsregulator (*spr0159*). Die Translation all dieser Gene wird durch die csRNAs reprimiert. Ein Zusammenhang dieser Gene mit dem Anstieg der β -Laktamresistenz konnte nicht nachgewiesen werden (Schnorpfeil *et al.*, 2013).

Innerhalb der in dieser Arbeit durchgeführten globalen Transkriptomanalysen konnten weitere potenzielle Zielgene der csRNAs nachgewiesen werden. Für zwei dieser Gene, *spr0264* und *oxlT*, welche ebenfalls für Transporter kodieren, konnte eine post-transkriptionelle Regulation durch die csRNAs nachgewiesen werden (Bauer, 2012; Dersidan 2013). Für diese beiden Gene wurde bis jetzt ein Zusammenhang mit der β -Laktamresistenz nicht untersucht.

Dass die csRNAs für den Anstieg der Resistenz in Stämmen mit einem hyperaktiven CiaRH System verantwortlich sind, konnte schon in früheren Studien nachgewiesen werden (Müller *et al.*, 2011). Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die csRNAs den Anstieg der β -Laktamresistenz über eine additive Wirkung vermitteln. Allerdings konnte bis dato kein β -Laktam spezifisches Zielgen

der csRNAs identifiziert werden. Eine indirekte Wirkung der csRNAs über diverse Stoffwechselwege wird in diesem Fall nicht ausgeschlossen.

Im Gegensatz zu der β -Laktamresistenz konnte innerhalb dieser Arbeit das Kompetenz spezifische Zielgen der csRNAs identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um das Gen *comC*, welches für den Vorläufer des Kompetenz induzierenden Peptids CSP kodiert (Håvarstein *et al.*, 1995). Die csRNAs reprimieren additiv die Translation der *comC* mRNA. Für zwei der fünf csRNAs, csRNA4 und csRNA5, konnte eine zusätzliche positive Wirkung auf die Promotoren der frühen Kompetenzgene *comC* und *comX* nachgewiesen werden. Ob es sich hierbei um einen direkten oder indirekten Effekt der csRNAs handelt, konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurden Veränderungen in csRNA4 beschrieben, die den beobachteten positiven Effekt reprimieren.

Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass auch die Translation der Gene *comAB*, welche für den ABC-Transporter kodieren, durch die csRNAs negativ reguliert wird. Allerdings wurden diese Versuche in dem Stamm mit hyperaktivem *ciaH202*-Allel durchgeführt und zeigten große Schwankungen innerhalb der gemessenen Aktivität. Diese Schwankungen könnten durch die Instabilität des Stammes hervorgerufen werden. Eine erneute Messung dieser Translationsfusion in dem induzierbaren pTEX Hintergrund könnte hier Klarheit bringen.

Die Aktivität der csRNAs hat, wie auch die der Serinprotease HtrA, wiederum einen negativen Einfluss auf die Aktivität des Response Regulators CiaR (Müller, 2011; Kaysen, 2012). Auch hier ist dieser Effekt teilweise unabhängig von der Histidinkinase CiaH.

Des Weiteren ist die Aktivität des CiaRH Systems abhängig von der Wachstumsphase, der Sauerstoffkonzentration, der Kompetenz und dem Medium (Halfmann *et al.*, 2011; Kaysen, 2012; Echenique & Trombe, 2001a). An der Komplexität dieser Regulation wird deutlich, dass das CiaRH System über die Serinprotease HtrA und die csRNAs an wesentlichen Regulationswegen in *S. pneumoniae* involviert ist.

5.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte das Gen *comC*, welches für den Vorläufer des Kompetenz induzierenden Peptids CSP kodiert, als Zielgen der csRNAs identifiziert werden. Die csRNAs reprimieren additiv die Translation der *comC* mRNA. Die Bindung der csRNAs an die *comC* mRNA konnte hier anhand von Mutationen in der *comC* mRNA nachgewiesen werden. Hierbei wurde unter anderem der Bereich zwischen der Shine-Dalgarno und dem Startkodon als bedeutend für diese Bindung identifiziert. Hier wäre es interessant zu wissen, ob der gesamte Bereich verändert werden muss um die Bindung zu reprimieren oder ob eventuell auch der Austausch einer einzigen Base ausreichend ist. Für andere sRNA-mRNA Interaktionen konnte bereits gezeigt werden, dass die Veränderung einer Base bzw. einer einzigen Wasserstoffbrücke innerhalb dieses Bereiches ausreicht um eine Bindung zu verhindern (Tu *et al.*, 2010; Papenfort *et al.*, 2012).

Des Weiteren konnte ein positiver Effekt der csRNA4 und csRNA5 auf die Promotoren der frühen Kompetenzgene *comC* und *comX* beobachtet werden. Wie diese positive Wirkung vermittelt wird, konnte nicht aufgeklärt werden und stellt somit eine interessante Frage für weitere Forschungen dar. Dass die positive Wirkung der csRNA4 durch die Veränderung in *ccnD-AA* aufgehoben wird, könnte dabei ein hilfreicher Hinweis sein. Weitere Mutationen und deren Effekt auf die Translation und Transkription von *comC* könnten hierbei hilfreich sein. Zum Beispiel könnte die *ccnD-AA* Mutation in csRNA5 eingebracht werden und der Effekt auf die Transkription und Translation untersucht werden. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass der positive Effekt ausschließlich auf die frühen Kompetenzpromotoren wirkt, wurde darüber spekuliert, ob es sich bei diesem Mechanismus um eine reine Erhöhung der CSP Konzentration handelt, ohne dass dabei die DNA Aufnahme erhöht wird. Um einen Hinweis hierauf zu bekommen, könnte die CSP Konzentration im Medium der einzelnen Stämme mittels Extinktionsmessungen bei 280 nm bestimmt und gleichzeitig die Transformationseffizienz dokumentiert werden.

Im Gegensatz zur Kompetenz konnte ein β -Laktam spezifisches Zielgen innerhalb dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Allerdings konnte auch hier eine additive Wirkung der csRNAs nachgewiesen werden.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten globalen Transkriptomanalysen konnten zwei neue Zielgene der csRNAs, *spr0264* und *oxlT*, identifiziert und durch weitere Versuche verifiziert werden (Bauer, 2012; Dersidan 2013). Es wäre eventuell denkbar, dass eines dieser Gene mit der β -Laktamresistenz in Verbindung steht. Interessanter Weise wurde für GlpT in *E. coli* beschrieben, welcher der selben Transporter Superfamilie (MFS) wie OxIT angehört, dass dieser neben seinem nativen Substrat auch das Antibiotikum Fosfomycin kotransportiert. Eine weitere Gemeinsamkeit dieser beiden Transporter ist ihre Regulation. Zwar wird die Expression von GlpT direkt über den Response Regulator CpxR reprimiert (Kurabayashi *et al.*, 2013), allerdings zeigt das CpxRA System starke Ähnlichkeit zum

CiaRH System. Zum Beispiel steht die Expression des HtrA-Homolog DegP unter der Kontrolle des Zwei-Komponenten Systems CpxAR (Danese *et al.*, 1995). Das von GltT kotransportierte Antibiotikum Fosfomycin inhibiert wie β -Laktamantibiotika die Mureinbiosynthese. Aufgrund der vielen Ähnlichkeiten dieser Systeme und der regulierten Transporter wäre es durchaus möglich, dass OxlT mit der β -Laktamresistenz in Verbindung steht. Dies könnte durch Resistenztests einer *oxlT* Deletionsmutante in einem Stamm mit hyperaktivem CiaRH System überprüft werden.

Einen weiteren großen Fortschritt in dem Verständnis der Regulation der Resistenz könnte auch das Genom oder Proteom des hochresistenten *S. pneumoniae* R6 Δ *ccnA-E* p*CcnD* Stammes erbringen. Hierdurch könnten Mutationen identifiziert werden, welche im Zusammenspiel mit der csRNA4 zu einem enormen Resistenzanstieg führen. Dies könnte zur Entdeckung einer weiteren Resistenzdeterminante und zum besseren Verständnis der csRNA4 vermittelten Regulation beitragen.

Des Weiteren werden die bioinformatischen Programme zur Zielgen Identifikation ständig verbessert. Eine erneute Computer basierte Zielgensuche zusammen mit einem Abgleich der hier ermittelten veränderten Gene in der globalen Transkriptomanalyse könnte ebenfalls zielführend sein.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation möglicher Zielgene ist das sogenannte RNA-Fishing. Hierfür werden die *in vitro* transkribierten und mit Biotin markierten csRNAs an ein Säulenmaterial gebunden. Anschließend wird Gesamt-RNA aus dem *S. pneumoniae* R6 csRNA Deletionsstamm isoliert. Nach dem Entfernen der rRNA wird die restliche Gesamt-RNA über die Säule gegeben, wobei die csRNAs mit ihrer Zielgen mRNA eine Bindung eingehen (Haukanes & Kvam, 1993). Über Streptavidin Magnetic Beads können die csRNAs mit der gebundenen mRNA nun aus der Mischung isoliert und anschließend die gebundene mRNA von den csRNAs eluiert und mithilfe neuer Methoden sequenziert werden.

Innerhalb dieser Arbeit konnten wesentliche Fragen bezüglich des csRNA vermittelten Kompetenzphänotyps gewonnen werden, welche dazu beitragen, den Regulationsmechanismus der csRNAs in *S. pneumoniae* besser zu verstehen. Nichts desto trotz ergaben sich daraus auch neue Fragen bezüglich der positiven Wirkung oder der β -Laktam spezifischen Wirkung der csRNAs.

6 Literaturverzeichnis

- J. Abranches, Y. Y. Chen and R. A. Burne**, Characterization of *Streptococcus mutans* strains deficient in EIIAB Man of the sugar phosphotransferase system, 2003, 4760-4769
- P. Acebo, A. J. Martin-Galiano, S. Navarro, A. Zaballos and M. Amblar**, Identification of 88 regulatory small RNAs in the TIGR4 strain of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, 2012, 530-546
- S.-J. Ahn, J. A. C. Lemos and R. A. Burne**, Role of HtrA in Growth and Competence of *Streptococcus mutans* UA159, 2005, 3028-3038
- G. Alloing, B. Martin, C. Granadel and J. P. Claverys**, Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease, 1998, 75-83
- S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman**, Basic local alignment search tool, 1990, 403-410
- J. M. Andrade, V. Pobre and C. M. Arraiano**, Small RNA modules confer different stabilities and interact differently with multiple targets, 2013, e52866
- J. M. Andrews**, Determination of minimum inhibitory concentrations, 2001, 5-16
- T. Arai and K. Kino**, New L-amino acid ligases catalyzing oligopeptide synthesis from various microorganisms, 2010, 1572-1577
- L. Argaman and S. Altuvia**, fhlA repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex, 2000, 1101-1112
- M. Auer, M. J. Kim, M. J. Lemieux, A. Villa, J. Song, X. D. Li and D. N. Wang**, High-yield expression and functional analysis of *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter, 2001, 6628-6635
- O. T. Avery, C. M. MacLeod and M. McCarty**, 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. 1944, 1995, 344-365
- P. Babitzke and T. Romeo**, CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins, 2007, 156-163
- D. Backes**, Die regulatorische Rolle der csRNA1 in *Streptococcus pneumoniae*, 2010, Bachelorarbeit, TU Kaiserslautern
- C. S. Baker, L. A. Eory, H. Yakhnin, J. Mercante, T. Romeo and P. Babitzke**, CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* hfq by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence, 2007, 5472-5481
- R. Balbontin, F. Fiorini, N. Figueroa-Bossi, J. Casadesus and L. Bossi**, Recognition of heptameric seed sequence underlies multi-target regulation by RybB small RNA in *Salmonella enterica*, 2010, 380-394
- M. Bartilson, A. Marra, J. Christine, J. S. Asundi, W. P. Schneider and A. E. Hromockyj**, Differential fluorescence induction reveals *Streptococcus pneumoniae* loci regulated by competence stimulatory peptide, 2001, 126-135

- S. Baur, J. Marles-Wright, S. Buckenmaier, R. J. Lewis and W. Vollmer**, Synthesis of CDP-activated ribitol for teichoic acid precursors in *Streptococcus pneumoniae*, 2009, 1200-1210
- A. Becskei and L. Serrano**, Engineering stability in gene networks by autoregulation, 2000, 590-593
- S. D. Bentley, D. M. Aanensen, A. Mavroidi, D. Saunders, E. Rabinowitsch, M. Collins, K. Donohoe, D. Harris, L. Murphy, M. A. Quail, G. Samuel, I. C. Skovsted, M. S. Kalltoft, B. Barrell, P. R. Reeves, J. Parkhill and B. G. Spratt**, Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes, 2006, e31
- D. Beyer, E. Skripkin, J. Wadzack and K. H. Nierhaus**, How the ribosome moves along the mRNA during protein synthesis, 1994, 30713-30717
- A. Bidossi, L. Mulas, F. Decorosi, L. Colomba, S. Ricci, G. Pozzi, J. Deutscher, C. Viti and M. R. Oggioni**, A functional genomics approach to establish the complement of carbohydrate transporters in *Streptococcus pneumoniae*, 2012, e33320
- S. Bittmann**, Physiologische Konsequenzen der Regulation durch csRNAs in *Streptococcus pneumoniae*, 2013, Masterarbeit, TU Kaiserslautern
- C. Bohn, C. Rigoulay and P. Bouloc**, No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*, 2007, 10
- S. Boisset, T. Geissmann, E. Huntzinger, P. Fechter, N. Bendridi, M. Possedko, C. Chevalier, A. C. Helfer, Y. Benito, A. Jacquier, C. Gaspin, F. Vandenesch and P. Romby**, *Staphylococcus aureus* RNAlII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism, 2007, 1353-1366
- P. Bouvet and J. G. Belasco**, Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *E. coli*, 1992, 488-491
- M. Bouvier, C. M. Sharma, F. Mika, K. H. Nierhaus and J. Vogel**, Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation, 2008, 827-837
- E. F. Bowers and L. R. Jeffries**, Optochin in the identification of str. pneumoniae, 1955, 58-60
- M. M. Bradford**, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding., 1976, 246-254
- S. Brantl**, Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs, 2007, 102-109
- S. Brantl**, Bacterial chromosome-encoded small regulatory RNAs, 2009, 85-103
- S. Brantl**, Acting antisense: plasmid- and chromosome-encoded sRNAs from Gram-positive bacteria, 2012, 853-871
- R. R. Breaker**, Riboswitches and the RNA world, 2012,
- A. L. Bricker and J. G. Belasco**, Importance of a 5' stem-loop for longevity of papA mRNA in *Escherichia coli*, 1999, 3587-3590
- I. Brunner**, Konstruktion von Integrationsplasmiden zur Expression von kleinen CiaR-abhängigen RNAs in *Streptococcus pneumoniae*, 2010, Diplomarbeit, TU Kaiserslautern
- D. R. Buelow and T. L. Raivio**, Cpx signal transduction is influenced by a conserved N-terminal domain in the novel inhibitor CpxP and the periplasmic protease DegP, 2005, 6622-6630

- D. R. Buelow and T. L. Raivio**, Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases, 2010, 547-566
- W. Busch and M. H. Saier, Jr.**, The transporter classification (TC) system, 2002, 2002, 287-337
- S. M. Carvalho, T. G. Kloosterman, O. P. Kuipers and A. R. Neves**, CcpA ensures optimal metabolic fitness of *Streptococcus pneumoniae*, 2011, e26707
- P. Casino, V. Rubio and A. Marina**, The mechanism of signal transduction by two-component systems, 2010,
- M. Cassone, A. L. Gagne, L. A. Spruce, S. H. Seeholzer and M. E. Sebert**, The HtrA protease from *Streptococcus pneumoniae* digests both denatured proteins and the competence-stimulating peptide, 2012, 38449-38459
- M. E. Castelli, E. Garcia Vescovi and F. C. Soncini**, The phosphatase activity is the target for Mg²⁺ regulation of the sensor protein PhoQ in *Salmonella*, 2000, 22948-22954
- D. Cavard, C. Lazdunski and S. P. Howard**, The acylated precursor form of the colicin A lysis protein is a natural substrate of the DegP protease, 1989, 6316-6322
- A. Chastanet, M. Prudhomme, J. P. Claverys and T. Msadek**, Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival, 2001, 7295-7307
- P. Chavanet, H. Beloeil, A. Pechinot, F. Duigou, J. C. Buisson, M. Duong, C. Neuwirth, A. Kazmierczak and H. Portier**, In vivo activity and pharmacodynamics of cefotaxime or ceftriaxone in combination with fosfomycin in fibrin clots infected with highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, 1995, 1736-1743
- P. Chavanet, N. Peyrard, A. Pechinot, M. Buisson, M. Duong, C. Neuwirth, A. Kazmierczak and H. Portier**, In vivo activity and pharmacodynamics of amoxicillin in combination with fosfomycin in fibrin clots infected with highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, 1996, 2062-2066
- J. D. Chen and D. A. Morrison**, Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, 1987, 1959-1967
- J. Cheung and W. A. Hendrickson**, Sensor domains of two-component regulatory systems, 2010, 116-123
- F. Chi, M. Leider, F. Leendertz, C. Bergmann, C. Boesch, S. Schenk, G. Pauli, H. Ellerbrok and R. Hakenbeck**, New *Streptococcus pneumoniae* clones in deceased wild chimpanzees, 2007, 6085-6088
- J. P. Claverys and L. S. Håvarstein**, Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, 2002, d1798-1814
- J. P. Claverys, B. Martin and P. Polard**, The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism, 2009, 643-656
- J. P. Claverys, M. Prudhomme and B. Martin**, Induction of Competence Regulons as a General Response to Stress in Gram-Positive Bacteria, 2006,
- J. P. Claverys, M. Prudhomme, I. Mortier-Barriere and B. Martin**, Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity?, 2000, 251-259

- G. A. Coburn and G. A. Mackie**, Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists, 1999, 55-108
- J. N. Cole, J. A. Aquilina, P. G. Hains, A. Henningham, K. S. Sriprakash, M. G. Caparon, V. Nizet, M. Kotb, S. J. Cordwell, S. P. Djordjevic and M. J. Walker**, Role of group A *Streptococcus* HtrA in the maturation of SpeB protease, 2007, 4488-4498
- J. Coleman, P. J. Green and M. Inouye**, The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes, 1984, 429-436
- J. E. Cornick and S. D. Bentley**, *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides, 2012, 573-583
- F. Corpet**, Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, 1988, 10881-10890
- A. Dagkessamanskaia, M. Moscoso, V. Henard, S. Guiral, K. Overweg, M. Reuter, B. Martin, J. Wells and J. P. Claverys**, Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells, 2004, 1071-1086
- P. N. Danese, W. B. Snyder, C. L. Cosma, L. J. Davis and T. J. Silhavy**, The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP, 1995, 387-398
- S. Dawid, M. E. Sebert and J. N. Weiser**, Bacteriocin activity of *Streptococcus pneumoniae* is controlled by the serine protease HtrA via posttranscriptional regulation, 2009, 1509-1518
- M. H. de Smit and J. van Duin**, Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis, 1990, 7668-7672
- M. H. de Smit and J. van Duin**, Translational standby sites: how ribosomes may deal with the rapid folding kinetics of mRNA, 2003, 737-743
- G. del Solar, P. Acebo and M. Espinosa**, Replication control of plasmid pLS1: the antisense RNA II and the compact rnaII region are involved in translational regulation of the initiator RepB synthesis, 1997, 95-108.
- D. Denapaite, R. Brückner, R. Hakenbeck and W. Vollmer**, Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes, 2012, 344-358
- D. Denapaite and R. Hakenbeck**, A new variant of the capsule 3 cluster occurs in *Streptococcus pneumoniae* from deceased wild chimpanzees, 2011, e25119
- A. Dersidan**, Posttranskriptionelle Kontrolle der Expression von Membranproteinen durch die csRNAs in *Streptococcus pneumoniae*, 2013, Bachelorarbeit, TU Kaiserslautern
- G. Desnoyers, M. P. Bouchard and E. Masse**, New insights into small RNA-dependent translational regulation in prokaryotes, 2013, 92-98
- C. G. Dowson, A. Hutchison, J. A. Brannigan, R. C. George, D. Hansman, J. Linares, A. Tomasz, J. M. Smith and B. G. Spratt**, Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, 1989, 8842-8846
- J. R. Echenique, S. Chapuy-Regaud and M. C. Trombe**, Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of *ciaRH* and *comCDE*, 2000, 688-696

- J. R. Echenique and M. C. Trombe**, Competence modulation by the NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae* involves signal transduction, 2001a, 768-772
- J. R. Echenique and M. C. Trombe**, Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB, 2001b, 4599-4608
- S. A. Emory, P. Bouvet and J. G. Belasco**, A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*, 1992, 135-148
- B. Ewing and P. Green**, Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, 1998, 186-194
- M. E. Falagas, N. Roussos, I. D. Gkegkes, P. I. Rafailidis and D. E. Karageorgopoulos**, Fosfomycin for the treatment of infections caused by Gram-positive cocci with advanced antimicrobial drug resistance: a review of microbiological, animal and clinical studies, 2009, 921-944
- F. Fani, M. C. Brotherton, P. Leprohon and M. Ouellette**, Genomic analysis and reconstruction of cefotaxime resistance in *Streptococcus pneumoniae*, 2013, 1718-1727
- F. Fani, P. Leprohon, D. Legare and M. Ouellette**, Whole genome sequencing of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* reveals mutations in penicillin-binding proteins and in a putative iron permease, 2011, R115
- S. R. Filipe, E. Severina and A. Tomasz**, The murMN operon: a functional link between antibiotic resistance and antibiotic tolerance in *Streptococcus pneumoniae*, 2002, 1550-1555
- C. M. Fraser, J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley, R. D. Fritchman, J. F. Weidman, K. V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, D. M. Saudek, C. A. Phillips, J. M. Merrick, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, K. F. Bott, P. C. Hu, T. S. Lucier, S. N. Peterson, H. O. Smith, C. A. Hutchison, 3rd and J. C. Venter**, The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*, 1995, 397-403
- K. S. Frohlich, K. Papenfort, A. A. Berger and J. Vogel**, A conserved RpoS-dependent small RNA controls the synthesis of major porin OmpD, 2012, 3623-3640
- A. Gaballa, H. Antelmann, C. Aguilar, S. K. Khakh, K. B. Song, G. T. Smaldone and J. D. Helmann**, The *Bacillus subtilis* iron-sparing response is mediated by a Fur-regulated small RNA and three small, basic proteins, 2008, 11927-11932
- M. Y. Galperin**, Diversity of structure and function of response regulator output domains, 2010, 150-159
- R. Gao and A. M. Stock**, Biological insights from structures of two-component proteins, 2009, 133-154
- J. Gartmann**, Die regulatorische Rolle der csRNA3 in *Streptococcus pneumoniae*, 2010, Bachelorarbeit, TU Kaiserslautern
- N. George**, Inducible Expression of *htra* in *Streptococcus pneumoniae*, 2012, Masterarbeit, TU Kaiserslautern
- P. Giammarinaro, M. Sicard and A. M. Gasc**, Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal-transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae*, 1999, 1859-1869

- M. Gimpel, H. Preis, E. Barth, L. Gramzow and S. Brantl**, SR1--a small RNA with two remarkably conserved functions, 2012, 11659-11672
- D. Gordon, C. Abajian and P. Green**, Consed: a graphical tool for sequence finishing, 1998, 195-202
- S. Gottesman**, Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria, 2005, 399-404
- T. Grebe, J. Paik and R. Hakenbeck**, A novel resistance mechanism against beta-lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase, 1997, 3342-3349.
- F. Griffith**, The Significance of Pneumococcal Types, 1928, 113-159
- S. Grkovic, M. H. Brown and R. A. Skurray**, Regulation of bacterial drug export systems, 2002, 671-701, table of contents
- M. Grunberg-Manago**, Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages, 1999, 193-227
- E. Guenzi, A. M. Gasc, M. A. Sicard and R. Hakenbeck**, A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*, 1994, 505-515.
- M. Guillier and S. Gottesman**, The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator, 2008, 6781-6794
- S. Guiral, T. J. Mitchell, B. Martin and J. P. Claverys**, Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements, 2005, 8710-8715
- W. Haas, D. Kaushal, J. Sublett, C. Obert and E. I. Tuomanen**, Vancomycin Stress Response in a Sensitive and a Tolerant Strain of *Streptococcus pneumoniae*, 2005, 8205-8210
- R. Hakenbeck, T. Grebe, D. Zähler and J. B. Stock**, beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins, 1999, 673-678.
- A. Halfmann, R. Hakenbeck and R. Brückner**, A new integrative reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*, 2007a, 217-224
- A. Halfmann, M. Kovacs, R. Hakenbeck and R. Brückner**, 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, 2007b, 110-126
- A. Halfmann, A. Schnorpfeil, M. Müller, P. Marx, U. Günzler, R. Hakenbeck and R. Brückner**, Activity of the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae* R6, 2011, 96-104
- D. Hanahan**, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, 1983, 557-580
- J. M. Hardie and R. A. Whiley**, The genus *Streptococcus*. In: *The genera of lactic acid bacteria* (Hrsg. B. J. B. Wood und W. H. Holzapel), 1995, 55-124
- B. I. Haukanes and C. Kvam**, Application of magnetic beads in bioassays, 1993, 60-63

- L. S. Håvarstein, G. Coomaraswamy and D. A. Morrison**, An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, 1995, 11140-11144
- L. S. Håvarstein, P. Gaustad, I. F. Nes and D. A. Morrison**, Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor, 1996, 863-869
- L. S. Håvarstein, B. Martin, O. Johnsborg, C. Granadel and J. P. Claverys**, New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor, 2006, 1297-1037
- X. He, C. Wu, D. Yarbrough, L. Sim, G. Niu, J. Merritt, W. Shi and F. Qi**, The *cia* operon of *Streptococcus mutans* encodes a unique component required for calcium-mediated autoregulation, 2008, 112-126
- N. Heidrich, I. Moll and S. Brantl**, In vitro analysis of the interaction between the small RNA SR1 and its primary target *ahrC* mRNA, 2007, 4331-4346
- E. Holmqvist, J. Reimegard, M. Sterk, N. Grantcharova, U. Romling and E. G. Wagner**, Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis, 2010, 1840-1850
- F. M. Hui, L. Zhou and D. A. Morrison**, Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcal A secretion genes, 1995, 25-31
- G. A. Hunter and J. P. Keener**, Mechanisms underlying the additive and redundant Qrr phenotypes in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*, 2013, 38-49
- E. Huntzinger, S. Boisset, C. Saveanu, Y. Benito, T. Geissmann, A. Namane, G. Lina, J. Etienne, B. Ehresmann, C. Ehresmann, A. Jacquier, F. Vandenesch and P. Romby**, *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression, 2005, 824-835
- J. Hummes**, Die regulatorische Rolle der *csRNA4* in *Streptococcus pneumoniae*, 2010, Bachelorarbeit, TU Kaiserslautern 2010
- A. Hüttenhofer and H. F. Noller**, Footprinting mRNA-ribosome complexes with chemical probes, 1994, 3892-3901
- T. N. Huynh, C. E. Noriega and V. Stewart**, Missense substitutions reflecting regulatory control of transmitter phosphatase activity in two-component signalling, 2013, 459-472
- Y. M. Ibrahim, A. R. Kerr, J. McCluskey and T. J. Mitchell**, Control of virulence by the two-component system CiaR/H is mediated via HtrA, a major virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*, 2004a, 5258-5266
- Y. M. Ibrahim, A. R. Kerr, J. McCluskey and T. J. Mitchell**, Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*, 2004b, 3584-3591
- D. D. Isaac, J. S. Pinkner, S. J. Hultgren and T. J. Silhavy**, The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP, 2005, 17775-17779
- N. Jahn, H. Preis, C. Wiedemann and S. Brantl**, BsrG/SR4 from *Bacillus subtilis*--the first temperature-dependent type I toxin-antitoxin system, 2012, 579-598

- I. Jensch, G. Gamez, M. Rothe, S. Ebert, M. Fulde, D. Somplatzki, S. Bergmann, L. Petruschka, M. Rohde, R. Nau and S. Hammerschmidt**, PavB is a surface-exposed adhesin of *Streptococcus pneumoniae* contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections, 2010, 22-43
- A. Jensen and M. Kilian**, Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, its subspecies, and its clinical and phylogenetic relationship to *Streptococcus pyogenes*, 2012, 113-126
- J. Jiang, X. Zhang, Y. Chen, Y. Wu, Z. H. Zhou, Z. Chang and S. F. Sui**, Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins, 2008, 11939-11944
- C. H. Jones, T. C. Bolken, K. F. Jones, G. O. Zeller and D. E. Hruby**, Conserved DegP protease in gram-positive bacteria is essential for thermal and oxidative tolerance and full virulence in *Streptococcus pyogenes*, 2001, 5538-5545
- K. Jung, L. Fried, S. Behr and R. Heermann**, Histidine kinases and response regulators in networks, 2012, 118-124
- D. C. Kang, P. A. Venkataraman, M. E. Dumont and P. C. Maloney**, Oligomeric state of the oxalate transporter, OxIT, 2011, 8445-8453
- L. Kausmally, O. Johnsborg, M. Lunde, E. Knutsen and L. S. Håvarstein**, Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis, 2005, 4338-4345
- H. Kawamoto, Y. Koide, T. Morita and H. Aiba**, Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq, 2006, 1013-1022
- Y. Kawamura, X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura and T. Ezaki**, Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*, 1995, 406-408
- A. Kaysen**, Die regulatorische Rolle der csRNA2 in *Streptococcus pneumoniae*, 2010, Bachelorarbeit, TU Kaiserslautern
- A. Kaysen**, The interconnection of genetic competence and the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*, 2012, Masterarbeit, TU Kaiserslautern
- A. S. Kharat and A. Tomasz**, Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall, 2006, 93-107
- D. Y. Kim and K. K. Kim**, Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control, 2005, 266-274
- T. J. Kochan and S. Dawid**, The HtrA protease of *Streptococcus pneumoniae* controls density-dependent stimulation of the bacteriocin blp locus via disruption of pheromone secretion, 2013, 1561-1572
- E. C. Kofoid and J. S. Parkinson**, Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins, 1988, 4981-4985
- H. Kolmar, P. R. Waller and R. T. Sauer**, The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation, 1996, 5925-5929
- M. Kovács**, Die kleinen nichtkodierenden RNAs im Regulon des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*, 2009, Dissertation, TU Kaiserslautern

- M. Kovács, A. Halfmann, I. Fedtke, M. Heintz, A. Peschel, W. Vollmer, R. Hakenbeck and R. Brückner**, 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*, 2006, 5797-5805
- J. E. Kowalko and M. E. Sebert**, The *Streptococcus pneumoniae* competence regulatory system influences respiratory tract colonization, 2008, 3131-3140
- M. Kozak**, Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes, 1999, 187-208
- B. Kreikemeyer, M. D. Boyle, B. A. Buttaro, M. Heinemann and A. Podbielski**, Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule, 2001, 392-406
- T. Krojer, J. Sawa, R. Huber and T. Clausen**, HtrA proteases have a conserved activation mechanism that can be triggered by distinct molecular cues, 2010, 844-852
- R. Kumar, P. Shah, E. Swiatlo, S. C. Burgess, M. L. Lawrence and B. Nanduri**, Identification of novel non-coding small RNAs from *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 using high-resolution genome tiling arrays, 2010, 350
- K. Kurabayashi, Y. Hirakawa, K. Tanimoto, H. Tomita and H. Hirakawa**, The role of the CpxAR two-component signal transduction system in control of fosfomycin resistance and carbon substrate uptake, 2013,
- S. R. Kushner**, mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age, 2002, 4658-4665; discussion 4657
- S. Lacks and R. D. Hotchkiss**, A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*, 1960, 508-518
- U. K. Laemmli**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, 1970, 680-685
- G. Laible and R. Hakenbeck**, Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*, 1987, 355-363
- R. Lange, C. Wagner, A. de Saizieu, N. Flint, J. Molnos, M. Stieger, P. Caspers, M. Kamber, W. Keck and K. E. Amrein**, Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*, 1999, 223-234
- G. W. Lau, S. Haataja, M. Lonetto, S. E. Kensit, A. Marra, A. P. Bryant, D. McDevitt, D. A. Morrison and D. W. Holden**, A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence, 2001, 555-571
- M. T. Laub and M. Goulian**, Specificity in two-component signal transduction pathways, 2007, 121-145
- E. Le Chatelier, S. D. Ehrlich and L. Janniere**, Countertranscript-driven attenuation system of the pAM beta 1 repE gene, 1996, 1099-1112
- A. Le Rhun and E. Charpentier**, Small RNAs in streptococci, 2012, 414-426
- M. S. Lee and D. A. Morrison**, Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation, 1999, 5004-5016

- D. H. Lenz, K. C. Mok, B. N. Lilley, R. V. Kulkarni, N. S. Wingreen and B. L. Bassler**, The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*, 2004, 69-82
- T. A. Leonard, J. Moller-Jensen and J. Lowe**, Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation, 2005, 523-535
- B. Lipinska, M. Zyllicz and C. Georgopoulos**, The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase, 1990, 1791-1797
- M. Y. Liu, G. Gui, B. Wei, J. F. Preston, 3rd, L. Oakford, U. Yuksel, D. P. Giedroc and T. Romeo**, The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*, 1997, 17502-17510
- G. S. Lukat, W. R. McCleary, A. M. Stock and J. B. Stock**, Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors, 1992, 718-722
- P. Luo, H. Li and D. A. Morrison**, ComX is a unique link between multiple quorum sensing outputs and competence in *Streptococcus pneumoniae*, 2003, 623-633
- W. R. Lyon and M. G. Caparon**, Role for serine protease HtrA (DegP) of *Streptococcus pyogenes* in the biogenesis of virulence factors SpeB and the hemolysin streptolysin S, 2004, 1618-1625
- M. Maes and E. Messens**, Phenol as grinding material in RNA preparations, 1992, 4374
- P. C. Maloney**, Bacterial transporters, 1994, 571-582
- M. Mangold, M. Siller, B. Roppenser, B. J. Vlamincx, T. A. Penfound, R. Klein, R. Novak, R. P. Novick and E. Charpentier**, Synthesis of group A streptococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule, 2004, 1515-1527
- B. Mann, T. van Opijnen, J. Wang, C. Obert, Y. D. Wang, R. Carter, D. J. McGoldrick, G. Ridout, A. Camilli, E. I. Tuomanen and J. W. Rosch**, Control of virulence by small RNAs in *Streptococcus pneumoniae*, 2012, e1002788
- J. Marmur**, A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, 1961, 202-218
- B. Martin, C. Granadel, N. Campo, V. Henard, M. Prudhomme and J. P. Claverys**, Expression and maintenance of ComD-ComE, the two-component signal-transduction system that controls competence of *Streptococcus pneumoniae*, 2010, 1513-1528
- B. Martin, M. Prudhomme, G. Alloing, C. Granadel and J. P. Claverys**, Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*, 2000, 867-878
- B. Martin, A. L. Soulet, N. Mirouze, M. Prudhomme, I. Mortier-Barriere, C. Granadel, M. F. Noiro-Gros, P. Noiro, P. Polard and J. P. Claverys**, ComE/ComE~P interplay dictates activation or extinction status of pneumococcal X-state (competence), 2013, 394-411
- P. Marx, M. Nuhn, M. Kovacs, R. Hakenbeck and R. Brückner**, Identification of genes for small non-coding RNAs that belong to the regulon of the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus*, 2010, 661
- M. Marx**, Die Steuerung der Aktivität des Response Regulators CiaR des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*, 2013, Dissertation, TU Kaiserslautern

- T. Mascher**, Das *cia*-Regulon von *Streptococcus pneumoniae*, 2001,
- T. Mascher**, Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in *Firmicutes bacteria*, h2006, 133-144
- T. Mascher, M. Heintz, D. Zähler, M. Merai and R. Hakenbeck**, The CiaRH system of *Streptococcus pneumoniae* prevents lysis during stress induced by treatment with cell wall inhibitors and mutations in *pbp2x* involved in beta-lactam resistance, 2006, 1959-1978
- T. Mascher, D. Zähler, M. Merai, N. Balmelle, A. B. de Saizieu and R. Hakenbeck**, The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis, 2003, 60-70
- N. Mathy, L. Benard, O. Pellegrini, R. Daou, T. Wen and C. Condon**, 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA, 2007, 681-692
- J. H. Miller**, Experiments in molecular genetics, New York, 1972,
- N. Mirouze, M. A. Berge, A. L. Soulet, I. Mortier-Barriere, Y. Quentin, G. Fichant, C. Granadel, M. F. Noirot-Gros, P. Noirot, P. Polard, B. Martin and J. P. Claverys**, Direct involvement of DprA, the transformation-dedicated RecA loader, in the shut-off of pneumococcal competence, 2013, E1035-1044
- T. J. Mitchell**, The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis, 2003, 219-230
- A. Y. Mitrophanov and E. A. Groisman**, Signal integration in bacterial two-component regulatory systems, 2008, 2601-2611
- E. Morfeldt, D. Taylor, A. von Gabain and S. Arvidson**, Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAlII, 1995, 4569-4577
- M. Moscoso and J. P. Claverys**, Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA, 2004, 783-794
- M. Moscoso, M. Domenech and E. Garcia**, 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, 2010, 1052-1064
- M. Müller, P. Marx, R. Hakenbeck and R. Brückner**, Effect of new alleles of the histidine kinase gene *ciaH* on the activity of the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae* R6, 2011, 3104-3112
- M. Müller**, Die Regulation des Zweikomponentensystems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae* und die phänotypischen Konsequenzen, 2011, Dissertation, TU Kaiserslautern
- K. Mullis, F. Faloon, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich**, Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction, 1986, 263-273
- F. Narberhaus**, Translational control of bacterial heat shock and virulence genes by temperature-sensing mRNAs, 2010, 84-89
- D. Nevozhay, R. M. Adams, K. F. Murphy, K. Josic and G. Balazsi**, Negative autoregulation linearizes the dose-response and suppresses the heterogeneity of gene expression, 2009, 5123-5128

- C. Nieto, A. Puyet and M. Espinosa**, MalR-mediated regulation of the *Streptococcus pneumoniae* malMP operon at promoter PM. Influence of a proximal divergent promoter region and competition between MalR and RNA polymerase proteins, 2001, 14946-14954
- B. T. Nixon, C. W. Ronson and F. M. Ausubel**, Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*, 1986, 7850-7854
- N. Okibe, N. Suzuki, M. Inui and H. Yukawa**, Antisense-RNA-mediated plasmid copy number control in pCG1-family plasmids, pCGR2 and pCG1, in *Corynebacterium glutamicum*, 2010, 3609-3623
- S. H. Olesen, D. J. Ingles, Y. Yang and E. Schonbrunn**, Differential antibacterial properties of the MurA inhibitors terreic acid and fosfomycin, 2013,
- J. A. Opdyke, J. G. Kang and G. Storz**, GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*, 2004, 6698-6705
- E. Ottolenghi and R. D. Hotchkiss**, Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration, 1962, 491-519
- K. Overweg, A. Kerr, M. Sluijter, M. H. Jackson, T. J. Mitchell, A. P. de Jong, R. de Groot and P. W. Hermans**, The putative proteinase maturation protein A of *Streptococcus pneumoniae* is a conserved surface protein with potential to elicit protective immune responses, 2000, 4180-4188
- S. S. Pao, I. T. Paulsen and M. H. Saier, Jr.**, Major facilitator superfamily, 1998, 1-34
- K. Papenfort, D. Podkaminski, J. C. Hinton and J. Vogel**, The ancestral SgrS RNA discriminates horizontally acquired *Salmonella* mRNAs through a single G-U wobble pair, 2012, E757-764
- E. V. Pestova, L. S. Håvarstein and D. A. Morrison**, Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system, 1996, 853-862
- K. Peters**, Der Abbau des essentiellen Penicillin-Bindeprotein 2x in *Streptococcus pneumoniae* durch die Serinprotease HtrA, 2013, Dissertation, TU Kaiserslautern
- S. N. Peterson, C. K. Sung, R. Cline, B. V. Desai, E. C. Snesrud, P. Luo, J. Walling, H. Li, M. Mintz, G. Tsegaye, P. C. Burr, Y. Do, S. Ahn, J. Gilbert, R. D. Fleischmann and D. A. Morrison**, Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays, 2004, 1051-1070
- V. Pfeiffer, K. Papenfort, S. Lucchini, J. C. Hinton and J. Vogel**, Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation, 2009, 840-846
- C. Pichon and B. Felden**, Small RNA gene identification and mRNA target predictions in bacteria, 2008, 2807-2813
- G. E. Pinas, P. R. Cortes, A. G. Orio and J. Echenique**, Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*, 2008, 1300-1308
- B. Poolman, J. Knol, C. van der Does, P. J. Henderson, W. J. Liang, G. Leblanc, T. Pourcher and I. Mus-Veteau**, Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins, 1996, 911-922

- I. Poquet, V. Saint, E. Seznec, N. Simoes, A. Bolotin and A. Gruss**, HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing, 2000, 1042-1051
- A. Puyet and M. Espinosa**, Structure of the maltodextrin-uptake locus of *Streptococcus pneumoniae*. Correlation to the *Escherichia coli* maltose regulon, 1993, 800-811
- E. Ramirez-Peña, J. Treviño, Z. Liu, N. Perez and P. Sumby**, The group A *Streptococcus* small regulatory RNA FasX enhances streptokinase activity by increasing the stability of the *ska* mRNA transcript, 2010, 1332-1347
- S. Ramos-Montanez, K. M. Kazmierczak, K. L. Hentchel and M. E. Winkler**, Instability of *ackA* (Acetate Kinase) Mutations and Their Effects on Acetyl Phosphate (AcP) and ATP Amounts in *Streptococcus pneumoniae* D39, 2010,
- J. Renart, J. Reiser and G. R. Stark**, Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure, 1979, 3116-3120
- S. Ribes, F. Taberner, A. Domenech, C. Cabellos, F. Tubau, J. Linares, P. F. Viladrich and F. Gudiol**, Evaluation of fosfomicin alone and in combination with ceftriaxone or vancomycin in an experimental model of meningitis caused by two strains of cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, 2006, 931-936
- J. B. Rice, D. Balasubramanian and C. K. Vanderpool**, Small RNA binding-site multiplicity involved in translational regulation of a polycistronic mRNA, 2012, E2691-2698
- S. A. Roberts and J. R. Scott**, RivR and the small RNA RivX: the missing links between the CovR regulatory cascade and the Mga regulon, 2007, 1506-1522
- P. D. Rogers, T. T. Liu, K. S. Barker, G. M. Hilliard, B. K. English, J. Thornton, E. Swiatlo and L. S. McDaniel**, Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin, 2007, 616-626
- P. Romby and E. Charpentier**, An overview of RNAs with regulatory functions in gram-positive bacteria, 2010, 217-237
- N. Rosenfeld, M. B. Elowitz and U. Alon**, Negative autoregulation speeds the response times of transcription networks, 2002, 785-793
- M. Safferling, H. Griffith, J. Jin, J. Sharp, M. De Jesus, C. Ng, T. A. Krulwich and D. N. Wang**, TetL tetracycline efflux protein from *Bacillus subtilis* is a dimer in the membrane and in detergent solution, 2003, 13969-13976
- C. Salles, L. Creancier, J. P. Claverys and V. Mejean**, The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*, 1992, 6103
- J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis**, Molecular Cloning: a laboratory manual., Cold Spring Harbor, N. Y., 1989,
- F. Sanger, S. Nicklen and A. R. Coulson**, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, 1977, 5463-5467

- A. Schnorpfeil, M. Kranz, M. Kovacs, C. Kirsch, J. Gartmann, I. Brunner, S. Bittmann and R. Brückner**, Target evaluation of the non-coding csRNAs reveals a link of the two-component regulatory system CiaRH to competence control in *Streptococcus pneumoniae* R6, 2013, 334-349
- M. E. Sebert, L. M. Palmer, M. Rosenberg and J. N. Weiser**, Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization, 2002, 4059-4067
- M. E. Sebert, K. P. Patel, M. Plotnick and J. N. Weiser**, Pneumococcal HtrA protease mediates inhibition of competence by the CiaRH two-component signaling system, 2005, 3969-3979
- L. Shambhu**, Die Feedback Regulation des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*, 2013, Masterarbeit, TU Kaiserslautern
- C. M. Sharma, F. Darfeuille, T. H. Plantinga and J. Vogel**, A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites, 2007, 2804-2817
- J. S. Sharp and D. H. Bechhofer**, Effect of 5'-proximal elements on decay of a model mRNA in *Bacillus subtilis*, 2005, 484-495
- X. Shi, S. Wegener-Feldbrugge, S. Huntley, N. Hamann, R. Hedderich and L. Sogaard-Andersen**, Bioinformatics and experimental analysis of proteins of two-component systems in *Myxococcus xanthus*, 2008, 613-624
- J. Shine and L. Dalgarno**, The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites, 1974, 1342-1346
- J. Skorko-Glonek, A. Wawrzynow, K. Krzewski, K. Kurpierz and B. Lipinska**, Site-directed mutagenesis of the HtrA (DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures, 1995, 47-52
- A. M. Smith and K. P. Klugman**, Alterations in MurM, a cell wall muropeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*, 2001, 2393-2396
- J. H. Song, K. S. Ko, J. Y. Lee, J. Y. Baek, W. S. Oh, H. S. Yoon, J. Y. Jeong and J. Chun**, Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis, 2005, 365-374
- H. Soualhia, V. Brochu, F. Menard, B. Papadopoulou, K. Weiss, M. G. Bergeron, D. Legare, J. Drummel-Smith and M. Ouellette**, A proteomic analysis of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter, 2005, 1430-1440
- C. Spiess, A. Beil and M. Ehrmann**, A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein, 1999, 339-347
- H. Steinmoen, A. Teigen and L. S. Håvarstein**, Competence-induced cells of *Streptococcus pneumoniae* lyse competence-deficient cells of the same strain during cocultivation, 2003, 7176-7183
- K. E. Stevens, D. Chang, E. E. Zwack and M. E. Sebert**, Competence in *Streptococcus pneumoniae* is regulated by the rate of ribosomal decoding errors, 2011,
- A. M. Stock, V. L. Robinson and P. N. Goudreau**, Two-component signal transduction, 2000, 183-215

- G. Storz, J. Vogel and K. M. Wassarman**, Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers, 2011, 880-891
- M. D. Suits and A. B. Boraston**, Structure of the *Streptococcus pneumoniae* surface protein and adhesin PfbA, 2013, e67190
- C. K. Sung, H. Li, J. P. Claverys and D. A. Morrison**, An *rpsL* cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*, 2001, 5190-5196
- C. K. Sung and D. A. Morrison**, Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*, 2005, 3052-3061
- S. L. Svenningsen, K. C. Tu and B. L. Bassler**, Gene dosage compensation calibrates four regulatory RNAs to control *Vibrio cholerae* quorum sensing, 2009, 429-439
- M. Thattai and A. van Oudenaarden**, Intrinsic noise in gene regulatory networks, 2001, 8614-8619
- M. K. Thomason, F. Fontaine, N. De Lay and G. Storz**, A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*, 2012, 17-35
- J. P. Throup, K. K. Koretke, A. P. Bryant, K. A. Ingraham, A. F. Chalker, Y. Ge, A. Marra, N. G. Wallis, J. R. Brown, D. J. Holmes, M. Rosenberg and M. K. Burnham**, A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*, 2000, 566-576
- H. Ting, E. A. Kouzminova and A. Kuzminov**, Synthetic lethality with the *dut* defect in *Escherichia coli* reveals layers of DNA damage of increasing complexity due to uracil incorporation, 2008, 5841-5854
- D. J. Tipper and J. L. Strominger**, Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine, 1965, 1133-1141
- B. Tjaden**, Computational identification of sRNA targets, 2012, 227-234
- B. Tjaden, S. S. Goodwin, J. A. Opdyke, M. Guillier, D. X. Fu, S. Gottesman and G. Storz**, Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria, 2006, 2791-2802
- K. Todorova**, β -Laktam-Resistenz in *Streptococcus* spp.: Eine neue Resistenzdeterminante *murE*, 2010, Dissertation, TU Kaiserslautern
- A. Tomasz and R. D. Hotchkiss**, Regulation of the Transformability of Pneumococcal Cultures by Macromolecular Cell Products, 1964, 480-487
- A. Tomasz and J. L. Mosser**, On the nature of the pneumococcal activator substance, 1966, 58-66
- H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon**, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, 1979, 4350-4354
- C. Trappetti, A. D. Ogunniyi, M. R. Oggioni and J. C. Paton**, Extracellular matrix formation enhances the ability of *Streptococcus pneumoniae* to cause invasive disease, 2011, e19844
- J. Trevino, N. Perez and P. Sumby**, The 4.5S RNA component of the signal recognition particle is required for group A *Streptococcus* virulence, 2010, 1342-1350
- P. Trieu-Cuot and P. Courvalin**, Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III, 1983, 331-341

- H. C. Tsui, D. Mukherjee, V. A. Ray, L. T. Sham, A. L. Feig and M. E. Winkler**, Identification and characterization of noncoding small RNAs in *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 strain D39, 2010, 264-279
- K. C. Tu and B. L. Bassler**, Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*, 2007, 221-233
- K. C. Tu, T. Long, S. L. Svenningsen, N. S. Wingreen and B. L. Bassler**, Negative feedback loops involving small regulatory RNAs precisely control the *Vibrio harveyi* quorum-sensing response, 2010, 567-579
- P. Valentin-Hansen, M. Eriksen and C. Udesen**, The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions, 2004, 1525-1533
- M. van der Linden, A. Al-Lahham, W. Nicklas and R. R. Reinert**, Molecular characterization of pneumococcal isolates from pets and laboratory animals, 2009, e8286
- S. Vatter**, Die regulatorische Rolle der csRNA4 in *Streptococcus pneumoniae*, 2010, Bachelorarbeit, TU Kaiserslautern
- B. Vecerek, I. Moll and U. Bläsi**, Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding, 2007, 965-975
- C. S. Wadler and C. K. Vanderpool**, A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide, 2007, 20454-20459
- L. S. Waters and G. Storz**, Regulatory RNAs in bacteria, 2009, 615-628
- B. Weber, K. Ehlert, A. Diehl, P. Reichmann, H. Labischinski and R. Hakenbeck**, The fib locus in *Streptococcus pneumoniae* is required for peptidoglycan crosslinking and PBP-mediated beta-lactam resistance, 2000, 81-85.
- O. Ween, P. Gaustad and L. S. Håvarstein**, Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*, 1999, 817-827
- L. Weng, I. Biswas and D. A. Morrison**, A self-deleting Cre-loxP-ermAM cassette, chesire, for marker-less gene deletion in *Streptococcus pneumoniae*., 2009, in press
- A. H. West and A. M. Stock**, Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems, 2001, 369-376
- A. J. Wolfe**, The acetate switch, 2005, 12-50
- A. J. Wolfe**, Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction, 2010, 204-209
- M. Yamaguchi, Y. Terao, Y. Mori, S. Hamada and S. Kawabata**, PfbA, a novel plasmin- and fibronectin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*, contributes to fibronectin-dependent adhesion and antiphagocytosis, 2008, 36272-36279
- Y. Yang and M. Inouye**, Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*, 1991, 11057-11061
- Y. H. Yang, M. J. Buckley and T. P. Speed**, Analysis of cDNA microarray images, 2001, 341-349

- D. Zähler, T. Grebe, E. Guenzi, J. Krauss, M. van der Linden, K. Terhune, J. B. Stock and R. Hakenbeck**, Resistance determinants for beta-lactam antibiotics in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are involved in genetic competence, 1996, 187-191.
- D. Zähler, K. Kaminski, M. van der Linden, T. Mascher, M. Meral and R. Hakenbeck**, The *ciaR/ciaH* regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*, 2002, 211-216
- A. Zbinden, N. J. Mueller, P. E. Tarr, C. Sproer, P. M. Keller and G. V. Bloemberg**, *Streptococcus tigurinus* sp. nov., isolated from blood of patients with endocarditis, meningitis and spondylodiscitis, 2012, 2941-2945
- I. Zerfaß**, Die Steuerung der Aktivität des Response Regulators CiaR des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*, 2010, Dissertation, TU Kaiserslautern
- G. Zhao, T. I. Meier, S. D. Kahl, K. R. Gee and L. C. Blaszcak**, BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins, 1999, 1124-1128
- X. Zhao, B. J. Koestler, C. M. Waters and B. K. Hammer**, Post-transcriptional activation of a diguanylate cyclase by quorum sensing small RNAs promotes biofilm formation in *Vibrio cholerae*, 2013, 989-1002
- M. Zuker**, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, 2003, 3406-3415

7 Anhang

Hier ist die Sequenz des in Kapitel 4.5.5 verwendeten pEX-A der Firma Eurofins MWG Operon.

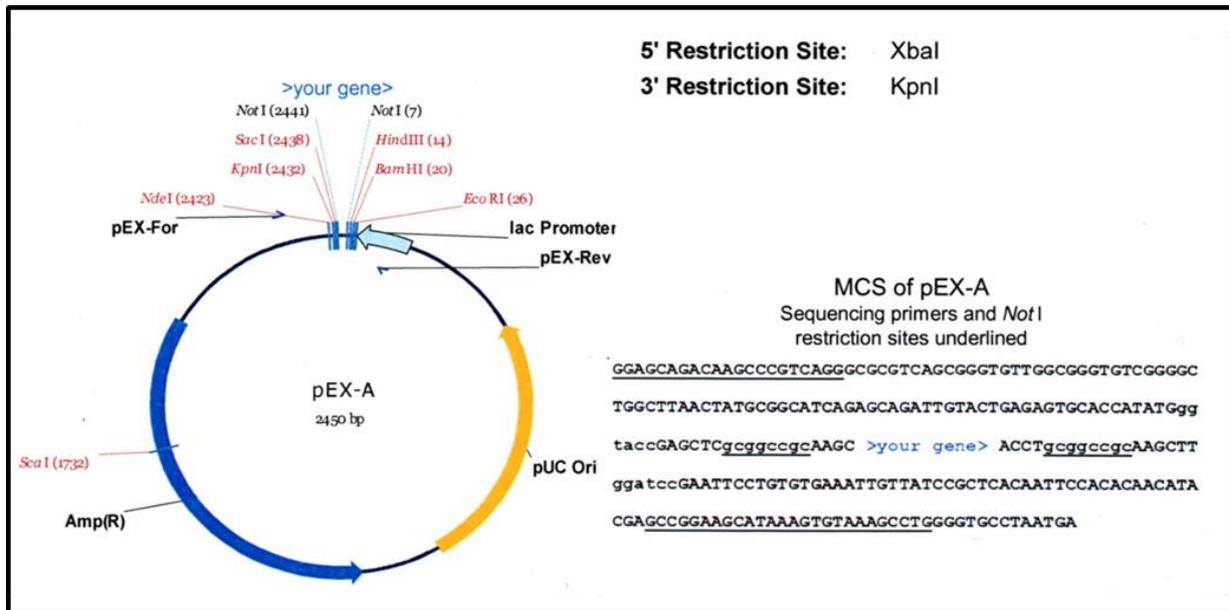


Abbildung A.1: Genetische Organisation des von der Firma Operon verwendeten pEX-A Plasmid.

Die Abbildung zeigt die genetische Organisation des Plasmids pEX-A. Die synthetisch hergestellten Konstrukte können mit Hilfe einer 5'-XbaI- und 3'-KpnI-Restriktionsschnittstelle aus diesem Plasmid isoliert werden. Dieses Plasmid enthält das Gen Amp(R) wodurch eine Selektion in *E. coli* ermöglicht wird. Über die Primer pEX-For und pEX-Rev kann der Bereich, welcher die gewünschte Sequenz enthält, amplifiziert werden. Der Replikationsursprung ist aus dem pUC Plasmid. Die Anwesenheit des lac Promotors war in dieser Arbeit nicht von Bedeutung.

Im Anschluss ist ein Teil der Sequenz der in Kapitel 4.5.5 verwendeten Plasmid pSW1-ccnD-C8c, pSW1-ccnD-AA und pSW1-PM1-ccnA dargestellt.



Abbildung A.2: Teilsequenz des in dieser Arbeit konstruierten pSW1-ccnD-C8c.

Die Abbildung zeigt einen Teil der Sequenz des verwendeten pSW1-ccnD-C8c. Die cia Box, die -10 Region und die Veränderungen in der csRNA4 sind rot hinterlegt.

```

1  ctagaccaag aaaaattggc aggagaaatg gaaaaatttg atttttaaaa atacttaagg aaactttaag ctagggaagt tacactaagt tcaatagta agaagacct aacttaact cctaaaaact tttcataata
gatctggttc tttttaaccg tctcttttac ctttttaaac taaaaatttt tatgaatttc tttgaaattc gatccctcac atgtgattca agtattcaat tctcttgga ttgaatttga ggattttgaa aaagtattat
                                     cia box      cia box      -10
                                     >>.....ccnD-AA.....>>
                                     i s - e d i n l n s - n f f i i

141 aaatctccct ataaaaataa agtgoccaa tcaggcggtt tatttttttg aaaaatgggc ttggtgctgc agaataataa ggtaccatgc gctagcttgt gagcttggac tagaaaaaaa cttcagaata tgctatacta
tttagagga tatttttatt tcagcgggtt agtcgcgga ataaaaaac ttttaaccg accacgggac tctttttat ccattgtaac cgtatgaaca ctgcacctg atctttttt gaagtgttt acgatatgat
AA Insertion
>.....ccnD-AA.....>>
k s p y k n k v a q s g g l f f

281 ggtaggtaaa aaatattcgg aggaatttcc atatgaacc ggaatcggtc cgcattatc ttggtgctgc catgggtgcc aatcggtta ttggcaatg tccgatata cccctgaaa tcccaggtga gcagaagatt
coatccattt tttataagcc tctttaaag tatacttggg ccttagccag gcttaaatag accagcgagc gtaccacgg ttagcccaat aacggtacc agggctatag gggaccttt aggttccact cgtcttctaa
                                     NcoI      BstI      NheI
                                     >>.....ccnD-AA.....>>
                                     m n p e s v r i y l v a a m g a n r v i g n g p d i p w k i p g e q k i
                                     EcoRV

```

Abbildung A.3: Teilsequenz des in dieser Arbeit konstruierten pSW1-ccnD-AA.

Die Abbildung zeigt einen Teil der Sequenz des verwendeten pSW1-ccnD-AA. Die cia Box, die -10 Region und die Veränderungen in der csRNA4 sind rot hinterlegt.

```

1  ctagattgta taggatgac ttggatgat cgtaaaaaat ascaaaactt gtttttttt aagcaaaatt taaggatgt atgggtataat atagtcatta aataaagacc tcttaactt atttaataa atcctaaact
gatcctaact atccctactg aacctactta gcaattttta ttgttttgaa caaaaaaaa ttctgtttta atctctacca taccatatta taccagtaat ttattttctg aggattgaa taaattttt taggatttga
                                     cia box      cia box      ext -10
                                     >>.....ccnA.....>>
                                     i k - r p p n f i - - n p k

141 tttttcatca caatctccta atgaagccac coaatcaggt ggcttttttg cgtgggtgag tgctgggtat aggttaccat gcgctagctt gtgagcttgg actagaaaaa aacttcacaa aatgctatac taggtaggtta
aaaaagtagt gtttagagat tactctgggt ggtagtoca cogaaaaaac gcaccactcc acgaccacta tcccatggtta cgcgatcgaa cactcgaacc tgatctttt ttgaagtgtt ttacgatatg atccatccat
>.....ccnA.....>>
l f s s q s p n e a t q s g g f f

281 aaaaaatcgc ggaggaattt tcaatgaac ccggaatcgg tcgcattata tctggtgctg gccatgggtg ccaatcggtt tattggcaat ggtcccgata tcccttgaaa aatcccaggt gacgagaaga tttttccag
ttttataag cctccttaaa agtatacttg gcccttagcc aggggtaaat agaccagaga cgttaccacc ggttagccca ataaccgcta ccagggtcat aggggacctt ttagggtoca ctogtcttct aaaaagctc
                                     ApoI      BstI      NheI      KpnI      NheI
                                     >>.....ccnA.....>>
                                     m n p e s v r i y l v a a m g a n r v i g n g p d i p w k i p g e q k i f r
                                     ApoI      TaqI      NcoI      TaqI      EcoRV

```

Abbildung A.4: Teilsequenz des in dieser Arbeit konstruierten pSW1-PM1-ccnA.

Die Abbildung zeigt einen Teil der Sequenz des verwendeten pSW1-PM1-ccnA. Die cia Box, die -10 Region und die Veränderungen im Promotor der csRNA1 sind rot hinterlegt.

Publikationen

A. Schnorpfeil, M. Kranz, M. Kovacs, C. Kirsch, J. Gartmann, I. Brunner, S. Bittmann and R. Brückner, Target evaluation of the non-coding csRNAs reveals a link of the two-component regulatory system CiaRH to competence control in *Streptococcus pneumoniae* R6, 2013, 334-349

A. Halfmann, A. Schnorpfeil, M. Müller, P. Marx, U. Günzler, R. Hakenbeck and R. Brückner, Activity of the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae* R6, 2011, 96-104

Danksagung

Nun ist es Zeit einigen Menschen Danke zu sagen, die mich in den vergangenen Jahren fachlich und persönlich unterstützt haben und darüber, wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragene haben.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Reinhold Brückner für die Überlassung des interessanten Themas, für die ausgezeichnete Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen, die Unterstützung in allen praktischen und theoretischen Fragen, für die vielen Ideen und Ratschläge und die wertvollen Diskussion die entscheidend zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

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.

Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck danke ich für die tolle Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen, die interessanten Diskussionen und vielzähligen Anregungen.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung, die gute Zusammenarbeit, die angenehme Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Ein besonderer Dank geht dabei an Julia, Ulrike, Miriam, Tina, Patrick, Kathi, Marina und Inga für die moralische Unterstützung an Tagen, an denen im Labor nichts klappen wollte.

Danke an alle Praktikanten für die Bereitstellung von Konstrukten, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

Danke auch an all meine Freunde für das ständige Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass sie immer für die nötige Abwechslung sorgten. Ulrike, Julia, Patrick, Sarah und Katharina danke ich noch sehr für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Vielen Dank für eure langjährige Freundschaft. Es ist toll, solche Freunde zu haben.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie die immer hinter mir stand und mich in allem unterstützt hat.

Zum Schluss ein riesen großes Dankeschön an meinen Ehemann Heiko, der es immer wieder schafft mich zum Lachen zu bringen und mir daher, besonders an nicht so guten Tagen, eine wahnsinnige Unterstützung war. Danke für deine Geduld und deine motivierenden Worte, die den Elektroschocker Einsatz unnötig machten!

Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Anke Laux geb. Schnorpfeil

Schul- und Berufsausbildung

- seit 06/2010 Technische Universität Kaiserslautern
wissenschaftliche Mitarbeiterin zur Promotion in der Abteilung
Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie
- 04/2010 – 04/2012 Empfängerin eines Stipendiums der Stipendienstiftung Rheinland-
Pfalz
Thema: Auswirkungen der post-transkriptionellen Regulation durch
die CiaRH regulierten csRNAs auf die Kompetenz und β -
Laktamresistenz in *Streptococcus pneumoniae*
- 04/2005-01/2010 Technische Universität Kaiserslautern,
Studium der Biologie – Abschluss als Diplom-Biologin
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfach: Proteinfunktionen/Proteomics, Allgemeine BWL
Thema der Diplomarbeit: Die Rolle der Histidinkinase CiaH im Zwei-
Komponenten-System CiaRH, in *Streptococcus pneumoniae*
- 08/2006 – 01/2007 James Cook University Townsville (Australien)
Studium der Biologie
Fächer: Molecular Biology, Introductory Marine Science, Introduction
to Physiology and Pharmacology
- 08/1994 – 03/2003 Integrierte Gesamtschule Kastellaun
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 08/1990 – 06/1994 Grundschule Mörsdorf