Charakterisierung des Regulators RovS und Identifizierung potentieller Virulenzfaktoren in *Streptococcus agalactiae*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von
Ulrike Maria Samen
aus Augsburg



Ulm, im Oktober 2005

„Das Schönste, was wir entdecken können, ist das Geheimnisvolle“

(Albert Einstein)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dieter J. Reinscheid und Herrn Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns angefertigt.

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

1. **Referent**: Prof. Dr. Dieter J. Reinscheid
2. **Referent**: Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns

Tag der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Ulm, im Oktober 2005.

.....

Ulrike Samen

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. Einleitung 1

II. Material und Methoden 10

1. Kits, Enzyme und Oligonukleotide 10
1.1. Kits 10
1.2. Enzyme 10
1.3. Oligonukleotide 11
1.4. Antikörper 16

2. Plasmide 17

3. Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien 20

4. Stammhaltung, Kultivierungsbedingungen und Nährmedien 21
4.1. Kultivierung von *E. coli* 21
4.2. Kultivierung von *S. agalactiae* 23
4.3. Kultivierung von eukaryotischen Zellen 23

5. Isolierung von DNA 25
5.1. Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken 25
5.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* 26

6. Arbeiten mit RNA 28
6.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Streptokokken 29
6.2. Herstellung eines RNA-Agarosegels 30

7. Sequenzierung von DNA 31

8. Aufreinigung von DNA 31
8.1. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung 31
8.2. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen 32

9. Agarosegelelektrophorese 33

10. Polymerasekettenreaktion 34
10.1. Herstellung von cDNA mit random hexamer Primern 36
10.2. Quantitative realtime PCR im LightCycler 37
10.3. Erstellen einer Kalibriergeraden 38

11. Southern-Blot-Analyse 39
11.1. Southern-Blot-Transfer 30
11.2. Southern-Hybridisierung 40
11.3. Detektion durch Chemilumineszenz 41

12. DNA-Chip-Experimente 42

13. Rekombination von DNA 43
13.1. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen 43
13.2. Dephosphorylierung durch CIAP 44
13.3. Ligation und Dialyse 45

14. Transformation durch Elektroporation 45
14.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen 45
14.2. Herstellung kompetenter *S. agalactiae*-Zellen 46
14.3. Elektroporation in *E. coli* 46
14.4. Elektroporation in *S. agalactiae* 47

15. Herstellung von definierten Deletionsmutanten in *S. agalactiae* 47
15.1. Cross-over-PCR 47
15.2. Herstellung definierter Deletionsmutanten 48

16. Adhärenz und Invasion 49
16.1. Vorbereitung der Zellen für Adhärenz- und Invasionsversuche 50
16.2. Adhärenztest 51
16.3. Invasionstest 52
16.4. Auswertung 52
16.5. Zugabe von Fusionsproteinen in den Adhärenz-/ Invasionsversuch 53

17. Immunfluoreszenz 53
17.1 Vorbereitung der Zellen für die Immunfluoreszenz 53
17.2 Vorbereitung der Bakterienstämme 54

18. Bindung FITC-markierter Bakterien an immobilisierte Proteine 55

19. Proteinchemische Arbeiten 56
19.1. Herstellung von prokaryotischen und eukaryotischen Zellfraktionen 56
19.2. Auftrennung von Proteinen durch diskontinuierliche SDS-PAGE 58
19.3. Färbung von Proteinen in SDS-Gelen 60
19.4. Western-Blot 61
19.5. Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* 63
19.6. Dialyse mit dem Dialyseschlauch 65
19.7. Ankonzentrierung von Proteinen über Polyethylen-Glycol 65
19.8. Proteinbestimmung nach Bradford 66
19.9. Herstellung polyklonaler Antikörper 66
19.10. Protein Elution aus SDS-Polyacrylamid-Gelen 67
19.11. ELISA 67
19.12. Gelfiltration 68

20. Analyse von Protein-DNA-Interaktionen 70
20.1. Gelretadationsexperimente 69

21. Bestimmung der ß-Galactosidase-Aktivität 72

22. Hämolyseassay 73

III. Ergebnisse 76

1. Einfluß des Regulators RovS auf die Virulenz von *S. agalactiae* 6313 76
1.1. Die *rovS*-codierende Region in *S. agalactiae* 76
1.2. Bedeutung des Regulators RovS für die Virulenz von *S. agalactiae* 6313 77
1.3. Epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung des *rovS*-Gens 88
1.4. Herstellung eines RovS-Fusionsproteins 89
1.5. Bandshift Experimente zur Identifizierung des RovS-DNA-Bindemotivs 91
1.6. Gelfiltrationsexperimente zur Bestimmung der nativen molaren Masse von RovS 99

2. Funktionelle Analysen zur Bedeutung von Hsh für die Virulenz von *S. agalactiae* 101
2.1. Die *hsh*-codierende Region in *S. agalactiae* 101
2.2. Analyse der Interaktion des Hsh-Proteins mit eukaryotischen Proteinen 102
2.3. Identifizierung der Keratin 4-bindenden Domäne des Hsh-Proteins 105
2.4. Identifizierung der Hsh-bindenden Domäne des humanen Keratin 4 109
2.5. Untersuchung zur Bindung von Hsh an Fibrinogen 113
2.6. Bedeutung des Hsh-Proteins für die Virulenz von *S. agalactiae* 6313 116
2.7. Epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung des *hsh*-Gens 123
2.8. Nachweis des Hsh-Proteins auf der Oberfläche von *S. agalactiae* 6313 125

3. Funktionelle Charakterisierung des Regulators RogB2 aus *S. agalactiae* NEM316 127
3.1. Bedeutung des Regulators RogB2 für die Virulenz von *S. agalactiae* NEM316 127

IV. Diskussion 134

V. Zusammenfassung 149

VI. Summary 152

VII. Literaturverzeichnis 155

VIII. Anhang 181

1. Material und Chemikalien 181

2. Abkürzungen 188

3. DNA- und Proteinsequenzen 192

Publikationsliste & wissenschaftliche Beiträge 199
Lebenslauf 201
Danksagungen 203
Unterstützung universitärer und nicht-universitärer Einrichtungen 204

I. Einleitung

Lange Zeit wurden Streptokokken zusammen mit Laktokokken und Enterokokken aufgrund gemeinsamer, physiologischer Eigenschaften in die Familie der *Lactobacteriaceae* eingeordnet (Schlegel, 1992; Kayser *et al*, 1998). Inzwischen zählen die Gattungen *Streptococcus* und *Lactococcus* zur Familie der *Streptococcaceae* (Garrity *et al*, 2001). Bei der Gattung *Streptococcus* handelt es sich um Gram-positive, sphärische bis ovale, nicht sporulierende, unbewegliche Zellen, die in Paaren oder in Ketten vorliegen. Obwohl die Vertreter dieser Gattung Sauerstoff zum Wachstum nicht nutzen können, sind die meisten Streptokokken in der Lage, in dessen Gegenwart zu leben. Man bezeichnet sie somit als aerotolerant. Der Grund für die anaerobe Lebensweise ist das Fehlen einer intakten Atmungskette, da Streptokokken nur unvollständige Synthesewege für Hämin und Chinone besitzen (Glaser *et al*, 2002; Tettelin *et al*, 2002). Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, daß *Streptococcus agalactiae* bei externer Gabe einer Hämin- und Quinonquelle eine funktionsfähige Atmungskette ausbildet und somit in der Lage ist, Sauerstoff zur Energiegewinnung zu nutzen (Yamamoto *et al*, 2005). In der Regel gewinnen Streptokokken allerdings die für das Zellwachstum notwendige Energie durch die anaeorbe Fermentation von Kohlenhydraten. Dabei wird Glucose homofermentativ zu Lactat umgesetzt. Die Nährstoffansprüche von Streptokokken sind sehr hoch, so daß ein optimales Wachstum nur auf komplexen Nährböden erreicht wird. Deshalb wird dem Medium neben Vitaminen und Aminosäuren häufig auch Hefe, Molke, Blut oder Serum zugesetzt.

Aufgrund ihres Hämolyseverhaltens auf bluthaltigen Nährböden werden Streptokokken in drei unterschiedliche Hämolyseklassen eingeteilt. Dabei unterscheidet man unvollständig hämolysierende (α-Hämolyse), vollständig hämolysierende (β-Hämolyse) und nicht hämolysierende (γ-Hämolyse) Streptokokken (Brown, 1919). *Streptococcus agalactiae* zählt zur Gruppe der β-hämolysierenden Streptokokken, welche Hämolysine bilden mit deren Hilfe sie Erythrocytenmembranen zerstören. Das dabei freigesetzte Hämoglobin wird anschließend durch bakterielle Proteasen gespalten. Aus diesem Grund sind *S. agalactiae*-Kolonien nach Wachstum auf Blut-Agarplatten von einem klaren, weißen Hämolysehof umgeben.

Anfang der 30er Jahre wurde von Rebecca Lancefield ein zusätzliches Klassifizierungsschema für Streptokokken eingeführt. Anhand gruppenspezifischer Polysaccharid-Antigene in der Zellwand wurden Streptokokken zuerst in die Serogruppen A-E eingeteilt (Hahn *et al*, 1991; Lancefield, 1933; Kayser *et al*, 1998). Diese Klassifizierung wurde inzwischen erweitert, so daß

man nun Streptokokken in die Serogruppen A-W unterteilt (Kayser *et al,* 1998). Innerhalb der Serogruppe A stellt *Streptococcus pyogenes* den einzigen Vertreter dar, weshalb die Bezeichnung Gruppe A Streptokokken (GAS) und *Streptococcus pyogenes* meist synonym verwendet wird. *S. agalactiae* galt bis ins Jahr 1997 als einziger Vertreter der Serogruppe B, allerdings wird seit kurzem auch das nicht humanpathogene Bakterium *Streptococcus difficile* dieser Serogruppe zugeordnet (Berridge *et al,* 2001; Vandamme *et al,* 1997). In einer aktuellen Studie zur genetischen Verwandtschaft von *S. agalactiae* und *S. difficile* wurde vorgeschlagen, die Bezeichnung *S. difficile* als Synonym für *S. agalactiae* einzuführen (Kawamura *et al,* 2005). Somit wäre es möglich, die Bezeichnung Gruppe B Streptokokken (GBS) und *S. agalactiae* auch weiterhin sinngleich zu verwenden.

S. agalactiae besitzt eine Polysaccharidkapsel, die antiphagozytäre Eigenschaft besitzt (Marques *et al,* 1992, Morven *et al,* 1982, von Hunolstein *et al,* 1993). Aufgrund unterschiedlicher Zuckerbestandteile der Kapsel und deren Verknüpfungsmuster läßt sich *S. agalactiae* in die Serotypen Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII bzw. VIII unterteilen (Kogan *et al,* 1996; Lancefield, 1934; Paoletti *et al,* 1999; von Hunolstein *et al,* 1999; Wessels, 1997). Zusätzlich kann *S. agalactiae* durch die Oberflächen-gebundenen Proteinantigene Cα, Cβ und Rib und durch genetische Analysen weiter subklassifiziert werden (Ferrieri, 1988; Lindahl *et al,* 2005; Stalhammar-Carlemalm *et al,* 1993; Adderson *et al,* 2000; Gordillo *et al,* 1993; Helmig *et al,* 1993; Tamura *et al,* 2000; Takahashi *et al,* 1998).

Im Jahr 1887 wurde *S. agalactiae* erstmals als Verursacher einer Mastitis bei Rindern identifiziert (Nocard & Mollereau, 1887). Beim Menschen stellt *S. agalactiae* einen Teil der normalen Flora des Gastrointestinal- und Vaginaltraktes dar, ohne klinische Symptome hervorzurufen (Schuchat, 1999). Als Verursacher einer puerperalen Sepsis (Kindbettfieber) wurde *S. agalactiae* erstmals im Jahr 1937 identifiziert (Colebrook & Purdie, 1937). Zwei Jahre später wurde *S. agalactiae* als Verursacher einer Sepsis bei Neugeborenen isoliert (Brown, 1939). Seit Mitte der 60er Jahre gilt *S. agalactiae* offiziell als humanpathogenes Bakterium (Wilkinson *et al,* 1973). Insbesonders für ältere Menschen, Immunsupprimierte, aber auch für Diabetes Patienten stellen Erkrankungen durch *S. agalactiae* eine zunehmende Gefahr dar. Zu den durch *S. agalactiae* verursachten Krankheiten zählen Abszesse, Endokarditiden, Meningitiden, Pneumonien und Wundinfektionen (Akram & Kahn, 2001; Blankas *et al,* 2004; Farley *et al,* 1993; Honig *et al,* 1999; Kayser *et al,* 1998; Schuchat, 1998). Im Jahre 1973 wurde

S. agalactiae als Hauptverursacher bakterieller Infektionen, wie Pneumonien und Septikämien, bei menschlichen Neugeborenen anerkannt (Wilkinson *et al,* 1973). In selteneren Fällen ist *S. agalactiae* Verursacher der perinatalen Meningitis (Spellerberg, 2000). Im Allgemeinen treten *S. agalactiae*-Infektionen bei Neugeborenen in den Vereinigten Staaten mit einer Häufigkeit von 1-2 pro 1000 Lebendgeburten auf. (Beardsall *et al,* 2000; Kayser *et al,* 1998; Lüttiken, 1983). In Europa liegt die Inzidenz einer Infektion durch *S. agalactiae* bei 0,08-1,42 pro 1000 Lebendgeburten (Bignardi, 1999; Embleton *et al,* 1999; Heath *et al,* 2004; Trijbels-Smeulders *et al,* 2002; Weisner *et al,* 2004). Epidemiologische Untersuchungen in den USA und in Europa zeigten auf, daß 86 – 90 % aller klinischen *S. agalactiae*-Isolate den Serotypen Ia, II, III bzw. V zuzurechnen sind (Hickman *et al,* 1999; Weisner *et al,* 2004; Zaleznik *et al,* 2000). Die Verteilung der unterschiedlichen Serotypen ist dabei starken ethnischen und geographischen Schwankungen unterworfen (Campbell *et al,* 2000; Hickman *et al,* 1999; Lachenauer *et al,* 1999). Ursache für die häufige Infektion von Neugeborenen durch *S. agalactiae* ist die Tatsache, daß 10-30 % aller schwangeren Frauen meist symptomlos im Vaginalbereich mit diesen Bakterien besiedelt sind. Durch Schluckbewegungen des Kindes bei der Geburt kann *S. agalactiae* in die mit Fruchtwasser gefüllte Lunge des Neugeborenen gelangen und somit zu einer Infektion des Säuglings führen. Diese Art der Infektion wird als “early onset disease“ bezeichnet, bei der das Neugeborene bereits einige Stunden bis Tage nach der Geburt eine Lungenentzündung oder Sepsis entwickelt. Die Mortaliät bei diesem Krankheitsverlauf liegt bei 10-15 % (Baker & Edwards, 1995; Puopolo *et al,* 2005). Eine weitere Art der *S. agalactiae*-Infektion wird als “late onset disease“ bezeichnet, wobei die Säuglinge mehrere Tage bis Wochen nach der Geburt erkranken. Die Symptomatik einer solchen Infektion zeichnet sich meist durch Meningitiden und Septikämien aus (Lüttiken, 1983). Die Sterberate liegt in diesem Fall bei 2-6 % und mehr als die Hälfte aller überlebenden Säuglinge weisen neuronale Folgeschäden auf (Baker & Edwards, 1995; Haase *et al,* 2003; Ho *et al,* 1999). Die genauen Faktoren, die zur Entwicklung einer “late onset disease“ führen, sind bis heute weit weniger bekannt, als die des “early onset disease“-Verlaufs. Es wird allerdings vermutet, daß bei einer “late onset disease“ Säuglinge erst nach der Geburt durch Personen aus ihrem Umfeld, welche symptomlos mit *S. agalactiae* besiedelt sind, infiziert werden (Baker & Edwards, 1995; Lüttiken, 1983).

Obwohl *S. agalactiae* bereits seit Jahrzehnten als humanpathogenes Bakterium bekannt ist und Infektionen nicht nur für Neugeborene sondern verstärkt auch für Erwachsene eine Gefahr darstellen, sind die Pathogenitätsmechanismen, die einer Erkrankung mit diesem Erreger

zugrunde liegen, nur unzureichend verstanden. Die Pathogenese einer *S. agalactiae*-Infektion ist ein Prozeß, der viele Faktoren umfaßt. Dazu zählt die Fähigkeit der Bakterien, an Epithel- und Endothelzellen zu adhärieren, diese zu besiedeln und schließlich in Epithelzellen einzudringen. Die Adhärenz, welche den ersten Schritt einer Infektion darstellt, ist dabei ein Schlüsselereignis einer *S. agalactiae*-Infektion. Dadurch wird es den Bakterien ermöglicht, in Wirtszellen und tiefere Gewebeschichten vorzudringen, um sich anschließend über die Blutbahn in andere Körperregion auszubreiten. Grundlage für eine erfolgreiche Adhärenz ist dabei die Interaktion von Oberflächenstrukturen der Bakterien und des Wirtes. Es ist bekannt, daß spezifische bakterielle Oberflächenproteine, die als MSCRAMMs (**M**icrobial **S**urface **C**omponents **R**ecognizing **A**dhesive **M**atrix **M**olecules) bezeichnet werden, bei der Adhärenz eine wichtige Rolle spielen (Patti *et al,* 1994). Typisch für diese MSCRAMMs ist die Präsenz einer N-terminaler Signalpeptidsequenz, wodurch das Ausschleusen des Proteins aus der Zelle ermöglicht wird, sowie das Vorhandensein eines C-terminalen Zellwandankermotivs, mit dem das Protein kovalent in der bakteriellen Zellwand verankert wird (Navarre & Schneewind 1994; Schneewind *et al,* 1995). Zielmoleküle dieser potentiellen Adhäsine sind meist Proteine der extrazellulären Matrix (ECM). Die ECM ist eine proteinreiche Schicht, zu deren Komponenten Fibronektin, Laminin, Kollagen und Tenascin zählen, und welche Epithelien mit tiefer gelegenen Geweben verbindet (Hay *et al*, 1991).

Für *S. agalactiae* wurde bereits mehrfach die Fähigkeit der bakteriellen Adhärenz an Epithel- und Endothelzellen beschrieben (Broughton *et al,* 1983; Mardh *et al,* 1976; Mikamo *et al,* 2004; Tamura *et al,* 1994). Auch die Fähigkeit der Bakterien, an Makrophagen zu adhärieren, wurde bereits mehrfach untersucht (Sloan *et al,* 1993; Teixeira *et al,* 2001). Trotz allem ist der molekulare Hintergrund der Adhärenz von *S. agalactiae* an eukaryotische Wirtszellen bislang wenig verstanden. In den 80er Jahren wurde die Beteiligung von Lipoteichonsäuren an der Adhärenz von *S. agalactiae* diskutiert (Nealon *et al,* 1884; Teti *et al,* 1987), jedoch konnte diese Vermutung in weiteren Studien nicht bestätigt werden (Miyazaki *et al,* 1988; Tamura *et al,* 1994). Diskussionen darüber, daß Proteine auf der Oberfläche von *S. agalactiae* für die Adhärenz an Wirtsgewebe verantwortlich sind, konnten hingegen durch die Tatsache bekräftigt werden, daß eine Proteasebehandlung der Bakterien zu einer stark reduzierten bakteriellen Adhärenz an Epithelzellen führt (Bulgakova *et al,* 1986; Tamura *et al,* 1994). Ein als Hsa bezeichnetes Oberflächenprotein aus *Streptococcus gordonii* wurde bereits in mehreren Studien näher untersucht und es konnte gezeigt werden, daß es eine Rolle bei der Adhäsion an Wirtszellen und der bakteriellen Hämagglutination spielt (Takahashi *et al,* 2002). Auch für

S. agalactiae wurde ein Protein identifiziert, das signifikante Ähnlichkeit zum Protein Hsa aus *S. gordonii* aufweist und aus diesem Grund als Hsh (**Hs**a-**H**omolog) bezeichnet wurde (Ripka, 2003). Die Bedeutung von Hsh für die bakterielle Adhärenz und die allgemeine Virulenz von *S. agalactiae* war zu Beginn dieser Arbeit noch unklar.

Neben der Fähigkeit der Adhärenz an Epithel- und Endothelzellen wurde für *S. agalactiae* auch die Bindung an humane Proteine, wie Keratin 8, Fibrinogen, Fibronektin und Laminin beschrieben. Die spezifische Interaktion von *S. agalactiae* mit humanem Keratin 8 und dessen Bedeutung für die Adhärenz der Bakterien ist bislang noch ungeklärt (Tamura *et al,* 2000). Fibrinogenbindung wird jedoch in *S. agalactiae* maßgeblich durch das FbsA-Protein vermittelt (Schubert *et al,* 2002 & 2004; Zakikhany, 2002). Zudem konnte für FbsA eine wichtige Funktion bei der Adhärenz von *S. agalactiae* an humane Lungenepithelzellen nachgewiesen werden (Schubert *et al,* 2004). In neueren Studien wurde in *S. agalactiae* ein weiteres Fibrinogen-bindendes Protein identifiziert, das als FbsB bezeichnet wurde (Gutekunst *et al*, 2004). Allerdings zeigte die Inaktivierung des entsprechenden *fbsB*-Gens keinen Einfluß auf die Fibrinogenbindung von *S. agalactiae*. Dennoch scheint FbsB eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Invasion in humane Lungenepithelzellen zu spielen (Gutekunst *et al*, 2004). Ein weiteres Oberflächenprotein von *S. agalactiae* ist die C5a-Peptidase, eine Serin-Protease, welche durch das *scpB*-Gen codiert wird. ScpB vermittelte die Bindung von *S. agalactiae* an immobilisiertes Fibronektin, ist jedoch nicht an der bakteriellen Adhärenz beteiligt (Beckmann *et al,* 2002). Die Bindung von *S. agalactiae* an Laminin wird durch das bakterielle Oberflächenprotein Lmb vermittelt. Die Bedeutung dieses Proteins für die Adhärenz von *S. agalactiae* an Wirtsgewebe ist noch unklar, jedoch wird vermutet, daß es eine Rolle bei der bakteriellen Besiedelung der Epithelien in Vagina und Rektum spielt (Spellerberg *et al*, 1999).

Neben der Adhärenz an Epithel- und Endothelzellen, stellt die Invasion der Bakterien in die besiedelten Wirtszellen einen wichtigen Schritt in der Etablierung einer *S. agalactiae*-Infektion dar. Die Bakterien sind dadurch in der Lage, in tiefere Gewebeschichten vorzudringen, um sich letztendlich über die Blutbahn in andere Körperregionen auszubreiten. Die Fähigkeit zur Invasion in menschliche Zellen wurde bereits mehrfach für *S. agalactiae* beschrieben (Gibson *et al,* 1993; La Penta *et al,* 1997; Mikamo *et al,* 2004; Rubens *et al*, 1992; Tyrrell *et al,* 2002; Valentin-Weigand *et al,* 1997; Winram *et al,* 1998). Wie auch bei der Adhärenz ist der molekulare Hintergrund der bakteriellen Invasion in Wirtsgewebe noch größten Teils unklar. Dennoch war es möglich, in mehreren Studien Virulenzfaktoren zu identifizieren, die bei der

Invasion von *S. agalactiae* eine wichtige Rolle spielen. So zeigte eine *scpB*-Mutante eine stark reduzierte Invasion in die humanen Zelllinien A549 bzw. HEp2, was vermuten ließ, daß die C5a-Peptidase aus *S. agalactiae* die Funktion eines Invasins übernimmt (Cheng *et al,* 2002). Auch das Cytolysin CylE ist bei der Invasion der Bakterien in humane Lungenepithelzellen (Doran *et al,* 2002) und das Cα-Protein bei der Invasion der Bakterien in humane Gebärmutterhalszellen (Bolduc *et al,* 2002) beteiligt. Für das kürzlich identifizierte Fibrinogen-bindende Protein FbsB konnte ebenfalls gezeigt werden, daß es eine wichtige Rolle bei der Invasion von *S. agalactiae* in humane Lungenepithelzellen spielt (Gutekunst *et al,* 2004). Ein seit längerem bekannter Virulenzfaktor von *S. agalactiae* ist die Hyaluronatlyase, ein Enzym, das in der Lage ist Hyaluronsäure zu spalten. Hyaluronsäure ist ein lineares saures Polysaccharid aus alternierenden (1,3)-verknüpften Disaccharideinheiten, die sich aus (1,4)-verknüpften N-Acetyl-ß-D-Glucosamin- und ß-D-Glucuronsäure-Monomeren zusammensetzen. Hyaluronsäure kommt in vielen Teilen des menschlichen Körpers vor, insbesondere in der extrazellulären Matrix (Li *et al,* 2001). Es wird angenommen, daß die Hyaluronatlyase den Bakterien ein Eindringen in tiefer gelegene Gewebeschichten ermöglicht (Baker *et al,* 1997).

Einen weiteren Faktor, der zur Pathogenität von *S. agalactiae* beiträgt, ist die Fähigkeit der Bakterien, sich vor dem Komplementsystem des Wirtes zu schützen. Das Komplementsystem gehört zur unspezifischen, angeborenen Körperabwehr und besteht aus zahlreichen, im Blutplasma gelösten Proteinen und zellmembranständigen Rezeptoren (Staines *et al,* 1999). Die Komponenten des Komplementsystems liegen in der Regel inaktiv vor und werden kaskadenförmig aktiviert. Fremdkörper werden mittels chemotaktisch aktiver Substanzen markiert und letztendlich durch Phagozyten zerstört. Dieser Vorgang wird als Opsonophagozytose bezeichnet. Bereits in mehreren Studien konnte gezeigt werden, daß *S. agalactiae* in der Lage ist, sich mittels spezifischer Oberflächenproteine vor der Opsonophagozytose zu schützen. So ist die C5a-Peptidase in der Lage, den Komplementfaktor C5a durch Spaltung zwischen His^{67} und Lys^{68} zu inaktivieren, wodurch dessen chemotaktische Aktivität verloren geht und die Bakterien somit vor Makrophagen geschützt sind (Bohnsack *et al,* 1991 & 1992; Cleary *et al,* 1992; Takahashi *et al,* 1999). Phagozytoseresistenz erhalten die Bakterien zusätzlich durch das β-Antigen, welches ebenfalls auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiert ist. Das β-Antigen ist in der Lage, die Fc-Region des menschlichen Immunglobulins A (IgA) zu binden. Dadurch sind die Bakterien vor dem Immunsystem des Wirtes maskiert und werden nicht als Fremdkörper erkannt (Jarva *et al,* 2003; Jerlstrom *et al,* 1991; Russell-Jones *et al,* 1984). Zusätzlich ist *S. agalactiae* über das β-Antigen in der Lage, Faktor H (FH), einen

Negativregulator der Komplement-Aktivierung zu binden, wobei die Bindung des β-Antigens an menschliches IgA und FH über zwei unabhängige Domänen erfolgt (Areschoug *et al*, 2002; Jarva *et al,* 2004). Auch für das repetitive Cα-Protein aus *S. agalactiae* konnte die Bindung an IgA nachgewiesen werden (Heden *et al,* 1991). Im Allgemeinen ist die immunogene Aktivität des α-Antigens deutlich von der Anzahl der Sequenzwiederholungen im Protein abhängig (Gravekamp *et al,* 1997) und eine Inaktivierung des *bca*-Gens führt zu einer verminderten Virulenz von *S. agalactiae* im Mausmodell (Li *et al,* 1997). Eine weitere Möglichkeit der Bakterien sich vor dem Immunsystems des Wirtes zu schützen ist das Vorhandensein einer Kapsel mit darin enthaltener Sialinsäure. Sialinsäure ist ein charakteristischer Bestandteil eukaryotischer Aminozucker, die für Zell-Zell-Interaktionen von Bedeutung sind. Es wird vermutet, daß das Vorhandensein von Sialinsäure in der bakteriellen Kapsel als molekulare Mimikry zu betrachten ist, welches die Erkennung von *S. agalactiae* durch das menschliche Immunsystem erschwert (Feldman *et al,* 1998). Bereits in den frühen 80er Jahren wurde die Bedeutung der Sialinsäure für den bakteriellen Schutz vor Opsonophagozytose diskutiert. Durch Verwendung von *S. agalactiae*-Stämmen, die sich im Gehalt der Sialinsäure in ihrer Kapsel unterschieden, wurde gezeigt, daß das Vorhandensein von Sialinsäure in der Kapsel von *S. agalactiae* im Mausmodell zu einer deutlich abgeschwächten Immunantwort führt (Edwards *et al,* 1982; Markham *et al,* 1982). In späteren Studien konnte nachgewiesen werden, daß die Sialinsäure in der Kapsel von *S. agalactiae* die Aktivierung des alternativen Komplementweges unterdrückt (Marques *et al,* 1992; Platt *et al,* 1994) und die Produktion des Komplementfaktors C5a hemmt (Takahashi *et al,* 1999). Auch die Bindung von Fibrinogen vermittelt *S. agalactiae* Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes. So konnte in Studien zum Fibrinogenrezeptor FbsA aus *S. agalactiae* gezeigt werden, daß durch die Deletion des *fbsA*-Gens und dem damit verbundenen Verlust der Fibrinogenbindung das Überleben von *S. agalactiae* in menschlichem Vollblut signifikant erniedrigt wird (Schubert *et al,* 2002). Im Allgemeinen besitzt *S. agalactiae* somit zahlreiche Virulenzfaktoren, um sich vor dem Immunsystem des Wirtes zu schützen, was sicherlich einen großen Beitrag zur Pathogenität dieser Bakterien leistet.

Die Regulation der Expression von Virulenzfaktoren trägt dazu bei, daß *S. agalactiae* zum einen als harmloser Besiedler des menschlichen Urogenitaltraktes und zum anderen als humanpathogenes Bakterium in Erscheinung treten kann. Über die genetische Regulation von Virulenzfaktoren ist in *S. agalactiae* bis heute jedoch nur wenig bekannt. Die kürzlich veröffentlichten Genomsequenzen des *S. agalactiae* Serotyp III-Stammes NEM316 und des *S. agalactiae* Serotyp V-Stammes 2603 V/R weisen eine Reihe von Genen auf, die für

potentielle Virulenzregulatoren codieren (Glaser *et al,* 2002; Tettelin *et al,* 2002). Obwohl bereits einige Regulationssysteme aus *S. agalactiae* auf molekularer Ebene untersucht wurden, ist das Wissen über deren Stimuli und Zielfaktoren nur unzureichend (Chieslewicz *et al,* 2001; Jiang *et al,* 2005; Poyart *et al,* 2001; Spellerberg *et al,* 2002). Es ist jedoch bereits bekannt, daß die Adhärenz von *S. agalactiae* an menschliche Epithelzellen durch verschiedene Umweltsignale beeinflußt werden kann (Tamura *et al,* 1994). Der Einfluß von Sauerstoff auf die Invasivität von *S. agalactiae* konnte von Johri *et al* (2003) nachgewiesen werden und auch die Wachstumsrate der Bakterien spielt bei der Expression von Virulenzfaktoren eine wichtige Rolle (Paoletti *et al,* 1996; Ross *et al,* 1999).

Die Transkriptionsregulatoren der Rgg-Familie sind ausschließlich in Gram-positiven Bakterien anzutreffen. Zu dieser Familie gehören Regulatoren wie Rgg aus *Streptococcus gordonii,* der die Expression der Glykosyltransferase G reguliert (Sulavik *et al,* 1992 & 1996), GadR aus *Lactococcus lactis,* der für die Glutamat-abhängige Säuretoleranz notwendig ist (Sanders *et al,* 1998) bzw. MutR, der in *Streptococcus mutans* für die Produktion des Antibiotikums Mutacin II verantwortlich ist (Qi *et al,* 1999). Der Regulator Rgg aus *Streptococccus pyogenes,* auch bekannt als RopB, nimmt Einfluß auf die extrazellulare Produktion der Cystein-Protease SpeB (Chaussee *et al,* 1999; Lyon *et al,* 1998; Neely *et al,* 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Rgg in *S. pyogenes* auch die Synthese anderer sekretierter Proteine beeinflußt (Chaussee *et al,* 2001 & 2002). Desweiteren führte die Inaktivierung von *rgg* in diesem Bakterium zu einer veränderten Expression bekannter und potentieller Transkriptionsregulatoren, darunter eine Reihe von Zwei-Komponenten-Regulationssystemen, die insbesondere für die transkriptionelle Antwort auf veränderte Umweltbedingungen wichtig sind (Chaussee *et al,* 2002). Weitere Studien zeigten, daß Rgg in *S. pyogenes* als globaler Regulator nicht nur die Expression bestimmter Gene für Virulenzfaktoren beeinflußt, sondern auch auf die Wachstumsphasen-abhängige Synthese von Proteinen einwirkt, die mit dem Sekundärmetabolismus, sowie dem oxidativen und thermalen Streß in Verbindung gebracht werden (Chaussee *et al,* 2003 & 2004). Somit konnte Rgg als Transkriptionsregulator in *S. pyogenes* bereits genauer untersucht und dessen wichtige Rolle bei der bakteriellen Pathogenität nachgewiesen werden. In den beiden veröffentlichten Genomsequenzen von *S. agalactiae* war es möglich, drei potentielle Transkriptionsregulatoren der Rgg-Familie zu identifizieren, die durch die Gene *gbs0230, gbs1555* bzw. *gbs2117* codiert werden (Glaser *et al,* 2002; Tettelin *et al,* 2002). Es kann somit vermutet werden, daß die Proteine dieser Gene auch in *S. agalactiae* eine wichtige Funktion bei der Regulation von Virulenzgenen spielen.

Zusätzlich zur Rgg-Familie der Transkriptionsregulatoren existieren in *S. pyogenes* noch weitere transkriptionelle Regulationssysteme. Darunter auch die beiden Regulatorproteine Nra und RofA, die eine wichtige Rolle bei der Virulenz von *S. pyogenes* einnehmen (Beckert *et al,* 2001; Fogg *et al,* 1994 & 1997; Granok *et al,* 2000; Kreikemeyer *et al,* 2002; Podbielski *et al,* 1999). Nra und RofA zählen zur Familie der **R**of**A-l**ike-**p**roteins (RALP-Familie) und weisen untereinander eine Identität von 62 % auf (Fogg *et al,* 1994; Granok *et al,* 2000). Auch in den veröffentlichten Genomsequenzen der beiden *S. agalactiae*-Stämme NEM316 und 2603 V/R konnten mehrere Gene identifiziert werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu Proteinen der RALP-Familie aufweist (Glaser *et al,* 2002; Tettelin *et al,* 2002). Eines dieser Gene ist das *gbs1479*-Gen, das für den Regulator RogB (**r**egulator **o**f **GB**S) codiert, welcher seinerseits 30-35 %ige Identität zu den Regulatoren Nra und RofA aus *S. pyogenes* aufweist. Mittels Zellkulturexperimenten, Proteinbindungsversuchen und realtime-PCR-Experimenten konnte gezeigt werden, daß RogB deutlichen Einfluß auf die Virulenz von *S. agalactiae* nimmt (Gutekunst *et al,* 2003). In neueren Studien wurde ein als RogB2 bezeichnetes Regulatorprotein untersucht, das durch das Gen *gbs1530* codiert wird und auf genomischer Ebene 65 %ige Identität zu *rogB* aufweist. Erste Studien zeigten, daß auch RogB2 Einfluß auf die Virulenz von *S. agalactiae* nimmt (Eichner, 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des Regulators RovS (**r**egulator **o**f **v**irulence in ***S***. *agalactiae*), der durch das Gen *gbs1555* codiert wird und Ähnlichkeit zur Rgg-Familie der Transkriptionsregulatoren aus *S. pyogenes* aufweist. Zunächst galt es, eine *rovS*-Deletionsmutante und durch Einbringen eines plasmidcodierten *rovS*-Gens in diese Mutante eine *rovS*-Komplementante herzustellen. Mit Hilfe dieser Stämme wurde der Einfluß von RovS auf die Bindung von *S. agalactiae* an unterschiedliche humane Proteine, sowie die Adhärenz und Invasion der Bakterien an bzw. in humane Epithelzellen untersucht. Desweiteren wurde über LightCycler-Experimente der Einfluß von RovS auf die Expression bekannter und potentieller Virulenzfaktoren analysiert. Weiterhin war es von Interesse, das RovS-Protein näher zu untersuchen und mit Hilfe von Bandshift-Versuchen ein potentielles RovS-DNA-Bindemotiv zu identifizieren. In einem weiteren Teil der Arbeit wurde das Oberflächenprotein Hsh aus *S. agalactiae* näher charakterisiert. Dabei wurden mit Hilfe eines Hsh-Fusionsproteins (Ripka, 2003) potentielle, eukaryotische Hsh-Interaktionspartner analysiert. Des Weiteren wurde in Zellkulturexperimenten die Bedeutung von Hsh für die Virulenz von *S. agalactiae* untersucht. Im letzen Teil der Arbeit erfolgten weiterführende Studien zum Einfluß des Transkriptionsregulators RogB2 auf die Pathogenität von *S. agalactiae*.

II. Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Geräte und Materialien sind dem Anhang zu entnehmen.

1. Kits, Enzyme und Oligonukleotide

1.1. Kits

ECL-Kit	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
GFX™Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
LightCycler FastStart DNA Master SYBR GreenI	Roche Diagnositcs GmbH; Mannheim
Microcon 100-Microconcentratoren	Amicon GmbH; Witten
MicroSpin™ G-25 Columns	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
Nucleo Spin Extract 2 in 1	Macherey und Nagel GmbH; Düren
Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids	Macherey und Nagel GmbH; Düren
ReferdAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH; Hilden
T7 Sequencing™ Kit	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg

1.2. Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen und die entsprechenden Puffer wurden von den Firmen MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot und Roche Diagnostics GmbH, Mannheim bezogen.

Weitere verwendete Enzyme sind nachfolgend aufgelistet:

DNase (10 U/µl; RNase frei)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Mutanolysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Phusion HF DNA-Polymerase	Finnzymes OY; Espoo (Finnland)
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
RNase A (DNase-frei)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim

T4-DNA-Ligase (1 U/µl; 5 U/µl)	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	
- 1 U/µl	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
- 5 U/µl	MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot

1.3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden zum einen von der Firma MWG Biotech GmbH, Ebersberg, zum anderen von der Firma biomers.net GmbH, Ulm bezogen. Gemäß Herstellerangaben wurden sie mit 10 mM Tris/HCl pH 7,6 auf eine Endkonzentration von 100 pmol/µl eingestellt und für PCR-Reaktionen 1:10 mit A. bidest verdünnt.

Im Folgenden sind die in der Arbeit verwendeten Primer aufgeführt. Rot hervorgehoben sind Schnittstellen der Restriktionsenzyme, blau hervorgehoben sind komplementäre Bereiche zur Herstellung von Deletionskonstrukten.

Primer zur Herstellung einer *rovS*-Deletionsmutante

rovSdel1:	5´ GAGCGGGGTACCGTTGAGTGAATGAGTTGAC 3´	*Kpn*I
rovSdel2:	5´ CCCATCCACTAAACTTAAACATTCTGACTCTCCTCTCTC 3´	
rovSdel3:	5´ TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCTTGGTGATACTTCTTCAGG 3´	
rovSdel4:	5´ CCGCGGATCCAAAGAAGATACTTCCCTCG 3´	*Bam*HI

Primer zur Herstellung einer *rogB2*-Deletionsmutante

rogB2del1:	5´ CCGTGGATCCTGCTCTCCCTTTAATCGC 3´	*Bam*HI
rogB2del2:	5´ CCCAACAGGATAACATAAACAGGTATCTAAGGATAGTGAGG 3´	
rogB2del3:	5´ TGTTTATGTTATCCTGTTGGGTACACCCTCTCAAATCAG 3´	
rogB2del4:	5´ TGGCACAAGCTTTATGGATGAAACCGCTCG 3´	*Hin*dIII

Primer zur Herstellung einer *hsh*-Deletionsmutante

hshdel1:	5´ GAGCGGGGTACCCTCGCAGACGATAGACAGAAG 3´	*Kpn*I
hshdel2:	5´ CCCATCCACTATACTTATACACTTTAACCCCTCATTTTCC 3´	
hshdel3:	5´ TGTATAAGTATAGTGGATGGGCAATTGAGGAACGTGTTCAG 3´	
hshdel4:	5´ CCGCGGATCCGCATTCGCATCTGAGTCAC 3´	*Bam*HI

Primer zur Prüfung von *rovS*-Deletionsmutanten

rovS-1: 5´ GCTGTTGATAGGGCATCTAC 3´

rovS-2: 5´ TGTGTCAGCAGTTGGCTCAG 3´

Primer zur Prüfung von *rogB2*-Deletionsmutanten

rogB2-1: 5´ CCATCTCCGAACTCAAAGTC 3´

rogB2-2: 5´ GTTTCCGTTTACCATCTGC 3´

Primer zur Prüfung von *hsh*-Deletionsmutanten

hsh-K1: 5´ TGCGATATTCGTCACCTAC 3´

hsh-K2: 5´ ACTCGTAGAAGCACTTTCTG 3´

Primer zur Herstellung DIG-markierter Sonden

rovS-SB1: 5´ GCTTGACCAGTTACATACC 3´

rovS-SB2: 5´ TGATGCAAAGGCATCACAGC 3´

rogB2-SB1: 5´ CATCTCGGATTTGTGCAGC 3´

rogB2-SB2: 5´ CGTACAGAGATTATTCGTG 3´

hsh-SB1: 5´ GCTGCACAAATCCGAGATG 3´

hsh-SB2: 5´ CTTCTTGCTCTGTGCTCACC 3´

Primer für Komplementationsversuche

rovSdel1:	5´ GAGCGGGGTACCGTTGAGTGAATGAGTTGAC 3´	*Kpn*I
rovSdel4:	5´ CCGCGGATCCAAAGAAGATACTTCCCTCG 3´	*Bam*HI
rogB2del1:	5´ CCGTGGATCCTGCTCTCCCTTTAATCGC 3´	*Bam*HI
rogB2-K2:	5´ AAAACTGCAGTATGGATGAAACCGCTCG 3´	*Pst*I
hsh-komp1:	5´ GAGCAGGGTACCGGAAAATGAGGGGTTAAAG 3´	*Kpn*I
hsh-komp2:	5´ CCGCGGATCCGATATGCCTTTTACCATGTC 3´	*Bam*HI

Primer zur Herstellung eines RovS-Fusionsproteins in *E.coli*

RovS-N1:	5´ CATGCCATGGAAAAAGAATTAGGAAAAACACTAAGAAG 3´	*Nco*I
RovS-C1:	5´ CCGCTCGAGGCATTCTTTATTATTGCCAAGTACTTTTTG 3´	*Xho*I

Primer zur Herstellung von Hsh-Fusionsproteinen in *E.coli*

Hsh-N:	5’ GTGCTTTGCCATGGTTGGCAAGCAGTTAACAG 3’	*Nco*I
Hsh-C:	5´ CCGCGGATCCTCTGATAAAAGTTTAATTTCGGC 3´	*Bam*HI
Hsh-N_halb_v_C1:	5´ CCGCTCGAGCTGCAACTCGCTTGATAC 3´	*Xho*I
Hsh-N_halb_h_N1:	5´ CATGCCATGGGTATCAAGCGAGTTGCAG 3´	*Nco*I
Hsh-N_halb_h_C1:	5´ CCGCTCGAGTGATAAAAGTTTAATTTCGGCATTCG 3´	*Xho*I
Hsh-N_halb_hv_C1:	5´ CCGCTCGAGCCGAGATCTTACATTTGTCTTAAC 3´	*Xho*I
Hsh-N_halb_hh_N1:	5´ CATGCCATGGTCATGAAGCTTGATGATGAAAGAC 3´	*Nco*I

Primer zur Herstellung von Krt4-Fusionsproteinen in *E.coli*

Krt4-N1:	5´ CCGCGGATCCATGATTGCCAGACAGCAGTG 3´	*Bam*HI
Krt4-C1:	5´ TGGCACAAGCTTCTATCGTCTCTTGTTCAG 3´	*Hin*dIII
Krt4-NC1:	5´ TGGCACAAGCTTCTAAAGACTGTCCACCTTGGC 3´	*Bam*HI
Krt4-CN1:	5´ CCGCGGATCCATGAATGACGAGATCAACTTCC 3´	*Hin*dIII

Primer zur Untersuchung der Verbreitung des *hsh*-Gens

Hsh-N:	5’ TTGGCAAGCAGTTAACAG 3’
Hsh-C:	5´ TCTGATAAAAGTTTAATTTCGGC 3´
HshCterm-N1:	5´ AAGTGCTTCTACGAGTGCGTC 3´
HshCterm-C1:	5´ GTCTTTATCTTTTTTAGATTTTTTTCGTCC 3´

Primer zur Untersuchung der Verbreitung des *rovS*-Gens

RovS-N1:	5´ AAAAAGAATTAGGAAAAACACTAAGAAG 3´
RovS-C1:	5´ GCATTCTTTATTATTGCCAAGTACTTTTTG 3´

Primer für die quantitative real-time-PCR im Lightcycler

Camp1:	5´ TGAGGCTATTACTAGCGTGG 3´
Camp2:	5´ AAGTCGACAGCATCACACG 3´
Scp1:	5´ AACAGTAGCAGATGACGC 3´
Scp2:	5´ AGCTAGTGCAGCATTACC 3´
Hyl1:	5´ CCTATTATCCAACGTACCG 3´
Hyl2:	5´ GAACCTGTAACTGATAACGG 3´
Sod1:	5´ CATCATGATAAGCACCATGC 3´
Sod2:	5´ TGGAGTATCTTGATTGGCCAG 3´

CpsA1: 5´ GGTGATAGTCAAGCTATGG 3´
CpsA2: 5´ TCTATCGTTATCGCCTCC 3´
Lmb1: 5´ ATGGAAGTCACACAAGGC 3´
Lmb2: 5´ ATAGCAGCAACTGAGCCG 3´
GyrA5: 5´ GACGTTCAGGTATTCCAC 3´
GyrA6: 5´ TCAAACTGAGGTACGACG 3´
Rgg1-LC1: 5´ AAGAGACGTAGCTGGGTTAG 3´
Rgg1-LC2: 5´ TCCTCGACTATCCCCTTTAG 3´
RovS-LC1: 5´ TGAGCACCTATCCAAGTCAC 3´
RovS-LC2: 5´ GAGTGATCAATGCTGATC 3´
RogB2-LC1: 5´ TACGATCTGTCTGCTCTAG 3´
RogB2-LC2: 5´ CAGGATAGAATGTTGAAGG 3´
CylE-LC1: 5´ GAGGAGACAGAAATTAGGAC 3´
CylE-LC2: 5´ TCTTGTCCAAAGGTTGGC 3´
Gbs1263-for: 5´ CTCCTATCGTACTATCCTTCC 3´
Gbs1263-rev: 5´ GATAGGTAGTTAGAAGCTCTC 3´
Gbs1919-for: 5´ CGAAAGCAGTCATTCCATTG 3´
Gbs1919-rev: 5´ TAGCAGAAAGTATGCACC 3´
Gbs0850-for: 5´ GCTTCTGTAGGCTTCAGG 3´
Gbs0850-rev: 5´ CCGTATTGAATCTTAGTTCCTC 3´
Hsh-N: 5’ GTGCTTTGCCATGGTTGGCAAGCAGTTAACAG 3’
Hsh-LC2: 5´ ACACTTTCTGAGGCTGACG 3´
FbsAluc1: 5´ CCGCGGATCCGTAGGTCAACTTATAGG 3´
FbsAluc2: 5´ CCGCGGATCCATTATACTTAATTTTCATTGCG 3´
Rogluc3: 5´ CCATCGATGCAGTTGCACAAGATAGTC 3´
Rogluc4: 5´ GCAGCGGATCCTTTGAGAGAGAGTTTACTG 3´
Samluc3: 5´ GAGCGGGGTACCTTCGGCACAATAGGAGTTG 3´
Samluc4: 5´ GCAGCGGATCCCTTAACTTGCCAAGTCTGG 3´
SapC_pSI1b: 5´ GCAGCGGATCCGACACTGCTATCAAGGCG 3´
SapC_pS2: 5´ CCGCGGATCCGTTCAATGGGTATAATCTC 3´
LCsapB2for: 5´ GCTTATGCTGTACCGTTTGTG 3´
LCsapB2rev: 5´ GCCGCATCATCTGTATTTGCAG 3´
CylA-LC1: 5´ CTTGGACCTAATGGAGCTG 3´
CylA-LC2: 5´ CTGTCATCTGCGATTGTTG 3´

CylK-LC1: 5´ AGGCAGTCTACATTGGAG 3´

CylK-LC2: 5´ GCATAACCATAAATATAGCC 3´

Primer zur Herstellung von Bandshift-Sonden

Sod-BS1: 5´ GTGGCTCAAGCGCATCATAT 3´

Sod-BS2: 5´ GTCTTACTTGGCAGGATAG 3´

Rgg1-BS1: 5´ GTAAAGGCACAGGTAGAT 3´

Rgg1-BS2: 5´ CACCCCTCTCAAATCGTGAT 3´

CylX-BS1: 5´ TATGAGAGTGCGGGTTCTTG 3´

CylX-BS2: 5´ TGAACATTACCCGTGCCTCC 3´

FbsA-rep1: 5´ AACTATTGCTCCCCTGC 3´

FbsA-rep3: 5´ TTGAATATGCTACCATCAC 3´

FbsA-rep4: 5´ TTTCCTGATTTCCAAGTTC 3´

FbsA-rep5: 5´ GCAACTAAATAATAAATTATCTTGAC 3´

FbsA-rev5: 5´ GTCAAGATAATTTATTATTTAGTTGC 3´

FbsA-rep6: 5’ CCGGAATTCTTTATAATATTAAAGG 3’

FbsA-BS-1a: 5´ AAATATACTATTACCTCATTGTAAATC 3´

FbsA-BS-1b: 5´ TAAATAGTTGATATCTAAAACATG 3´

FbsA-BS-2a: 5´ ATTTTAAACATACAAATTAATAATAAATTGC 3´

FbsA-BS-2b: 5´ CATTTTATTATTACTTTTATTTAG 3´

FbsA-BS-3b: 5´ GATATTTTTAAATTTTCCTTTAATA 3´

FbsA-BS-4a: 5´ TGTTTTAGATATCAACTATTTAAT 3´

FbsA-BS-5a: 5´ AAATTTAAAAATATCATGTTTTAGATATC 3´

FbsA-BS-6b: 5´ TCCTTTAATATTATAAAGCATGATAG 3´

RogB-lac1: 5´ GCAGCGGATCCAACCAGTTGATGACATG 3´

RogB-lac2: 5´ GCAGCGGATCCTTTTACAACTCCTATTGTGC 3´

Oligonukleotide als Bandshift-Sonden

FbsA-oligo1a: 5´ ATAATATTAAAGGAAAATTTAAAAATAT 3´

FbsA-oligo1b: 5´ ATATTTTTAAATTTTCCTTTAATATTAT 3´

FbsA-oligo-mut1a: 5´ ATAATATTAAAGGAAAATATTAAAATCT 3´

FbsA-oligo-mut1b: 5´ AGATTTTAATATTTTCCTTTAATATTAT 3´

FbsA-oligo-mut2a: 5´ ATAATATCAAAGGAAAATCTCAAAATCT 3´

FbsA-oligo-mut2b: 5´ AGATTTTGAGATTTTCCTTTGATATTAT 3´

FbsA-oligo-mut3a: 5´ ATAATATCAAATCATGTTCTACAAATCT 3´
FbsA-oligo-mut3b: 5´ AGATTTGTAGAACATGATTTGATATTAT 3´
FbsA-oligo-mut4a: 5´ AGAACAGTAGAGGAAAATCTACAGATCT 3´
FbsA-oligo-mut4b: 5´ AGATCTGTAGATTTTCCTCTACTGTTCT 3´
FbsA-oligo-mut5a: 5´ CTGCTATGACAGGAAAA TTTAAAAATAT 3´
FbsA-oligo-mut5b: 5´ ATATTTTTAAATTTTCCTGTCATAGCAG 3´
FbsA-oligo-mut6a: 5´ ATAATATTAAAGGAAAATCTAACAATGT 3´
FbsA-oligo-mut6b: 5´ ACATTGTTAGATTTTCCTTTAATATTAT 3´
FbsA-oligo-mut7a: 5´ CTGCTATGACAGGAAAATCTAACAATGT 3´
FbsA-oligo-mut7b: 5´ ACATTGTTAGATTTTCCTGTCATAGCAG 3´

1.4. Antikörper

Für Western-Blot-Experimente wurden folgende Antikörper in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt:

Monoklonale Anti-HisTag-Immunglobuline aus Maus	(1:250)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Anti-Hsh-Serum aus Maus	(1:250)	Diplomarbeit Stefanie Ripka / diese Arbeit
Anti-Maus-Fab-Fragmente aus Esel, Meerettich-Peroxidase-gekoppelt	(1:10000)	Dianova GmbH; Hamburg
Monoklonale Anti-Cytokeratin Peptid 4 Immunglobuline aus Maus	(1:300)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Anti-FbsA-Antikörper mAb5H2	(1:250)	Pietrocola *et al,* 2004
Anti-Maus IgG (whole molecule) TRITC Konjugat	(1:200)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Anti-Fibrinogen-Antikörper	(1:1000)	Dako Cytomation; Glostrup, Denmark

Anti-Kaninchen-Antikörper	(1:1000)	Dako Cytomation; Glostrup, Denmark

2. Plasmide

Tabelle 1: **Plasmide**

Bezeichnung	Größe [Bp]	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
pG$^+$host6	6722	*ori* pBR 322, *ori* pWV01 ts, Em^R, Amp^R	Maguin *et al*, 1992; Appligene
pGΔ*rovS*	7750	Derivat von pG$^+$host6; enthält flankierende Bereiche zu *rovS*	diese Arbeit
pGΔ*hsh*	7779	Derivat von pG$^+$host6; enthält flankierende Bereiche zum 5´-Ende von *hsh*	diese Arbeit
pGΔ*rogB2*	7858	Derivat von pG$^+$host6; enthält flankierende Bereiche zu *rogB2*	diese Arbeit
pET28a	5369	*ori* pBR 322, f1 ori, Kan^R, *lacI*, T7 Promotor	Novagen
pET-RovS	6207	pET28 mit *rovS*-Strukturgen zur Herstellung des RovS-Fusionsproteins	diese Arbeit
pET-Hsh-N	7193	pET28 mit dem Bereich 1-1918 Bp des *hsh*-Strukturgens zur Herstellung des Hsh-N-Fusionsproteins	Diplomarbeit Stefanie Ripka
pET-Hsh-N1	6206	pET28 mit dem Bereich 1-981 Bp des *hsh*-Strukturgens zur Herstellung des Hsh-N1-Fusionsproteins	diese Arbeit

pET-Hsh-N2	6204	pET28 mit dem Bereich 964-1926 Bp des *hsh*-Strukturgens zur Herstellung des Hsh-N2-Fusionsproteins	diese Arbeit
pET-Hsh-N2N	5733	pET28 mit dem Bereich 964-1328 des *hsh*-Strukturgens zur Herstellung des Hsh-N2N-Fusionsproteins	diese Arbeit
pET-Hsh-N2C	5754	pET28 mit dem Bereich 1329-1926 des *hsh*-Strukturgens zur Herstellung des Hsh-N2C-Fusionsproteins	diese Arbeit
pTCV-*lac*	12000	*oriT* RK2, *oriR* pACYC184 *oriR* pAMß1, Em^R, $Kan^{R,}$ *lacZ*	Poyart *et al,* 1997
pTCV-*lac-fbsA*-r1	12750	Derivat von pTCV-*lac*; trägt 750 Bp des *fbsA*-Promotor-Bereichs vor dem promotorlosen *lacZ*-Gen	Doktorarbeit Axel Schubert
pTCV-*lac-fbsA*-r3	12350	Derivat von pTCV-*lac*; trägt 350 Bp des *fbsA*-Promotor-Bereichs vor dem promotorlosen *lacZ*-Gen	Doktorarbeit Axel Schubert
pTCV-*lac-fbsA*-r5	12150	Derivat von pTCV-*lac*; trägt 150 Bp des *fbsA*-Promotor-Bereichs vor dem promotorlosen *lacZ*-Gen	Doktorarbeit Axel Schubert
pAT 18/19	6600	*oriR* pUC, *oriR* pAMβ1, *oriT* RK2, *lacZα*, Em^R MCS(pUC19), Tra^-, Mob^+	Trieu-Cuot *et al*, 1991
pAT-*rovS*	7450	pAT19 mit *rovS*-Strukturgen und *rovS*-Promotorbereich	diese Arbeit

pAT-*hsh*	10846	pAT19 mit *hsh*-Strukturgen und *hsh*-Promotorbereich	diese Arbeit
pOTB7	1815	*oriR* pUC, Cm^R, T7, Sp6	RZPD, Berlin
pOTB7-Krt4	3973	pOTB7 mit humanem *krt4*-Strukturgen	RZPD, Berlin
pET-Krt4	6926	pET28 mit dem Bereich 1-1605 Bp des humanen *krt4*-Strukturgens zur Herstellung des Krt4-Fusionsproteins	diese Arbeit
pET-Krt4-N	6191	pET28 mit dem Bereich 1-837 Bp des humanen *krt4*-Strukturgens zur Herstellung des Krt4-N-Fusionsproteins	diese Arbeit
pET-Krt4-C	6122	pET28 mit dem Bereich 838-1605 Bp des humanen *krt4*-Strukturgens zur Herstellung des Krt4-C-Fusionsproteins	diese Arbeit

3. Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Tabelle 2: Bakterienstämme und eukaryotische Zellen

E. coli – Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
E. coli DH5α	*rec*A1, *end*A1, *hsd*R17(r^-,m^+), *sup*E44, *rel*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *deo*R, F^-, λ^-, ϕ80d*lac*ZΔM15, Δ(*lac*ZYA-*arg*F), U169, *pho*A	Woodcock *et al*, 1989
E. coli BL21	*E. coli* B, F-, *dcm*, *omp*T, *hsdS* (r_B-m_B-), *gal*	Stratagene
E. coli ER2566	F-, λ-, *fhuA2[Ion]omp*T, *lacZ::T7*, *geneI gal sulA11* Δ*(mcrC-mrr) 114::IS10*, *R(mcr73::mini*Tn*10)2*, *R(zgb-210::*Tn*10)1*, (Tet^s), *EndA1 [dcm]*	New England BioLabs
E.coli BL21 Star	F-, *omp*T, *hsdSB* (r_B-m_B-), *gal*, *dcm*, *rne131*	Invitrogen GmbH

S. agalactiae-Stämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
***S. agalactiae* 6313**	klinisches Isolat eines Neugeborenen	Valentin-Weigand und Chhatwal,1995
***S. agalactiae* NEM316**	klinisches Isolat einer tödlichen Sepsis	ATCC 12403

S. agalactiae* 6313 Δ*rovS	*rovS*-Deletionsmutante von *S. agalactiae* 6313	diese Arbeit
S. agalactiae* NEM316 Δ*rogB2	*rogB2*-Deletionsmutante von *S. agalactiae* NEM316	Diplomarbeit Anja Eichner
S. agalactiae* 6313 Δ*hsh	*hsh*-Deletionsmutante von *S. agalactiae* 6313	diese Arbeit

Zelllinien

Zellart	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
A549	menschliche Lungenepithelzelllinie	ATCC CCL-185
HEp2	menschliche Rachenepithelzelllinie	ATCC CCL-23

4. Stammhaltung, Kultivierungsbedingungen und Nährmedien

4.1. Kultivierung von *E. coli*

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme wurden sowohl in 2 x TY - Komplexmedium, als auch in LB-(Luria-Bertani-) Komplexmedium (Sambrook *et al*, 1989) kultiviert. Diese Medien wurden wie folgt hergestellt:

2 x TY – Medium		**LB – Medium**	
Trypton	16 g/l	Trypton	10 g/l
NaCl	5 g/l	NaCl	10 g/l
Hefeextrakt	10 g/l	Hefeextrakt	5 g/l

Die fertigen Medien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem jeweiligen Medium vor dem Autoklavieren 16 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme, wurden dem autoklavierten Medium nach Abkühlung auf etwa 60 °C bei Agar bzw. RT bei Flüssigmedium, sterilfiltrierte Antibiotika-Stammlösungen zugesetzt. Die Antibiotikakonzentrationen zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme waren wie folgt:

Ampicillin	100 µg/ml	
Erythromycin	250 µg/ml	(Stammlösung in Ethanol)
Kanamycin	50 µg/ml	
Chloramphenicol	20 µg/ml	(Stammlösung in Ethanol)

Für ein Blau-Weiß-Screening wurde neben dem entsprechenden Antibiotikum 0,1 mM IPTG sowie 0,002 % (w/v) X-Gal (gelöst in DMF) dem Medium zugegeben.

In Flüssigkulturen erfolgte die Inkubation bei 37 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 130 rpm, Agarplatten wurden im Brutschrank bei 37 °C bebrütet. Für Mini-Plasmidpräparationen wurden die Kulturen in einem Volumen von 5 ml Flüssigmedium in Reagenzgläsern kultiviert. Für Midi-Plasmidpräparationen wurden 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen und ein Volumen von 70 ml 2 x TY-Medium zur Anzucht der Bakterien verwendet. Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurden die Bakterien in 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen und 250 ml LB-Medium herangezogen.

Auf Agarplatten wurde *E. coli* bis zu 4 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Flüssigkulturen mit 30 % Glycerin versetzt und diese bei –70 °C gelagert.

4.2. Kultivierung von *S. agalactiae*

S. agalactiae-Stämme wurden in THY (Todd-Hewitt Broth (Fertigmischung von Oxoid) mit zugesetztem Hefeextrakt)-Komplexmedium oder auf Blutagar herangezogen. Die Medien wurden wie folgt hergestellt:

THY-Medium		**Blutagar**	
Todd-Hewitt Broth	36,4 g/l	Columbia Agar Base (Oxoid)	39 g/l
Hefeextrakt	10 g/l	Schafsblut (defibriniert)	50 ml/l

Für die Herstellung von Agarplatten, mit Ausnahme der Blutagarplatten, wurde dem Medium 16 g/l Agar zugesetzt. Das Medium wurde für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

Falls nötig, wurden dem jeweiligen Medium zur Selektion rekombinanter Streptokokken Antibiotika in folgenden Konzentrationen steril zugegeben:

Erythromycin (Stammlösung in Ethanol)	5 µg/ml
Kanamycin	2 mg/ml

S. agalactiae 6313 wurde als Wildtyp bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung von Deletionsmutanten wurden rekombinante *S. agalactiae*-Stämme bei 30 °C bzw. 39 °C inkubiert. In Flüssigmedium erfolgte die Inkubation unter leichtem Schütteln im Inkubator oder im Wasserbad. Die Kultivierung der Streptokokken auf Agarplatten erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Die Agarplatten wurden 2 Wochen bei 4 °C gelagert. Zur Stammhaltung wurden aus Flüssigkulturen Glycerinkulturen angelegt (50 % (v/v) Glycerin) und diese bei –70 °C aufbewahrt.

4.3. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die Kultivierung der eukaryotischen A549-Zellen wurde folgendes Medium und folgender Puffer verwendet:

RPMI + 10 % (v/v) FCS		**10 x PBS**	
RPMI	500 ml	KCl	2 g/l
L-Glutamat (200 mM)	5 ml	KH_2PO_4	2 g/l
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml	NaCl	80 g/l

Non Essential Aminoacids (NEAA)	5 ml	Na_2HPO_4 x 7 H_2O	21,6 g/l
FCS (fetal calf serum)	50 ml	ad 1 l mit A. bidest	

HEp2-Zellen wurden in ´Minimum-Essential-Medium` (MEM) unter Zugabe von 10 % FCS kultiviert. Das Medium wurde folgendermaßen hergestellt:

MEM + 10 % (v/v) FCS

Minimum-Essential-Medium	500 ml
L-Glutamat (200 mM)	5 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
Non Essential Aminoacids (NEAA)	5 ml
FCS	50 ml

Die Herstellung des jeweiligen Mediums erfolgte immer unter der Sterilbank. Alle Komponenten wurden vor Zugabe zum Medium sterilfiltriert. Zur Inaktivierung des Komplementsystems wurde das FCS vor Zugabe zum Medium für 30 min bei 56 °C inkubiert. Die Lagerung des fertigen Mediums erfolgte bei 4 °C, wobei das Medium nicht länger als 4 Wochen verwendet wurde. Vor der Zugabe des Mediums oder des PBS zu den eukaryotischen Zellen wurden beide Komponenten im Brutschrank bei 37 °C vorgewärmt.

Der 10-fach konzentrierte PBS-Puffer wurde vor der Verwendung 1:10 verdünnt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

Die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zellen teilen sich etwa einmal in 24 h. Nach etwa 3-4 Tagen sind die Zellen konfluent in der Kulturflasche gewachsen und müssen erneut verdünnt werden. Das Umsetzten der Zellen in eine neue Kulturflasche erfolgte dabei immer unter der Sterilbank. Zuerst wurde das Medium von den Zellen vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, die Zellen mit 10 ml 1 x PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,53 mM) und fünfminütiger Inkubation bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden in insgesamt 20 ml Zellkulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 37 °C und 1200 rpm zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 8-10 ml Zellkulturmedium aufgenommen, 1 ml dieser Zellsuspension mit 29 ml Zellkulturmedium in eine neue Zellkulturflasche überführt und diese wiederum für 3 Tage inkubiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dabei im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2.

5. Isolierung von DNA

5.1. Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Präparation genomischer DNA aus *S. agalactiae* wurde erstmalig von Pospiech und Neumann im Jahre 1995 beschrieben. Die Durchführung dieser Methode und die dazu notwendigen Pufferlösungen sind im Folgenden aufgeführt:

TES-Puffer		**TE-Puffer**	
Tris – Base	50 mM	Tris – Base	10 mM
EDTA	5 mM	EDTA	1 mM
NaCl	10 mM	pH 7,6	
pH 8,15			

50 ml einer ÜN-Kultur von *S. agalactiae* wurde bei RT für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 10 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei RT für 10 min bei 5000 rpm wurde das Pellet in 1 ml TES-Puffer aufgenommen. Zum Verdau der bakteriellen Zellwand erfolgte die Zugabe von 1 ml Lysozym (5 mg/ml in TES) und 100 µl Mutanolysin (1 mg/ml in TES) und eine Inkubation des Ansatzes bei 37 °C im Heizblock für 2 h. Zur Lyse der Zellen und zum Ausfällen von Proteinen wurde anschließend 220 µl 10 % (w/v) SDS und 150 µl Proteinase K (20 mg/ml) dem Ansatz zugegeben und dieser für weitere 2-3 h bei 56 °C im Heizblock inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml gesättigter NaCl-Lösung (6 M) und langsamen Schütteln wurden Proteine gefällt und diese zusammen mit weiteren Zellwandbestandteilen bei RT für 15 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und weitere Proteine durch eine zweimalige Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion aus dem Ansatz entfernt. Durch die Zugabe von 2,5 Volumen absolutem Ethanol wurde die chromosomale DNA ausgefällt und konnte mit Hilfe einer Pasteurpipette aus dem Überstand entnommen werden. Die DNA wurde an der Pasteurpipette mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, nach leichtem Trocknen in 1 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6 aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die gelöste chromosomale DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Diese Methode läßt sich auch mit einer 5 ml ÜN-Kultur durchführen. Dazu werden alle Volumina entsprechend verringert und die chromosomale DNA wird nach der Ethanolfällung durch Zentrifugation sedimentiert.

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

Das angewendete Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse wurde erstmals von Birnboim und Doly im Jahr 1983 beschrieben. Im Folgenden sind die dafür notwendigen Lösungen aufgeführt:

Sol A		**Sol B** (frisch ansetzen)		**Sol C**	
Glucose	50 mM	NaOH	0,2 N	Kaliumacetat	3 M
Tris/HCl	25 mM	SDS	1 %	Eisessig	11,5 %
EDTA	10 mM			pH 5,2	
pH 8,0					

Mini-Plasmidpräparation

1,5 ml einer in 5 ml 2 x TY gewachsenen Flüssigkultur wurden 2 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde vollständig in 100 µl Sol A resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µl Sol B zugegeben, der Ansatz zweimal kurz geschüttelt und für 5 min auf Eis inkubiert. Dabei werden Proteine und DNA denaturiert und fallen aus. Durch Zugabe von 150 µl Sol C, leichtem Schütteln und anschließender Inkubation auf Eis für 5 min geht DNA wieder in Lösung, wobei sich dieser Prozess bei kleineren Molekülen schneller vollzieht und somit chromosomale DNA zunächst denaturiert bleibt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm und RT wurde der klare, Plasmid-DNA-enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wurde restliches Protein aus dem Ansatz entfernt. Zum Ausfällen der DNA wurde der Ansatz mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und nach zweiminütiger Inkubation bei RT für 10 min, 13000 rpm und RT abzentrifugiert. Zum Entfernen restlichen Salzes wurde das DNA-haltige Pellet mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen, anschließend getrocknet, in 40 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,6 aufgenommen und bei –20 °C gelagert.

Die Mini-Plasmidpräparation wurde in dieser Arbeit vor allem zur Kontrolle rekombinanter *E. coli*-Klone nach einer Transformation verwendet. Sowohl Menge als auch Reinheit der gewonnenen DNA sind ausreichend für einen anschließenden Restriktionsverdau und auch für weitere Transformationen.

Midi-Plasmidpräparation

Bei der Midi-Plasmidpräparation handelt es sich um eine leicht modifizierte Methode der alkalischen Lyse nach Sambrook *et al* (1989). Dabei werden Plasmide aus einem größeren Volumen isoliert und die gewonnene Plasmid-DNA liegt in großer Reinheit und Menge vor. Derart gewonnene Plasmid-DNA wurde vor allem für präparative Restriktionsverdaus und anschließende Ligationen verwendet.

Für Midi-Plasmidpräparationen wurden die Zellen in 2 x TY-Medium kultiviert, da *E. coli* in diesem Medium zu einer höheren optischen Dichte heranwächst als in LB-Medium und somit eine größere Ausbeute an Plasmid-DNA erzielt werden kann. Die Suspension einer 70 ml ÜN-Kultur wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt und für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml Sol A resuspendiert. Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von Lysozym wird eine effiziente Lyse der Zellwand und somit eine große Ausbeute an DNA erzielt. Anschließend wurden 10 ml Sol B zugegeben und der Ansatz nach kurzem Schütteln erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 7,5 ml Sol C, kurzem Mischen und erneuter Inkubation für 10 min auf Eis, wurde der Ansatz für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und somit Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde zur Abtrennung von Zellbestandteilen, die durch die Zentrifugation nicht sedimentiert werden konnten, durch eine Mullbinde in ein neues, 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend durch die Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und einer Inkubation für 2 min bei RT. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C, wurde das Plasmid-haltige Pellet getrocknet und in 2 ml A. bidest resuspendiert. Zum Ausfällen von RNA wurden 2 ml 5 M LiCl in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 zugegeben und der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 5000 rpm sedimentiert, und die DNA im Überstand mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol für 2 h bzw. ÜN bei –20 °C gefällt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 5000 rpm und 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde in 400 µl TE-Puffer pH 7,6 resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte zum Abbau weiterer RNA eine RNase-Behandlung für 30 min bei 37 °C durch Zugabe von 3 µl RNase A (10 mg/ml). Um weitere Proteine zu entfernen, wurde eine zweimalige Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt. Darauf folgte eine zweimalige Chloroform-Isoamylalkohol-Behandlung, um restliches Phenol zu entfernen. Zur Aussalzung und Ankonzentrierung der Plasmid-DNA wurde der Ansatz mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat

pH 5,2 und 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und die DNA bei –20 °C gefällt. Die Plasmid-DNA wurde für 30 min bei 4 °C und 13000 rpm sedimentiert und anschließend mit einem Volumen 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das DNA-haltige Pellet wurde in einem Heizblock bei 37 °C getrocknet und in 100 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,6 gelöst. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei –20 °C.

Aufreinigung von Plasmid-DNA mit dem GFX^{TM}Micro Plasmid Prep Kit

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für anschließende Sequenzierungen, wurden die Plasmide mit Hilfe des GfX-Kits aus *E. coli* präpariert, da auf diese Weise sehr reine DNA isoliert werden kann. Hierzu wurden zunächst 3 ml *E. coli* ÜN-Kultur für 2 min bei RT und 8000 rpm abzentrifugiert und der Überstand komplett entfernt. Anschließend wurde das Pellet in 300 µl Lösung 1 aufgenommen und zur vollständigen Resuspension der Zellen stark gevortext. Es erfolgte die Zugabe von 300 µl Lösung 2, wobei der Ansatz leicht geschwenkt wurde. Nach zweiminütiger Inkubation wurde dem Ansatz 600 µl Lösung 3 zugesetzt. Auch hierbei wurde der Ansatz mehrmals geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei RT und 13000 rpm. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine GFX-Säule geladen und für 1 min bei RT auf dieser inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 s bei RT und 13000 rpm. Der Durchfluß wurde verworfen und nach Zugabe von 400 µl Waschpuffer wurde erneut für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die GFX-Säule wurde auf ein neues Sammelgefäß gestellt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 100 µl A. bidest durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm von der Säule eluiert. Die Konzentration der so erhaltenen Plasmid-DNA wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer bestimmt, wobei eine OD_{260} von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Für Sequenzierungen wurden pro Ansatz 1 µg der DNA getrocknet und zu der Firma MWG Biotech geschickt.

6. Arbeiten mit RNA

In der Molekularbiologie existieren zahlreiche Methoden zur Analyse von RNA. Der Nachweis spezifischer Transkripte durch Northern-Blot-Analyse gelingt jedoch häufig bei schwach exprimierten Genen nicht. Die Anpassung der PCR – Technologie auf die Amplifikation von RNA erlaubt den Nachweis sehr geringer Transkriptmengen. Mit ihr läßt sich die Genexpression in Zellen untersuchen, die Menge bestimmter Transkripte quantifizieren, oder die transkriptionelle Organisation bestimmter Gene analysieren.

6.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Streptokokken

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Streptokokken wurde der RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. 500 µl einer ÜN-Kultur wurden in 50 ml frisches THY-Medium überimpft und schüttelnd bei 37 °C inkubiert, bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,3 erreicht wurde. Anschließend wurden die Kulturen in Ethanol bei –70 °C abgekühlt und für 5 min bei 3500 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml eiskaltem 10 mM Tris/HCl pH 7,6 resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 2 min bei 8000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,6 resuspendiert und zum Zellaufschluß in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in welchem bereits 250 mg Glasbeads enthalten waren. Zu diesem Ansatz wurden aus dem RNeasy Mini-Kit 700 µl RLT-Puffer pipettiert, wobei diesem Puffer zuvor Mercaptoethanol beigefügt wurde (1 ml RLT-Puffer + 10 µl Mercaptoethanol). Der Zellaufschluß erfolgte im Ribolyser (2 x 45 s bei höchster Stufe). Im Anschluß wurde dieser Ansatz 2 min bei 13000 rpm und RT abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 500 µl absoluter Ethanol zupipettiert. Das gesamte Volumen des Ansatzes wurde sukzessiv in 700 µl Portionen auf eine RNeasy – Säule geladen und jeweils für 15 s bei 10000 rpm und RT abzentrifugiert, wobei der Durchfluß verworfen wurde. Auf die Säule wurden 700 µl RW1 – Puffer pipettiert und dieser Ansatz erneut für 15 s bei 10000 rpm und RT abzentrifugiert, wobei der Durchfluß erneut verworfen wurde. Die RNeasy – Säule wurde auf ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt und 500 µl RPE – Puffer auf die Säule pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 15 s bei 10000 rpm und RT abzentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei der Ansatz diesmal für 2 min abzentrifugiert wurde. Nach kurzem Antrocknen der Membran wurde die RNeasy- Säule auf ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt, 50 µl Wasser (RNase frei) auf die Membran pipettiert und dieser Ansatz für 1 min bei 10000 rpm und RT abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Um etwaige DNA-Kontaminationen aus dem Ansatz zu entfernen, wurde der Ansatz einem DNase – Verdau unterzogen. Dazu wurden 20 µl 5 x DNase-Puffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM $MgCl_2$) und 5 µl DNase (10 U/µl; RNase frei) zum Ansatz pipettiert und dieser für 1 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit saurem Phenol (Roth) behandelt und die RNA mit 1/5 Volumen 5 M LiCl ÜN bei 4 °C gefällt. Die gefällte RNA wurde abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut in Wasser (RNase frei) gelöst. Die gelöste RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –70 °C gelagert.

6.2. Herstellung eines RNA-Agarosegels

Im Folgenden sind die für die Herstellung eines denaturierenden Agarosegels notwendigen Lösungen und der notwendige RNA-Probenpuffer aufgeführt:

5 x MOPS

MOPS 200 mM
Na-Acetat 50 mM
EDTA 10 mM
=> Mit autoklaviertem A. bidest. ansetzen
=> Mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
=> Fertige Lösung 30 min autoklavieren

RNA-Probenpuffer

75 µl Formamid
30 µl Formaldehyd
30 µl 5 x MOPS Puffer
20 µl Bromphenolblau (4 mg/ml)
1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Formamid / Formaldehyd

=> Mehrmalige Passage durch Faltenfilter und Ionenaustauscher bis ein pH > 6 vorliegt.

Zur Herstellung eines denaturierenden Agarosegels wurde folgender Ansatz hergestellt:

20 ml 5 x MOPS
63 ml A. bidest. (autoklaviert)
0,9 g Agarose
=> Aufkochen in der Mikrowelle
=> Nach Abkühlung Zugabe von 17 ml Formaldehyd
=> Gel sofort gießen und 1-2h unter dem Abzug ausdampfen lassen

Die RNA-Kammer wurde mit 0,1 % SDS gereinigt und das fertige Gel eingesetzt. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS in die Gelkammer gefüllt.

Die zu überprüfenden RNA-Proben wurden mit RNA-Probenpuffer versetzt, wobei 2 µl Puffer mit 4 µl RNA vermischt wurden. Die Ansätze wurden für 10 min bei 60 °C denaturiert, anschließend wurden die Proben auf das Gel geladen und bei 70 V – 90 V aufgetrennt. Da im Probenpuffer bereits Ethidiumbromid enthalten war, mußte das Gel nicht gefärbt werden, sondern wurde sofort fotografiert.

7. Sequenzierung von DNA

Von Sanger (1977) wurde die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sequenzier-Methode entwickelt, die auf einem Kettenabbruch-Prinzip beruht. Hierbei werden für die Synthese eines Komplementärstranges der DNA-Polymerase neben dNTP`s auch ddNTP`s (Didesoxynukleotide) angeboten, die am 3`-Ende keine OH-Gruppe besitzen, wodurch nach deren Einbau die DNA-Synthese nicht weitergeführt werden kann. Dadurch entstehen statistisch verteilte Unterbrechungen im Komplementärstrang und die verschieden langen DNA-Fragmente zeigen nach Größenseparation in einem Polyacrylamidgel ein unterschiedliches Laufverhalten. Durch den Einsatz von vier unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen der ddNTPs kann anschließend auf die Sequenz der DNA rückgeschlossen werden.

Für Sequenzierungen von Plasmiden wurde 1 µg gereinigte Plasmid-DNA, für Sequenzierung von PCR-Produkten wurden 20 ng pro 100 Bp des PCR-Produktes eingetrocknet. Die für die Sequenzierung benötigten Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl an die Firma MWG Biotech GmbH geschickt, welche die Sequenzierungen durchführte.

8. Aufreinigung von DNA

8.1. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde zur Abtrennung von Proteinen und somit zur Aufreinigung der DNA im Ansatz verwendet. Mit Hilfe einer Ethanolfällung wurde die im Ansatz enthaltene DNA anschließend ankonzentriert. Durch das Phenol werden Proteine denaturiert und inaktiviert. Die organische Phase dient gleichzeitig als Lösungsmittel für die denaturierten Proteine.

Die DNA-haltige wässrige Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, das Gemisch geschüttelt und zur Phasentrennung bei RT für 5 min und maximaler rpm zentrifugiert. In der oberen wäßrigen Phase befand sich die DNA, während die untere, organische Phase die Proteine enthielt. Die wäßrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und einer erneuten Phenolextraktion unterzogen. Um Phenolreste aus dem Ansatz zu entfernen, wurde die wäßrige Phase mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Nach erneutem Mischen und Zentrifugation bei RT und maximaler rpm, wurde die obere, wäßrige

Phase wieder vorsichtig abgenommen und einer erneuten Chloroform-Isoamylalkohol-Behandlung unterzogen.

Zum Aussalzen der DNA wurden dem Ansatz 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 beigefügt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen absolutem Ethanol wurde der DNA die Hydrathülle entzogen und die ausgefällte DNA konnte nach Inkubation bei –20 °C durch Zentrifugation sedimentiert werden. Das Pellet wurde anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen, im Heizblock bei 37 °C getrocknet und in A. bidest oder 10 mM Tris/HCl pH 7,6 resuspendiert. Mittels photometrischer Detektion oder durch einen Agarosegellauf wurde die DNA-Ausbeute bestimmt.

8.2. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Eine Möglichkeit, DNA aus einem Agarosegel zu isolieren, besteht in der Verwendung kommerziell erhältlicher Kits. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit der ‚Nucleo Spin® Extract 2 in 1'-Kit von Macherey und Nagel verwendet. Bei diesem Kit wird die DNA an eine aus Silikat bestehende Membran gebunden und anschließend mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration von der Membran eluiert. Die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte dabei gemäß Herstellerangaben.

Nach Färbung des Agarosegels mit Ethidiumbromid wurden die benötigten DNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Agarblöckchen wurden gewogen und pro 100 mg Agarose je 300 µl NT1-Puffer zugegeben. Durch Inkubation bei 50 °C unter gelegentlichem Schwenken wurde die Agarose geschmolzen. Die Probe wurde auf eine ‚Nucleo-Spin'-Säule pipettiert und 1 min bei 6000 rpm und RT zentrifugiert. Bei diesem Schritt wurde die DNA an die Membran gebunden. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer NT3 wurde die Säule zur Entfernung restlichen Ethanols für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 20 µl NE-Puffer und erneuter Zentrifugation von der Membran in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde dieser Schritt wiederholt.

Für Ligationen wurde das erhaltene Eluat mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und zur Entfernung von Phenolresten nochmals mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA-haltige Lösung wurde zur Ankonzentrierung einer Ethanolfällung unterzogen.

9. Agarosegelelektrophorese

Ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld ist die Agarosegelelektrophorese. Agarose, bestehend aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose, dient als interne Matrix, in der DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch verschiedene Faktoren, wie die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung beeinflußt. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Die bei der Agarosegelelektrophorese eingesetzte Agarosekonzentration ist abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Auftrennung der Fragmente erfolgen soll.

Benötigt werden die im Folgenden aufgeführten Pufferlösungen:

50 x TAE-Puffer		**Ladepuffer**
EDTA	50 mM	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
Tris/HCl	2 M	in 40 % (v/v) Glycerin
Natriumacetat	500 mM	
pH 8,0		

In der vorliegenden Arbeit wurden 0,8 %ige Agarosegele zur Auftrennung von Fragmenten > 600 Bp und 2 % Agarosegele zur Auftrennung von Fragmenten < 600 Bp hergestellt. Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Größenbestimmung, Mengenabschätzung und auch zur Auftrennung geschnittener chromosomaler DNA verwendet. Dazu wurde die Agarose in 1 x TAE-Puffer eingewogen und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wurde das Gel in die Gelgießvorrichtung gegossen. Das fertige Gel wurde in eine mit 1 x TAE-Puffer als Laufpuffer gefüllte Kammer gelegt. Die Proben wurde mit 1/5 Volumen Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde eine 1 kb-DNA-Leiter oder mit dem Restriktionsenzym *Bst*EII geschnittene λ-DNA mit auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 70 – 90 V. Anschließend wurde das Agarosegel für 5 - 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gefärbt und in Wasser entfärbt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe des angelagerten Ethidiumbromids unter UV-Licht (λ = 312 nm) sichtbar gemacht und mittels einer Fotodokumentationsanlage fotografiert.

10. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymeraskettenreaktion handelt es sich um eine der wichtigsten Methoden der Molekularbiologie zur Amplifikation kurzer Genomabschnitte. Sie wurde erstmals von Mullis *et al*. (1986) vorgestellt und seitdem von Saiki *et al.* (1988) durch die Einführung der hitzestabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* weiter optimiert. Voraussetzung für die Anwendung der PCR sind Sequenzkenntnisse über die flankierenden Bereiche des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes.

Man verwendet für dieses Verfahren synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer), die homolog zu den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden DNA sind. An diese Sequenzen lagern sich die Primer nach Denaturierung der DNA an, so daß kurze doppelsträngige DNA-Bereiche entstehen, von denen aus die *Taq*-Polymerase den dazwischenliegenden einzelsträngigen Bereich mittels freier Nukleotide zu einem Doppelstrang verlängern kann. Dabei entstehen an den Enden der PCR-Produkte Adenin-Überhänge.

Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung der DNA bei 94 °C, Anlagerung (Annealing) der Primer bei 50 °C – 60 °C und Verlängerung (Extension) der Primer bei 72 °C durch die *Taq*-Polymerase, ist es möglich, ein DNA-Fragment, welches in geringer Kopienzahl vorliegt, in großen Mengen zu amplifizieren und anschließend mittels Gelelektrophorese sichtbar zu machen. Im Allgemeinen ist darauf zu achten, daß die Annealing-Temperatur immer vom GC-Gehalt der Primer abhängig ist.

Im Folgenden ist ein Standard-PCR-Ansatz aufgeführt. Dabei wird zwischen der Verwendung einer bei Fermentas gekauften *Taq*-Polymerase und einer in der Arbeitsgruppe selbst hergestellten rekombinanten *Taq*-Polymerase unterschieden. Im Weiteren wurde für die Herstellung von Fusionsproteinen das jeweilige Strukturgen mit einer bei Finnzymes gekauften Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase amplifiziert. Neben einer 5´-3´-DNA-Polymerase Aktivität, besitzt dieses Enzym im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase auch eine 3´-5´-Exonuclease Aktivität. Somit liegt die Fehlerrate der Phusion Polymerase 50-mal niedriger als die der *Taq*-Polymerase.

PCR-Ansatz mit gekaufter *Taq*-Polymerase

5 µl 10 x *Taq*-Polymerase-Puffer

2,5 µl $MgCl_2$ (25 mM)

5 µl dNTP`s (je 2 mM)

2 µl Template-DNA (Plasmide, PCR-Produkte) bzw. 1 µl chr. DNA

1 µl Primer 1 (10 pmol)

1 µl Primer 2 (10 pmol)

1 µl *Taq*-Polymerase (1 U/µl)

⇨ ad 50 µl A. dest

PCR Ansatz der in der Arbeitsgruppe hergestellten rekombinanten *Taq*-Polymerase:

5 µl 10 x *Taq*-Polymerase-Puffer

4 µl $MgCl_2$ (25 mM)

5 µl dNTP`s (je 2 mM)

2 µl Template-DNA (Plasmide, PCR-Produkte) bzw. 1 µl chr. DNA

1 µl Primer 1 (10 pmol)

1 µl Primer 2 (10 pmol)

1 µl *Taq*-Polymerase

⇨ ad 50 µl A. dest

PCR Ansatz der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase

10 µl 5 x HF Puffer

1 µl dNTP´s (je 2mM)

1 µl $MgCl_2$ (50 mM)

1 µl Primer 1 (10 pmol)

1 µl Primer 2 (10 pmol)

1 µl chr. DNA

0, 3 µl Polymerase

⇨ ad 50 µl A. dest

Die Ansätze wurden gut gemischt, kurz abzentrifugiert und im programmierten Thermo-Cycler plaziert.

Im Folgenden ist ein Standard-PCR-Programm aufgeführt:

Vorabdenaturierung	:	94 °C	-	2 min 30 s	
Denaturierung	:	94 °C	-	30 s	} 32 x
Annealing	:	50 - 52 °C	-	30 s	
Extension	:	72 °C	-	60 s/1000 Bp	
Endextension	:	72 °C	-	4 min	

Im Folgenden ist das PCR-Programm für die Phusion Polymerase aufgeführt:

Vorabdenaturierung	:	95 °C	-	30 s	
Denaturierung	:	94 °C	-	10 s	} 32 x
Annealing	:	50 - 52 °C	-	30 s	
Extension	:	72 °C	-	30 s/1000 Bp	
Endextension	:	72 °C	-	4 min	

Nach beendeter PCR-Reaktion wurden als Kontrolle je 5 µl PCR-Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt.

10.1. Herstellung von cDNA mit random-hexamer-Primern

Zur Herstellung von cDNA wurde zunächst die Konzentration der RNA photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine OD_{260} von 1,0 entspricht hierbei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Für die cDNA-Synthese wurden 5 µg Gesamt-RNA und 1 µl random-hexamer-Primer (0,2 µg/µl) eingesetzt. Der Ansatz wurde auf 12 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt, vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 70 °C und danach eine kurze Inkubation des Ansatzes auf Eis, wobei folgende Komponenten zupipettiert wurden: 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 1 µl Ribonukleasepuffer (20 U/µl) und 2 µl dNTP-Mix (je 2 mM). Nach Mischen, einer kurzen Zentrifugation und Inkubation des Ansatzes für 5 min bei 25 °C, erfolgte die Zugabe der M-MULV Reversen Transkriptase (200 U/µl). Der Ansatz wurde zunächst für 10 min bei 25 °C und anschließend für 60 min bei 42 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde der Ansatz für 10 min auf 70 °C erwärmt und anschließend auf Eis abgekühlt. Das Volumen des cDNA-Ansatzes wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf

100 µl aufgefüllt und der Ansatz bei –20 °C gelagert. Je 2 µl der auf diese Weise hergestellten cDNA wurden für quantitative realtime PCR-Experimente mittels LightCycler bzw. für PCR-Analysen zur Bestimmung der transkriptionellen Organisation von *S. agalactiae*-Genen eingesetzt.

10.2. Quantitative realtime PCR im LightCycler

Zur Bestimmung von Transkriptmengen einzelner Gene wurden quantitative realtime PCR-Ansätze mittels LightCycler durchgeführt. Hierbei wird ausgenutzt, das sich bestimmte fluoreszierende Farbstoffe (hier: SYBR Green) in doppelsträngige Nukleinsäuren einlagern können. Im LightCycler wird dabei die Zunahme der Fluoreszenz im Verlauf der PCR-Reaktion gemessen, welche ein Maß für die gebildete doppelsträngige DNA ist. Die Fluoreszenzkurve zeigt dabei einen sigmoidalen Verlauf. Im Wendepunkt der Kurve wird die PCR-Reaktion als optimal angesehen, da hier keine limitierenden Faktoren wie z.B. dNTP-Mangel auftreten. Der Wendepunkt wird anschließend vom LightCycler-Gerät angegeben. Je größer die eingesetzte cDNA-Menge, d.h. je stärker das zu untersuchende Gen exprimiert wurde, desto früher wird der Wendepunkt erreicht.

Der Reaktionsansatz für einen LightCycler-Lauf bestand aus folgenden Komponenten:

- 5,8 µl A. dest
- 1,2 µl 25 mM $MgCl_2$
- 1 µl SYBR-Mix (lichtempfindlich)
- 0,5 µl Primer A (10 pmol/µl)
- 0,5 µl Primer B (10 pmol/µl)
- 2 µl cDNA

10 µl dieses Ansatzes wurden in vorgekühlte Kapillaren gegeben, in denen die PCR-Reaktion anschließend erfolgte. Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß die in dem SYBR-Mix enthaltene *Taq*-DNA-Polymerase oftmals nicht für eine Amplifikation ausreichte, wurde zusätzlich *Taq*-DNA-Polymerase in den Ansatz gegeben (5 µl *Taq*-DNA-Polymerase auf 32 LightCycler-Ansätze). In jedem cDNA-Ansatz wurde zudem mit den Primerpaaren gyrA5 und gyrA6 die Menge an *gyrA*-Transkript bestimmt. Da die Expression des *gyrA*-Gens in *S. agalactiae* als konstitutiv betrachtet wird, diente die Menge an *gyrA*-Transkript als interner Standard.

Nachfolgend ist das verwendete LightCycler-Programm dargestellt:

Denaturierung	: 94 °C	-	0 s	} 35 - 55 x
Annealing	: 52 °C	-	15 s	
Extension	: 72 °C	-	30 s	

Im Anschluß an dieses Programm wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, in der die PCR-Produkte schrittweise durch Erhöhung der Temperatur auf 95 °C aufgeschmolzen wurden. Die Temperatur, bei der das DNA-Amplifikat in Einzelstränge aufgetrennt wird und dies zum Verlust des Fluoreszenz-Farbstoffes führt, ist charakteristisch für jedes PCR-Produkt.

10.3. Erstellen einer Kalibriergeraden

Zur Berechnung der Transkriptmenge jedes untersuchten Genes in den verwendeten *S. agalactiae*-Stämmen, wurde eine Kalibriergerade unter Verwendung chromosomaler DNA aus *S. agalactiae* 6313 und *gyrA*-spezifischen Primern erstellt. Dazu wurden definierte DNA-Molekülmengen als Matrize in eine realtime PCR eingesetzt und anschliessend die dafür erhaltenen Wendepunkte gegen die Molekülanzahl aufgetragen. Aus der daraus entstandenen Kalibriergeraden und deren Geradengleichung war es möglich, von den gen- und stammspezifischen Wendepunkten aus den jeweiligen LightCyclerläufen, auf die entsprechende Transkriptmenge des einzelnen Gens Rückschlüsse zu ziehen. Die Berechnung des Gewichtes einer definierten DNA-Molekülmenge ist im Folgenden dargestellt:

Für die Berechnung der Molarität wurde eine durchschnittliche Masse von 330 [g/mol] pro Nukleotid angenommen. Aufgrund des DNA-Doppelstranges wurde mit einer durchschnittlichen Masse von 660 [g/mol] pro Basenpaar gerechnet. Das Genom von *S. agalactiae* umfasst 2 MBp, dies entspricht $2 * 10^6$ Bp * 660 [g/(mol * Bp)] = 1,32 x 10^9 [g/mol]. 1 mol entspricht dabei $6,02 * 10^{23}$ Teilchen (Avogadro´sche Zahl), woraus sich für ein DNA-Molekül ein Gewicht von 1,32 x 10^9 [g/mol] / $6,02 * 10^{23}$ [Teilchen/mol] = $2,19 * 10^{-15}$ [g/Molekül] ergibt. Somit errechnet sich für 10^9 DNA-Moleküle ein Gewicht von 2,19 µg.

Über die Konzentrationsbestimmung der für das Erstellen der Kalibriergeraden verwendeten *S. agalactiae*-DNA war es nun möglich, Verdünnungen der genomischen *S. agalactiae* DNA mit definierten DNA-Molekülmengen herzustellen.

11. Southern-Blot-Analyse

Die Methode des Southern Blots wurde von Southern im Jahr 1975 etabliert und dient als eine zentrale Methode des Transfers, der Fixierung und der Detektion von DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen.

11.1. Southern-Blot-Transfer

Für den Transfer wurden folgende Lösungen verwendet:

Depurinierungslösung	
HCl	0,25 M

Denaturierungslösung	
NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M

Neutralisierungslösung	
Tris/HCl	1 M
NaCl	2 M
pH 5,0	

Transferlösung (20 x SSC)	
NaCl	3 M
Trinatrium-Citrat	0,3 M
pH 7,0	

Zur Durchführung eines Southern Blots wurde chromosomale DNA zuerst durch Restriktionsendonukleasen verdaut und in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Um eine optimale elektrophoretische Auftrennung zu erhalten, erfolgte die Auftrennung in einem großen Agarosegel ÜN bei 24 V. Da der DNA-Größenstandard nach dem Transfer der DNA auf die Nylonmembran nicht mehr zu erkennen ist, wurde das Gel zuvor mit einem am Größenmarker anliegenden Lineal fotografiert. Für den Transfer wurde die Apparatur den Herstellerangaben gemäß aufgebaut und das Gel luftblasenfrei auf der Nylonmembran zurecht gelegt. Für den gesamten Transfervorgang wurde ein Unterdruck von 50 mbar an die Apparatur angelegt.

Zuerst wurde das Gel für 20 min mit 30 ml Depurinierungslösung überschichtet, welche während der Inkubationszeit zweimal ausgetauscht wurde. Durch die Depurinierungslösung werden Einzelstrangbrüche erzeugt, was einen effizienteren Transfer vor allem von großen DNA-Fragmenten auf die Membran ermöglicht. Anschließend wurde das Gel für 20 min mit 30 ml Denaturierungslösung überschichtet, wobei die Flüssigkeit während der Inkubationszeit ebenfalls zweimal gewechselt wurde. Anschließend folgte die Zugabe von 30 ml Neutralisierungslösung, mit der das Agarosegel ebenfalls für 20 min überschichtet wurde. Der Transfer der DNA aus

dem Gel auf die Nylonmembran erfolgte über einen Zeitraum von 1 h nach Überschichtung des Gels mit 30 ml Transferlösung. Der Filter wurde anschließend kurz auf Whatman-Papier getrocknet und die DNA im UV-Crosslinker (120000 µJ, 30 s) auf der Membran fixiert.

11.2. Southern-Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde zuerst eine spezifische DNA-Sonde hergestellt, die mittels PCR mit Digoxigenin-dUTP markiert wurde. Dazu wurde eine Standard-PCR durchgeführt, wobei dem Ansatz 0,5 µl Digoxygenin-dUTP zugesetzt wurde. Der Nachweis der Hybridisierung erfolgte über Alkalische Phosphatase-gekoppelte Anti-Digoxigenin-Antikörper.

Die für die Southern-Hybridisierung benötigten Lösungen sind im Folgenden aufgeführt:

(Prä-) Hybridisierungslösung
6 x SSC
5 x Denhardt
0,5 % (w/v) SDS
100 µg/ml Heringssperma-DNA
ad 20 ml mit A. bidest

50 x Denhardt
1 % (w/v) Ficoll
1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone
1 % (w/v) BSA Fraktion V
in A. bidest bei 37 °C lösen

Zunächst wurde die Membran für 1 h in einer Glasröhre mit Prähybridisierungslösung im Hybridisierungsofen (65 °C) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde zur Prähybridisierungslösung 10 µl Sonde zugegeben, die zuvor 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließendem auf Eis frisch abgekühlt worden war. Die Membran wurde ÜN in dieser Lösung rotierend bei 65 °C inkubiert.

11.3. Detektion durch Chemilumineszenz

Das verwendete Detektionsprinzip beruht auf der Bindung eines modifizierten Antikörpers an die DIG-Markierung der DNA-Sonde. An den Antikörper ist eine Alkalische Phosphatase gekoppelt, die das Substrat CSPD® dephosphoryliert, wodurch Licht einer Wellenlänge von 477 nm emittiert wird. Dieses Licht kann durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die Nylonmembran sichtbar gemacht werden. Nachfolgend sind zunächst die für die Waschschritte und die Detektion erforderlichen Lösungen aufgelistet:

Waschlösung I
2 x SSC
0,1 % (w/v) SDS

Waschlösung II
0,1 x SSC
0,1 % (w/v) SDS

Waschpuffer
0,3 % (v/v) Tween 20 in Puffer I

Puffer II
1 % (w/v) Blocking-Reagenz in Puffer I

Puffer I (Maleinsäurepuffer)

Maleinsäure	0,1 M
NaCl	1 M

=> pH 7,5

Puffer III (Detektionspuffer)

Tris/HCl	0,1 M
NaCl	1 M

=> pH 9,5

Die Membran wurde nach der Hybridisierung mit der DNA-Sonde zweimal für 15 min bei RT mit Waschlösung I gewaschen. Anschließend wurde sie zweimal für 25 min mit Waschlösung II bei einer Temperatur von 65 °C gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Membran wurde kurz in 30 ml Waschpuffer gelegt und anschließend 30 min in 30 ml Puffer II inkubiert. Für die Antikörperdetektion wurde ein Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Roche) 1:10000 in 20 ml Puffer II verdünnt, diese Lösung der Membran zugegeben und für 30 min inkubiert. Nach anschließendem zweimaligem Waschen der Membran für je 15 min in Waschpuffer, wurde die Membran für 5 min in 20 ml Puffer III inkubiert. CSPD® (25 mM, Roche) wurde 1:1000 in 10 ml Puffer III verdünnt und der Membran für 15 min zugegeben. Nach kurzem Antrocknen des Filters auf Whatman-Papier wurde er zwischen Frischhaltefolie gelegt und zum Starten der Dephosphorylierungsreaktion für 10-15 min bei 37 °C präinkubiert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm für 2-48 h aufgelegt und dieser im Anschluss entwickelt.

12. DNA-Chip-Experimente

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten DNA-Chip-Experimente erfolgten am Institut Pasteur in Paris. Die hierfür benötigten Lösungen zur Isolierung der RNA, Herstellung der cDNA und Hybridisierung der Proben mit 2134 offenen Leserastern von *S. agalactiae* NEM316 sind nachfolgend aufgeführt.

Resuspendierungspuffer

Tris	12,5 mM
EDTA	5 mM
Glucose	10 % (w/v)

50 x Denhardt

1 % (w/v) Ficoll
1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone
1 % (w/v) BSA Fraktion V
in A. bidest bei 37 °C lösen

SSPE-Puffer

NaCl	0,18 M
NaH_2PO_4	10 mM
EDTA	1 mM

pH 7,7

20 x SSC

NaCl	3 M
Trinatrium-Citrat	0,3 M

pH 7,0

(Prä-) Hybridisierungslösung

5 x SSPE
2 % (w/v) SDS
1 x Denhardt
100 µg/ml Heringssperma-DNA (frisch denaturiert)

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde zunächst eine 10 ml Kultur von *S. agalactiae* bis zur gewünschten OD_{600} in THY-Medium gezüchtet, anschließend abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl Resuspendierungspuffer gelöst und die Zellen mit 0,4 g Glasperlen (Durchmesser: 0,2 - 0,3 mm; Sigma) in einem Mini-Beadbeater (Bio101) zweimal für je 30 s aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm für 5 min wurde der Überstand mit 1 ml Trizol-Reagenz (Gibco BRL) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm wurde die wässrige Phase einer zweimaligen Chloroform-/Isoamylalkohol- (24:1) Behandlung unterzogen und die RNA anschließend durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 13000 rpm und RT abzentrifugiert, die RNA anschließend in RNase-freiem Wasser gelöst und die RNA-

Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Anschließend wurden 2 µg Gesamt-RNA in Anwesenheit von 2000 - 3000 Ci ^{33}P-dCTP (Amersham Pharmacia), 3´-spezifischen Oligonekleotiden und 50 U AMV Reverse Transkriptase (25 U/µl; Roche) in cDNA umgeschrieben. Die auf diese Weise hergestellte, radioaktiv-markierte cDNA wurde über eine QIAquick-Säule (Qiagen) gereinigt, um nicht eingebautes ^{33}P-dCTP zu entfernen. Vor der Hybridisierung der cDNA mit dem DNA-Chip wurde dieser zunächst mit 2 x SSC angefeuchtet und anschließend 1 h bei 65 °C mit 10 ml Prähybridisierungslösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der aufgereinigten cDNA mit dem DNA-Chip in 5 ml Hybridisierungslösung für 20 h bei 65 °C. Die Membran wurde daraufhin zweimal bei RT und zweimal bei 65 °C mit 0,5 x SSC, 0,2 % (w/v) SDS gewaschen. Zur Auswertung der DNA-Chipexperimente wurde die Membran auf Phosphoimagerplatten (Molecular Dynamics) für 24-72 h exponiert und anschließend im Phosphoimager (Molecular Dynamics) gescannt.

13. Rekombination von DNA

13.1. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für das Spalten von chromosomaler DNA bzw. Plasmid-DNA wurden in dieser Arbeit Restriktions-Endonukleasen des Typs II verwendet. Der Vorteil der Typ II Restriktions-Endonukleasen liegt in ihrer hochspezifischen Sequenzerkennung und somit in ihren absolut definierbaren Schnittstellen. Für alle verwendeten Enzyme wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer und Inkubationstemperaturen verwendet.

Bei Restriktion mit zwei verschiedenen Enzymen wurde ein Puffer verwendet, in dem beide Enzyme nach Herstellerangaben zu mindestens 75 % aktiv sind. Wenn dies nicht möglich war, wurde zuerst mit einem Enzym verdaut, der gesamte Ansatz mit Ethanol gefällt und danach das andere Enzym zugegeben. Alternativ wurde der Ansatz zum Pufferaustausch mit 500 µl A. bidest auf eine Microcon-100-Säule gegeben und für 10-15 min bzw. bis zum Erreichen des gewünschten Volumens von ca. 50 µl bei 2500 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des zweiten Enzyms mit dem dazugehörigen Puffer.

Verdau chromosomaler DNA

Für den Restriktionsverdau chromosomaler DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl gearbeitet. Je nach Konzentration der chromosomalen DNA wurden bis zu 5 µl DNA mit 1 µl Enzym und 1 µl Puffer versetzt, mit A. bidest. auf 10 µl aufgefüllt und bei entsprechender Temperatur im Heizblock inkubiert.

Analytischer Verdau

Im Falle eines analytischen Verdaus, der vor allem der Kontrolle rekombinanter Plasmide diente, wurde 1 µg DNA in einem Gesamtansatz von 10 µl für 1 h bei entsprechender Temperatur mit maximal 0,5 µl Enzym geschnitten. Gleichzeitig erfolgte der Verdau der im Ansatz enthaltenen RNA mit 2 µl einer 1:200 verdünnten RNase-Stammlösung (10 mg/ml). Die anschließende Kontrolle des Verdaus erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Präparativer Verdau von Plasmid-DNA

Für präparative Restriktionen, wie z.B. zur Linearisierung von Vektor-DNA oder zum Verdau von PCR-Fragmenten für eine anschließende Ligation, wurden 8 – 10 µg DNA, 5 µl 10 x Puffer und 1,5 µl Enzym eingesetzt und der Ansatz mit A. bidest auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Nach 2 h Inkubation bei entsprechender Temperatur wurden erneut 1,5 µl Enzym zugegeben und der Ansatz für weitere 2 h inkubiert.

13.2. Dephosphorylierung durch CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)

Plasmide, die nach entsprechender Restriktion in Ligationen eingesetzt werden sollten, wurden zur Vermeidung von Religationen an den Enden dephosphoryliert, um somit die Effizienz der Klonierung zu erhöhen. Die in dieser Arbeit verwendete Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) ist in der Lage, 5` - Phosphat-Gruppen von DNA, RNA und Nukleotiden abzuspalten.

Zur Inaktivierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurde der geschnittene Vektor für 10 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert. Zur Entsalzung des Ansatzes wurde dieser auf eine Microcon-100-Säule gegeben und nach Zugabe von 500 µl A. bidest für 10 - 15 min bei 2500 rpm und RT zentrifugiert. Nach Erreichen eines Einengungsvolumens von etwa 40 µl, wurde die Säule gewendet und deren Inhalt durch Zentrifugation bei 13000 rpm in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Dephosphorylierung fand in einem Endvolumen von

50 µl statt unter Zugabe von 5 µl 10 x CIAP-Puffer und 1 µl CIAP (1 U/µl). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C im Heizblock. Zur Inaktivierung der CIAP wurde der Ansatz im Heizblock für 10 min auf 70 °C erhitzt. Anschließend erfolgte der Verdau der CIAP durch Zugabe von 1 µl Proteinase K (5 mg/ml) und Inkubation bei 56 °C im Heizblock für 30 min. Die Proteinase K wurde durch Inkubation des Ansatzes für 1 h bei 65 °C im Heizblock inaktiviert. Es folgte eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und eine Ethanolfällung ÜN.

13.3. Ligation und Dialyse

Alle Ligationen wurden mir der T4-Ligase durchgeführt. Dieses Enzym verknüpft unter ATP-Verbrauch doppelsträngige DNA-Moleküle durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3´-OH Gruppen und freien 5´-Phosphat-Gruppen. Für die Ligation eines dephosphorylierten Vektors mit dem gewünschten Insert wurde in einem Ligationsvolumen von 20 µl gearbeitet. Vektor-DNA und Insert-DNA wurden in einem ungefähren Mengenverhältnis von 1:3 eingesetzt. Dem Ansatz wurden 2 µl 10 x Reaktionspuffer und 1 µl T4 – DNA – Ligase (1 U/µl) zugegeben und dieser ÜN bei 16 °C im Wasserbad oder in einer PCR-Maschine inkubiert. Jeder Ligationsansatz wurde anschließend auf einen Milliporefilter (Millipore GmbH; 0,025 µm, 13 mm) aufgetragen und für 30 min gegen A. bidest dialysiert. Dadurch wird die Salzkonzentration im Ansatz verringert, was eine nachfolgende Transformation durch Elektroporation erleichtert. Bei – 20 °C läßt sich der Ligationsansatz lagern und kann jederzeit für eine Transformation verwendet werden.

14. Transformation durch Elektroporation

14.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von DNA müssen *E. coli*-Zellen speziell vorbereitet werden, da sie keine natürliche Kompetenz besitzen. Für die Aufnahme von DNA durch Elektroporation ist es nötig, die Salzkonzentration und die Konzentration von geladenen Molekülen in der Zellhülle zu verringern.

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 250 ml LB-Medium mit 1 ml einer über Nacht gewachsenen *E. coli*-Vorkultur angeimpft und der Ansatz unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,3 – 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden dann 30 min auf Eis

inkubiert und anschließend 15 min bei 4 °C und 8000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 ml eiskaltem A. bidest resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 8000 rpm wurde das Pellet in 125 ml eiskaltem A. bidest aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Im Anschluß an diese Waschschritte wurde das erhaltene Pellet in 25 ml 10 % (v/v) eiskaltem Glycerin resuspendiert und erneut einer Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 8000 rpm unterzogen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 µl 10 % (v/v) eiskaltem Glycerin resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung in 50 µl Aliquots bei -70 °C gelagert.

14.2. Herstellung kompetenter *S. agalactiae*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *S. agalactiae* Zellen wurden 100 ml THY-Medium mit 1 ml *S. agalactiae* ÜN-Kultur angeimpft und die Kultur bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,4 leicht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde anschließend für 30 min auf Eis inkubiert und dann bei 4 °C und 5000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mehrmals mit einer abnehmenden Menge an 10 % (v/v) eiskaltem Glycerin gewaschen (100 ml, 50 ml, 25 ml und 12,5 ml 10 % (v/v) Glycerin), wobei jeweils ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zwischengeschaltet wurde. Im Anschluß an den letzten Waschschritt wurde das Pellet in 1 ml 10 % (v/v) eiskaltem Glycerin aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 4 °C für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde letztendlich in einer seinem Eigenvolumen entsprechenden Menge an 20 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in 25 µl Aliquots bei – 70 °C aufbewahrt.

14.3. Elektroporation in *E. coli*

Die Transformation durch Elektroporation wurde erstmals von Harlander und McKay im Jahr 1984 beschrieben. Durch Anlegen einer Spannung wird die elektrische Ladung der Bakterienzellwand so verändert, daß die Zellen kurzzeitig in der Lage sind, fremde DNA von außen aufzunehmen. Die Durchführung erfolgte im Wesentlichen wie nach Calvin und Hanawalt im Jahr 1988 beschrieben. Ein 50 µl Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und in einer vorgekühlten 0,2 cm Elektroporationsküvette mit 1 - 5 µl Plasmid-DNA oder 3 - 5 µl eines zuvor dialysierten Ligationsansatzes vermischt. Durch eine Einzelpulsgabe bei einer Spannung von 2500 V, 200 Ω Widerstand, 25 µF Kapazität und einer Zeitkonstante von 4,5 - 4,7 s, erfolgte die Transformation der Fremd-DNA in die *E. coli*-Zellen. Nach der

Elektroporation wurden die Bakterien sofort in 300 µl LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C zur Regeneration der Zellen und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz stehend inkubiert. Bei Selektion auf Erythromycin wurde das Medium zur Vorinduktion der Zellen 1:100 mit Erythromycin (1:1000 in abs. Ethanol verdünnt) versetzt. Anschließend wurden 2 x 150 µl Suspension auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

14.4. Elektroporation in *S. agalactiae*

Für die Elektroporation wurden 25 µl der kompetenten *S. agalactiae* Zellen auf Eis aufgetaut. Es wurden 25 µl eiskaltes 20 % (v/v) Glycerin, sowie 50 µl eiskaltes Wasser zugegeben und der Ansatz gemischt. Die komplette Zellsuspension wurde in eine vorgekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Nach Zugabe von etwa 5 µg Plasmid-DNA erfolgte eine Pulsgabe von 2000 V, 99 Ω Widerstand und 25 µF Kapazität. Die Zellen wurden kurz auf Eis inkubiert und anschließend in 300 µl THY-Medium, dem 10 % Glycerin zugesetzt worden war, aufgenommen und zur Regeneration der Zellen bei 30 °C bzw. 37 °C für 2 h im Heizblock inkubiert. Jeweils 200 µl des Elektroporationsansatzes wurden auf THY-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und etwa 2 Tage bei 28 °C bzw. 37 °C inkubiert.

15. Herstellung von definierten Deletionsmutanten in *S. agalactiae*

15.1. Cross-over-PCR

Für die Herstellung definierter Deletionsmutanten in *S. agalactiae* wurden zunächst die äußeren Bereiche der zu deletierenden Gene in einer Standard-PCR amplifiziert. Die beiden innen liegenden Primer der PCR-Produkte trugen komplementäre Enden, die in einer anschließenden Cross-over-PCR hybridisieren konnten. Auf diese Weise wurde in der Cross-over-PCR mit den beiden außen liegenden Primern ein Fragment amplifiziert, welches die beiden Fragmente aus der ersten PCR umfaßte und den inneren zu deletierenden Bereich des entsprechenden Gens nicht trug. Aus dem ersten PCR-Ansatz wurden über Microcon-100-Säulen zuerst die Primer entfernt. Bei der Cross-over PCR wurden als Matrize die beiden PCR-Fragmente mit den innen liegenden, zueinander komplementären Enden eingesetzt.

Im Folgenden ist ein typischer Cross-over PCR-Ansatz aufgeführt:

Cross-over PCR-Ansatz

5 µl 10 x *Taq*-Polymerase-Puffer
2,5 µl $MgCl_2$ (25 mM)
5 µl dNTP´s (2 mM)
2 µl Fragment 1
2 µl Fragment 2
1 µl del 1-Primer (10 pmol)
1 µl del 4-Primer (10 pmol)
1 µl *Taq*-Polymerase (1 U/µl)
⇨ ad 50 µl mit A. dest

Die über Cross-over PCR erhaltenen Deletionsfragmente wurden über passende Schnittstellen in den temperatursensitiven Vektor pG^+host6 ligiert und in *E. coli* DH5α transformiert. Rekombinante Klone wurden anschließend auf Ampicillin-enthaltenden LB-Agarplatten bei 37 °C selektioniert.

15.2. Herstellung definierter Deletionsmutanten

Die zur Deletion eines definierten Gens konstruierten pG^+host6-Derivate wurden in *S. agalactiae* transformiert und rekombinante Klone auf Erythromycin-haltigen THY-Agarplatten für zwei Tage bei 28 °C selektioniert. Von den erhaltenen Transformanten wurden anschließend unter Erythromycin-Selektion Flüssigkulturen hergestellt. Von diesen ÜN-Kulturen wurde 1 ml entnommen, die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, zweimal mit je 1 ml sterilem THY-Medium gewaschen und das Bakterienpellet nach Zentrifugation in 200 µl sterilem THY-Medium resuspendiert. Diese 200 µl Kultur wurden zur Inokulation von 5 ml THY-Medium verwendet und der Ansatz für 2,5 h bei 30 °C inkubiert. Durch eine anschließende Inkubation der Kultur für 2,5 h bei 39 °C wurde die Replikation des temperatursensitiven Plasmids unterbunden. Um auf Stämme zu selektieren, bei denen das Plasmid über homologe Rekombination in das Chromosom integriert worden war, wurden je 20 µl einer 1:10 Verdünnung der Ansätze auf Erythromycin-haltigen THY-Agarplatten ausplattiert und bei 39 °C inkubiert. Von den erhaltenen Kolonien wurden nun Flüssigkulturen in Erythromycin-haltigem THY-Medium angesetzt und diese wieder ÜN bei 39 °C inkubiert. Um das im Medium

enthaltene Antibiotikum zu entfernen wurde von den gezüchteten ÜN-Kulturen 1 ml entnommen, die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert, zweimal mit je 1 ml sterilem THY-Medium gewaschen und das Bakterienpellet nach Zentrifugation in 200 µl sterilem THY-Medium resuspendiert. Um das Plasmid in einer zweiten Rekombination aus dem Genom zu entfernen und dabei den gewünschten Bereich im Genom zu deletieren, wurden mit jeweils 10 µl der gewaschenen ÜN-Kulturen insgesamt 8 Röhrchen mit 5 ml THY-Medium angeimpft und diese bei 30 °C ÜN inkubiert. Bei dieser Temperatur ist das thermosensitive Replikon des Plasmids wieder aktiv. Das Vorhandensein zweier aktiver Replikons im Genom führt zu einer Störung der Replikation und somit zu Wachstumsvorteilen der Bakterien, die das Plasmid durch homologe Rekombination wieder aus dem Genom entfernt haben. Aus diesem Grund wurden die Kulturen für insgesamt 7 Tage jeweils zweimal täglich überimpft. Dazu wurde je 5 ml THY-Flüssigmedium mit 10 µl Vorkultur inokuliert und weiterhin ohne Antibiotika bei 30 °C inkubiert. Nach 7 Tagen wurden Verdünnungen der Flüssigkulturen auf THY-Platten ohne Antibiotika ausplattiert und bei 39 °C inkubiert. Zur Kontrolle des Verlusts der Antibiotikaresistenz wurden je Ansatz 50 Kolonien auf eine THY-Agarplatte ohne Antibiotika und auf eine Agarplatte mit Antibiotikazusatz übertragen. Kolonien, die kein Wachstum auf der Agarplatte mit Antibiotikazusatz zeigten, wurden erneut großflächig auf je 1/8 einer THY-Agarplatte ohne Antibiotikum und auf 1/8 einer THY-Agarplatte mit Antibotikumzusatz ausgestrichen. Kolonien, die ihre Antibiotikaresistenz verloren hatten, wurden über PCR auf Verlust des gewünschten Gens untersucht.

16. Adhärenz und Invasion

Adhärenz an und Invasion in Eukaryotenzellen sind wichtige Pathogenitätsmechanismen bei einer Streptokokkeninfektion, die den Bakterien eine Besiedelung von Wirtsepithelien und die weitere Ausbreitung in tiefere Gewebeschichten ermöglichen.

In dieser Arbeit wurden Adhärenz- und Invasionsversuche mit der humanen Lungenepithelzelllinie A549 und der humanen Rachenepithelzelllinie HEp2 durchgeführt. Mit deren Hilfe wurde das Adhärenz- und Invasionsverhalten von verschiedenen *S. agalactiae*-Stämmen quantifiziert.

16.1. Vorbereitung der Zellen für Adhärenz- und Invasionsversuche

Sowohl für Adhärenz- als auch für Invasionsversuche wurden die eukaryotischen Zellen in 24-Well-Platten ausgesät. Dafür wurden die konfluent gewachsenen Zellen einer Kulturflasche einmal mit 10 ml PBS gewaschen, anschließend 1,5 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und nach Benetzung der Zellen die Lösung wieder von der Flasche abgezogen. Nach Ablösen der Zellen durch 5 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit 20 ml entsprechendem Zellkulturmedium (+ 10% FCS) in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1200 rpm und 37 °C wurden die Zellen in 8 - 10 ml Zellkulturmedium (+ 10 % FCS) aufgenommen. 50 µl der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit Trypanblaulösung versetzt und die Lebendzellzahl durch Zählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Zusammensetzung der benötigten Trypanblaulösung ist nachfolgend dargestellt:

Trypanblaulösung

NaCl	0,45 % (w/v)
Trypanblau	0,25 % (w/v)

=> Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter).

Die Trypanblaulösung ermöglicht eine Lebend-Tod-Differenzierung der eukaryotischen Zellen, da sich Trypanblau nur in membrangeschädigte Zellen einlagert. Im Phasenkontrastmikroskop können anschließend angefärbte geschädigte Zellen von ungefärbten und somit unbeschädigten Zellen unterschieden werden.

Es wurden allen vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt und unter Einberechnung des Verdünnungsfaktors von 2×10^4 wurde die Zellzahl / ml bestimmt. Für jeden zu testenden Bakterienstamm wurden je drei Wells für Adhärenztests und drei Wells für Invasionsversuche mit $2{,}5 - 4 \times 10^5$ eukaryotischen Zellen in 1 ml Zellkulturmedium angeimpft. Zur Anheftung der Zellen am Boden der Wells wurden die 24-Well-Platten ÜN bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

16.2. Vorbereitung der Bakterienstämme für Adhärenz- und Invasionsversuche

Für die Adhärenz- und Invasionsversuche wurden die zu untersuchenden *S. agalactiae*-Stämme in 5 ml THY-Medium ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend für 5 min bei

RT und 8000 rpm abzentrifugiert und das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde anschließend in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,65 in Zellkulturmedium eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt und für 3 x 5 s stark gevortext.

Um das mögliche Wachstum der Bakterien im Zellkulturmedium während der Inkubation mit den eukaryotischen Zellen in die Bestimmung der Lebendzellzahl einzuberechnen, wurden 900 µl Zellkulturmedium mit 100 µl der oben beschriebenen Bakterienverdünnung beimpft und 2 h bei 37 °C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden anschließend Verdünnungsstufen in LB-Medium erstellt. Je 3 x 100 µl der Verdünnungen 10^{-4} – 10^{-6} wurden pro Bakterienstamm auf THY-Agarplatten ohne Antibiotika ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

16.3. Adhärenztest

Von den ÜN in den Wells konfluent gewachsenen A549-Zellen bzw. HEp2-Zellen wurde vorsichtig das Medium abgezogen und durch 900 µl frisches Zellkulturmedium ersetzt. Pro Well wurden 100 µl der 1:10 verdünnten Bakteriensuspension zugegeben und der gesamte Ansatz für 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 2 h Inkubation wurde das Medium abgezogen und jedes Well 3 x mit 1 ml PBS gewaschen. Dadurch wurden alle nicht-adhärierten Bakterien abgewaschen und entfernt. Durch die anschließende Zugabe von 20 µl Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,53 mM) und Inkubation für 5 min bei 37 °C wurden die eukaryotischen Zellen von den Wells abgelöst. Zur anschließenden Lyse der Eukaryotenzellen wurden 400 µl steriles A. bidest pro Well zugegeben und der gesamte Ansatz in ein Eppendorfgefäß überführt. Der Ansatz wurde sofort auf Eis gestellt und 3 x für 5 s stark gevortext. Zur Bestimmung der Anzahl adhärenter Bakterien wurden Verdünnungsstufen in LB-Medium bis 10^{-5} pro Well erstellt und je 100 µl der Verdünnungen 10^{-3} - 10^{-5} auf THY-Agarplatten ohne Antibiotika ausplattiert. Die Agarplatten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert.

Unter diesen Versuchsbedingungen werden sowohl die adhärenten, als auch die intrazellulären Bakterien erfaßt.

16.4. Invasionstest

Wie auch bei der Durchführung des Adhärenztests wurde zunächst das Medium von den A549-Zellen bzw. HEp2-Zellen vorsichtig abgezogen und durch 900 µl frisches Medium ersetzt. Pro Well wurden 100 µl der 1:10 verdünnten Bakteriensuspension zupipettiert und die Zellen für 2 h bei 37 °C mit 5 % CO_2 inkubiert. Nach 2 h wurde das Medium von den Zellen abgezogen und 1 ml frisches Medium mit 10 U/ml Penicillin und 0,01 mg/ml Streptomycin pro Well zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für weitere 2,5 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. In dieser Zeit wurden alle extrazellulären Bakterien abgetötet, so daß nur die intrazellulären Bakterien überlebten. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und jedes Well zweimal mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Durch Zugabe von 20 µl Trypsin/EDTA und Inkubation bei 37 °C für 5 min wurden die eukaryotischen Zellen vom Well abgelöst und durch Zugabe von 400 ml A. bidest lysiert. Die Lysate wurden in Eppendorfgefäße überführt und sofort auf Eis gestellt. Um die intrazelluläre Bakterienzahl zu bestimmen, wurden Verdünnungsstufen der Lysate in LB-Medium erstellt und pro Well je 100 µl der Verdünnungen 10^{-1} und 10^{-2} auf THY-Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert. Beim Invasionstest werden ausschließlich die intrazellulären Bakterien erfaßt.

16.5. Auswertung

Die Bestimmung der adhärenten und intrazellulären Bakterien erfolgte über das Auszählen der CFU (Colony Forming Units) pro Agarplatte unter Einberechnung der Verdünnungsstufen. Zur exakten Berechnung der adhärenten und invasiven Bakterienzahl wurden die erhaltenen Werte mit dem Faktor 4,2 multipliziert, der das Volumen für Ablösen und Lysieren der A549-Zellen bzw. HEp2-Zellen im Well beinhaltet. Anschließend war ein direkter Vergleich der Anzahl der in den Versuch eingesetzten Bakterien (Lebenzellzahlbestimmung) und adhärenten bzw. invasiven Bakterien möglich. Um aussagekräftige Absolutwerte für Adhärenz und Invasion zu erhalten, wurde die Anzahl der adhärenten bzw. invasiven Bakterien auf die Lebendzellzahl der Bakterien nach Wachstum für 2 h im Zellkulturmedium bezogen. Zur Berechnung des Invasionsindexes wurde die Anzahl der invasiven Keime in Relation zur Anzahl der adhärenten Bakterien gesetzt. Insgesamt wurden Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen ermittelt.

16.6. Zugabe von Fusionsproteinen in den Adhärenz-/ Invasionsversuch

Um den Einfluß des Fusionsproteins HshN und Hsh-N2C auf das Adhärenz- und Invasionsverhalten von *S. agalactiae* 6313 zu untersuchen, wurde das aufgereinigte Fusionsprotein zunächst gegen 1 x PBS dialysiert und anschließend die Proteinkonzentration der Probe bestimmt. Für die Adhärenz- und Invasionsversuche wurde zunächst das alte Medium von den HEp2-Zellen in den 24-well Platten abpipettiert und 300 µl frisches MEM-Medium (+ 10 % FCS) zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe der Fusionsproteine, wobei das Gesamtvolumen im Ansatz mit 1 x PBS auf 500 µl aufgefüllt wurde. Jeder dieser Ansätze wurde zunächst für 30 min bei 37 °C und 5 % CO_2 vorinkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl der Bakteriensuspension erfolgte eine weitere Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 für 2 h. Die Bestimmung der Anzahl adhärenter bzw. invasiver Bakterien erfolgte wie bereits beschrieben.

17. Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz-Analysen wurden wie die Adhärenz- und Invasionsversuche mit der humanen Lungenepithelzelllinie A549 durchgeführt. Mit dieser Methode wurde untersucht, ob das Protein Hsh aus *S. agalactiae* auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiert ist. In diesen Versuch wurden der Wildtypstamm *S. agalactiae* 6313 und dessen *hsh*-Deletionsmutante eingesetzt. Nach Inkubation der Bakterienkulturen mit den Lungenepithelzellen wurden adhärente Bakterien durch Zugabe spezifischer Primärantikörper nachgewiesen, die sich gegen das Hsh-Protein von *S. agalactiae* richten. Die aus Mäusen gewonnenen Erstantikörper konnten durch die Zugabe eines Zweitantikörpers, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) gekoppelt war, nachgewiesen werden.

17.1. Vorbereitung der Zellen für die Immunfluoreszenz

In Anlehnung an die Adhärenz- bzw. Invasionsversuche wurden auch für die Durchführung der Immunfluoreszenz die eukaryotischen Zellen in 24-Well-Platten mit einer Anzahl von 3 x 10^5 Zellen / ml Zellkulturmedium ausgesät. Zusätzlich erfolgte für jedes Well die Zugabe eines sterilen Deckglases, auf dem die eukaryotischen Zellen wachsen sollten. Die Inkubation der Well-Platten erfolgte ÜN bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank.

17.2. Vorbereitung der Bakterienstämme

In Anlehnung an den Adhärenzversuch wurden zur Durchführung der Immunfluoreszenz-Versuche 5 ml-ÜN-Kulturen der *S. agalactiae*-Stämme bei 37 °C inkubiert. Jeweils 3 ml der Bakterienkultur wurden bei RT und 8000 rpm sedimentiert und das Pellet mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde anschließend in 1 ml Zellkulturmedium suspendiert und auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,65 in Zellkulturmedium eingestellt. Die eingestellten Bakterien wurden anschließend 1:10 in Zellkulturmedium verdünnt und stark gevortext. Daraufhin wurde zunächst das Zellkulturmedium vorsichtig von den A549-Zellen abgezogen und 1 ml frisches Zellkulturmedium zugegeben. Pro Well wurden 100 µl der Bakterienverdünnung zugegeben und der gesamte Ansatz für 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Danach wurde das Medium abgezogen und jedes Well 5 x mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Hierdurch werden alle nicht-adhärierten Bakterien entfernt. Durch die anschließende Zugabe von 300 µl 4 % (v/v in 1 x PBS) Formaldehyd und Inkubation für 30 - 60 min bei RT unter dem Abzug wurden die A549-Zellen auf dem Deckglas fixiert. Daraufhin wurde die Lösung vorsichtig abgenommen und die Wells einmal mit 1 x PBS gewaschen. Die anschließende Inkubation der Wells mit jeweils 300 µl 10 % (w/v in PBS) BSA für 30 min bei RT diente der Absättigung freier Antikörperbindestellen. Nachdem die Lösungen vorsichtig abpipettiert worden waren, erfolgte die Zugabe von 250 µl des entsprechenden Hsh-Primärantikörpers (1:300 verdünnt in 1 x PBS). Als entsprechende Positivkontrolle diente der FbsA-Primärantikörper, der sich spezifisch gegen den auf der Oberfläche der Bakterien lokalisierten Hauptfibrinogen-Rezeptor richtet. Der Ansatz wurde für 45 min bei RT auf dem Taumler inkubiert und anschließend dreimal mit 10 % BSA (w/v in PBS) gewaschen, um nicht-gebundene Primärantikörper zu entfernen. Durch die darauf folgende Zugabe von 250 µl eines TRITC-markierten Sekundärantikörpers, der sich gegen Immunglobuline aus der Maus richtet, konnten die gebundenen Primärantikörper und damit die adhärierten Streptokokken markiert werden. Der Ansatz wurde für 30 – 45 min bei RT im Dunkeln auf einem Taumler inkubiert und anschließend dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Unter Zugabe von 10 µl Moviol wurden die Deckgläser mit der Oberfläche nach unten auf einem Objektträger ÜN bei 39 °C im Dunkeln fixiert. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

18. Bindung FITC-markierter Bakterien an immobilisierte Proteine

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fluoresceinisothiocyanat (FITC), der sich unspezifisch in bakterielle Oberflächenstrukturen einlagert, können Bakterien markiert und deren Bindungsverhalten an immobilisierte Proteine untersucht werden.

Im Folgenden sind die für die Durchführung des Bindungsassays notwendigen Lösungen aufgeführt:

1 x PBS

NaH_2PO_4	1,82	g/l
NaCl	5,84	g/l
Na_2HPO_4	12,50	g/l

1 x PBST

PBS	
Tween 20	0,05 %

Natriumcarbonatpuffer

$NaHCO_3/Na_2CO_3$	100 mM
NaCl	50 mM
pH 9,2	

Fluoreszeinisothiocyanat-Lösung (FITC-Lösung) (frisch ansetzen)
1 mg/ml FITC in Natriumbicarbonat-Puffer (Aufbewahrung im Dunkeln)

Zur Durchführung des Bindungsassays FITC-markierter Bakterien an immobilisierte Proteine wurden die zu testenden Proteine Fibronektin, Fibrinogen und Collagen für etwa 16 h in einer Konzentration von 1 µg/10 µl in PBS in Terasaki-Platten immobilisiert. Dazu wurden je 4 Wells pro Keim und Protein mit je 10 µl Proteinlösung befüllt. Die Platten wurden ÜN dunkel in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert.

Zum Test stationär gewachsener Bakterien wurden 3 ml ÜN-Kultur des jeweiligen Bakterienstammes bei 9000 rpm und RT für 5 min abzentrifugiert und das Pellet einmal mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl FITC-Lösung resuspendiert und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Kulturen wurden dann bei 9000 rpm und RT für 5 min sedimentiert. Zur Entfernung nicht gebundenen FITCs, wurde die Kultur solange mit je 1 ml 1 x PBS gewaschen, bis der Überstand keine gelbliche Färbung mehr aufwies. Das Pellet wurde

anschließend in 1 ml 1 x PBS resuspendiert und nach starkem Vortexen auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 1,0 in 1 x PBS eingestellt.

Die Terasaki-Platten wurden vor der Inkubation mit den Bakterien vorsichtig mit 10 ml 1 x PBS gewaschen und die Flüssigkeit anschließend vollständig entfernt. Um freie Bindungsstellen auf den Terasaki-Platten abzublocken, wurden in jedes Well 10 µl einer 10 %-igen Blockingreagenz-Lösung (Roche) pipettiert und die Platten 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten vorsichtig mit 10 ml 1 x PBS gewaschen und die Flüssigkeit vollständig entfernt. Anschließend wurden je Well 10 µl der eingestellten Bakteriensuspension auf die Terasaki-Platten pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden alle Platten 3 x mit je 10 ml PBST-Puffer gewaschen und bis zur Fluoreszenz Messung in einem Cytoflow-Meßgerät im Dunklen aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Gesamtzahl der in den Versuch eingesetzten Bakterien wurden 500 µl der markierten Bakterien 1 h bei 37 °C im Eppendorfgefäß inkubiert und anschließend 1 x mit 1 x PBS gewaschen. Von der jeweils gewaschenen Bakterienkultur wurden je 10 µl in 6 Wells pipettiert und deren Fluoreszenz direkt gemessen.

Nachfolgend sind die Parameter des verwendeten Cytofluor-Programms beschrieben:

Cytofluor-Programm

Cycles: 1	Emission: 530/30	Gains: 72, 75, 77, 80
Scans/Cycle: 4	Excitation: 485/20	

19. Proteinchemische Arbeiten

19.1. Herstellung von prokaryotischen und eukaryotischen Zellfraktionen

Isolierung von Proteinen aus *S. agalactiae*

Eine *S. agalactiae* Kultur wurde bis zum Erreichen einer gewünschten OD_{600} in THY-Flüssigmedium bei 37 °C inkubiert, anschließend in ein 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C und 5000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Zur Isolierung von Proteinen aus dem Kulturüberstand wurde der Überstand in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit

1/10 Volumen 100 % TCA (Trichloressigsäure) versetzt und für mindestens 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 4 °C und 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend mehrmals mit 5 % (w/v) gesättigtem Natrium-Acetat in Ethanol (mit einer Spatelspitze Phenolrot) gewaschen, bis der Indikator Phenolrot durch Rotfärbung einen neutralen pH-Wert anzeigte. Um das Natrium-Acetat aus der Probe zu entfernen, wurde das Pellet mit absolutem Ethanol gewaschen, dieses anschließend getrocknet und in 100 µl 1 x SDS-Ladepuffer aufgenommen.

Zur Isolierung bakterieller Zellwand- bzw. Cytoplasmaproteine wurde das Bakterienpellet zweimal mit 20 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,6) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,6) aufgenommen und in ein 1,5 ml Kryoröhrchen überführt. Nach Zugabe von ca. 250 mg Glasperlen (Ø=0,2 mm; Sigma) erfolgte der Zellaufschluß im Ribolyser (3-4 x 45 s; Stufe 5). Anschließend wurden bei 13000 rpm und 4 °C für 10-15 min feste Zelltrümmer und Glasperlen abzentrifugiert. Der klare Überstand enthielt vornehmlich Cytoplasmaproteine der Bakterien. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit 1 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,6) gewaschen und in 100 µl TES-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Mutanolysin (5000 U/ml) und 50 µl Lysozym (5 mg/ml) wurde der Ansatz für 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten mit 13000 rpm für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand enthielt schließlich die Zellwandproteine.

Zellfraktionierung von A549-Zellen und HEp2-Zellen

Zur Zellfraktionierung von A549-Zellen wurden diese konfluent in Zellkulturflaschen gezüchtet. Der für die Fraktionierung benötigte Saponinpuffer ist nachfolgend aufgelistet.

Saponinpuffer

Saponin	1 %
Tris/HCl (pH 7,6)	50 mM
PMSF	1 mM (frisch zugeben aus 100 mM Stammlösung in Isopropanol)

Die Zellkulturflaschen wurden zunächst auf Eis gestellt und die Zellen zweimal mit eiskaltem 1 x Zellkultur-PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 900 µl eiskaltem PBS. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche gekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Mit 500 µl eiskaltem PBS wurden die restlichen, in der

Zellkulturflasche verbliebenen Zellen gelöst und mit der vorherigen Zellsuspension vereinigt. Die Zellen wurden für 2 min bei 4 °C und 7000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Saponinpuffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Der Pufferbestandteil Saponin lagert sich hierbei in die Zellmembran ein, woraufhin das Cytoplasma der Zellen ausläuft. Nach Zentrifugation für 2 min bei 4 °C und 14000 rpm wurden die im Überstand befindlichen cytoplasmatischen Proteine in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei –20 °C gelagert. Das Pellet wurde mit 500 µl Saponinpuffer gewaschen und nach Zentrifugation in 100 µl Saponinpuffer mit 1 % Triton-X-100 aufgenommen. Durch das Triton-X-100 wird die Membran der Zellen lysiert, so daß sich nach einer Zentrifugation für 1 min bei 4 °C und 14000 rpm cytoplasmatische Proteine im Überstand befinden. Auch diese Proteinfraktion wurde bei –20 °C gelagert. Das Pellet wurde in 40 µl A. bidest aufgenommen und stellt die Triton-unlösliche Cytoskelett-Fraktion dar.

19.2. Auftrennung von Proteinen durch diskontinuierliche SDS-PAGE

Mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) lassen sich Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe auftrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Größe und der Gesamtladung des Proteins. Bei der SDS-PAGE wird den Proteinproben ein Überschuß an SDS (Natriumdodecylsulfat) zugegeben. Dieses Detergenz bewirkt eine Denaturierung der Proteine und lagert sich gleichzeitig an hydrophobe Bereiche des Proteins an. Durch seine nach außen weisenden negativen Ladungen werden die positiven Ladungen im Protein selbst vernachlässigbar klein, und alle Proteine wandern somit durch das als Molekularsieb fungierende Gel in Richtung Anode.

In der vorliegenden Arbeit wurden diskontinuierliche Gele verwendet, die aus einem Sammelgel, in dem die Proteine zunächst aufkonzentriert werden, und einem Trenngel, in dem die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts stattfindet, bestanden.

Die Gele wurden in einem Minigelsystem der Firma Owl hergestellt. Die Zusammensetzung eines 10 %igen Polyacrylamid-Gels ist folgender Tabelle zu entnehmen:

	Trenngel (10 %)	Sammelgel
A. bidest	3,3 ml	2,1 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	4,0 ml	0,5 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl; pH 8,8)	2,5 ml	------
Sammelgelpuffer (1 M Tris/HCl; pH 6,8)	------	0,38 ml
10 % (w/v) SDS	0,1 ml	0,03 ml
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	0,1 ml	0,03 ml
TEMED	4,0 µl	3,0 µl

Weitere benötigte Lösungen sind nachfolgend aufgeführt:

5 x SDS-Probenpuffer		**10 x SDS-Laufpuffer**	
Tris-HCl (pH 6,8)	250 mM	Tris	250 mM
DTT	500 mM	Glycin	2,5 M
SDS	10 % (w/v)	SDS	1 % (w/v)
Glycerol	50 % (v/v)		
Spatelspitze Bromphenolblau			

Die Gelkammer wurde nach Herstellerangaben zusammengebaut, das Trenngel bis ca. 2 cm unterhalb der kleineren Glasplatte gegossen und sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation für ca. 1 h wurde der Alkohol entfernt und der Zwischenraum der Glasplatten mit Whatman-Papier getrocknet. Danach wurde sofort das Sammelgel gegossen und der gewünschte Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit 1 x SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Der Kamm wurde anschließend herausgezogen und Luftblasen unterhalb der Glasplatten mittels einer, mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllten Spritze entfernt. Die Proteinproben wurden nach Aufkochen für 5 min bei 95 °C in 1 x Probenpuffer mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen gefüllt. Der Lauf erfolgte pro Gel bei 16 mA für ca. 2 h.

19.3. Färbung von Proteinen in SDS-Gelen

Coomassie-Färbung

Durch Coomassie-Färbung können Proteinmengen ab 100 - 300 ng pro Bande nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Silberfärbung von Proteinen erlaubt die Coomassie-Färbung eine ungefähre Quantifizierung der Proteinmengen aufgrund der Bandenintensität.

Für eine Coomassie-Färbung wurde das Gel nach dem Lauf für mindestens 1 h in Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brillant Blue R250, 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig) und anschließend in Entfärberlösung (10 % (v/v) Eisessig) bis zur Entfärbung des Hintergrundes inkubiert.

Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen ist gegenüber einer Coomassie-Färbung sehr viel sensitiver und erlaubt den Nachweis von Proteinmengen ab 2 ng. Die hierfür benötigten Lösungen sind nachfolgend aufgelistet.

Fixierlösung

12 % (v/v) Eisessig
50 % (v/v) Methanol
50 µl 37 % Formaldehyd (pro 100 ml, frisch zugesetzt)

Thiosulfatlösung

0,02 % (w/v) $Na_2S_2O_3$ x 5 H_2O

Silbernitratlösung (frisch angesetzt)

0,2 % (w/v) $AgNO_3$
75 µl 37 % Formaldehyd (pro 100 ml)

Entwicklerlösung

6 % (w/v) Na_2CO_3
0,0004 % (w/v) $Na_2S_2O_3$
50 µl 37 % Formaldehyd
(pro 100 ml, frisch zugesetzt)

Stoplösung

50 mM EDTA

Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde das Polyacrylamidgel für mindestens 30 min in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel zweimal für je 10 min mit 50 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Gel wurde danach genau 1 min in Thiosulfatlösung

geschwenkt und dreimal 30 s in A. bidest gewaschen. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel 15 min in frisch angesetzter Silbernitratlösung inkubiert. Die Entwicklung der Banden erfolgte in Entwicklerlösung bis zur gewünschten Bandenintensität. Daraufhin wurde das Gel zweimal kurz mit A. bidest gewaschen und zum Stoppen der Reaktion 15 min in Stoplösung inkubiert.

Inverse Färbung von Proteinen

Zur inversen Färbung von Proteinen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wurde das Gel zuerst einige Minuten in A. bidest geschwenkt, anschliessend 5 min in 0,2 M Imidazollösung und zuletzt in 0,3 M $ZnSO_4$-Lösung inkubiert. Bei der dabei ablaufenden Reaktion erscheinen Proteine als durchsichtige Banden auf weissem Hintergrund. Zum Stop der Reaktion wurde das Gel erneut in A. bidest geschwenkt. Die gewünschten Proteinbanden wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und bei – 20 °C gelagert.

19.4. Western-Blot (nach Towbin *et al,* 1979)

Mittels Western-Blot werden Proteine nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Nachfolgend ist die in dieser Arbeit verwendete Methode des „semidry“-blottens erläutert.

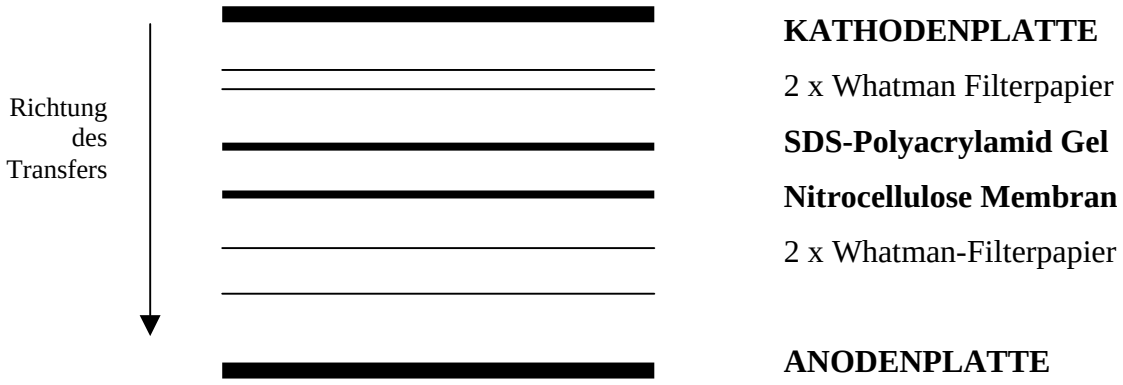
Western-Blot (semidry)

Die Zusammensetzung des verwendeten Transferpuffers ist im Folgenden aufgeführt:

Transferpuffer

Tris	5,8 g/l	Methanol	200 ml
Glycin	2,9 g/l	SDS	0,38 % (w/v)

Für den Western-Blot wurde das Polyacrylamidgel nach dem Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE für ca. 10 - 20 min im Transferpuffer äquilibiert. In der Zwischenzeit wurden vier Stücke Whatman-Papier sowie ein Stück Nitrocellulose-Membran in der entsprechenden Größe des Polyacrylamidgels zurechtgeschnitten und ebenfalls mit dem Transferpuffer getränkt. Um einen gleichmäßigen Stromfluss und somit einen optimalen Blotvorgang zu gewährleisten, wurde die Apparatur luftblasenfrei wie folgt aufgebaut:



Anschließend wurden die Proteine ca. 2 h bei einer angelegten Stromstärke von 0,8 mA/cm^2 auf die Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran für mindestens 2 h, zumeist aber ÜN, in 1 % Blockingreagenz (in 1 x PBS) oder in 10 % Magermilch (in 1 x PBS) abgesättigt.

Immunologischer Nachweis von Proteinen

Für den immunologischen Nachweis der aufgereinigten HisTag-Fusionsprotein wurden folgende Lösungen eingesetzt:

1 x PBS		**1 x PBST**	
NaH_2PO_4	1,43 g/l	PBS	
NaCl	5,84 g/l	Tween 20	0,03 %
Na_2HPO_4	12,50 g/l		

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte fanden unter ständiger Bewegung der Membran auf dem Wiegeschüttler statt.

Die mit Blocking-Reagenz bzw. Magermilch abgesättigte Membran wurde für 3 x 5 min mit PBS gewaschen und für 1 h mit einem in PBS verdünnten Erst-Antikörper inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch 3 x 5-minütiges Waschen mit PBS entfernt und die Membran für eine weitere Stunde mit Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörper inkubiert (1:100000 verd. in 1 % Blockingreagenz). Anschließend wurde die Membran sukzessiv 3 x 5 min mit PBS, 3 x 5 min mit PBST und 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Detektion des Protein-Antikörper-Komplexes erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits nach Angaben des Herstellers. Der

genannte Kit enthält Luminol, welches durch die Peroxidase unter Lichtemission zu 3-Aminophtalat oxidiert wird. Das emittierte Licht wurde als Schwärzung auf einem Röntgenfilm detektiert. Hierzu wurde die Nitrocellulosemembran zwischen zwei Kopierfolien bzw. Frischhaltefolien gelegt, der Film in der Dunkelkammer exponiert und anschließend entwickelt.

Zum Test von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden vor der Zugabe des Erst-Anitkörpers etwa 200 µg des in 1 x PBS gelösten, zu testenden Proteins zum entsprechenden Ansatz gegeben und 1 h leicht schüttelnd inkubiert. Die Detektion des gebundenen Proteins erfolgte mittels spezifischer Antikörper gemäß dem oben beschriebenen Verfahren.

MALDI-TOF

Um in einem komplexen Gemisch spezifische Proteine zu identifizieren, wurde das Gemisch zunächst über SDS-PAGE aufgetrennt, gewünschte Geldbanden nach Coomassie-Färbung mit einem Skalpell ausgeschnitten und einer Analyse mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer unterzogen. Diese Analyse wurde am Forschungszentrum Jülich von Herrn Dr. Steffen Schaffer durchgeführt. Unter “matrix-assisted laser-desorption ionization“ (MALDI) versteht man die Bestrahlung von einer in einer Matrix (z.B. UV-absorbierende kristalline Substanz) eingebetteten Probe durch einen UV- oder Infrarot-Laser-Puls im Hochvakuum. Zur Bestimmung unbekannter Proteine werden diese gewöhnlich tryptisch verdaut und in die Matrix eingebettet. Durch den Laser Puls werden explosionsartig Teile der Matrix, zusammen mit den eingebauten, positiv geladen Peptidionen freigesetzt, die dann in einem starken elektrischen Feld beschleunigt werden und schließlich nach einer bestimmt Flugstrecke auf einen Detektor treffen. Die Dauer der Flugzeit eines Ions bis zum Auftreffen auf den Detektor ist abhängig von seiner Masse. Zur Identifizierung des unbekannten Proteins, werden die Flugzeiten gemessen (“time of flight“ (TOF)) und die somit indirekt erhaltenen Massen der Peptidfragmente mit einer Datenbank verglichen.

19.5. Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Herstellung von Fusionsproteinen

Zur Herstellung rekombinanter Hexahistidyl-tragender Fusionsproteine in *E. coli* wurden die *E. coli*-Stämme BL21, BL21 Star bzw. ER2566 verwendet, die chromosomal das Gen für eine

T7-DNA-Polymerase tragen, das unter transkriptioneller Kontrolle des *lac*-Repressors steht. Durch die Gabe von IPTG wird die T7-DNA-Polymerase in diesen *E. coli*-Stämmen gebildet, welche ihrerseits die Expression von Genen erlaubt, die unter transkriptioneller Kontrolle eines T7-Promotors stehen.

Zur Produktion der in dieser Arbeit konstruierten Fusionsproteine in *E. coli* wurden 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit 5 ml einer ÜN inkubierten Kultur des rekombinanten *E. coli*-Stammes angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C auf dem Schüttler bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von ca. 0,6 gezüchtet. Durch Zugabe von 250 µl einer 1 M IPTG-Lösung wurde die Bildung des Fusionsproteins induziert. Nach 3 - 4 h Inkubation wurde die Kultur für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Pelletierung der Bakterien durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5000 rpm. Nach Waschen des Pellets in 5 ml Lysispuffer und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 5 ml Lysispuffer aufgenommen. Bis zum Zellaufschluss wurde diese Suspension bei –20 °C gelagert.

Der Zusammensetzung des verwendeten Lysispuffers ist im Folgenden aufgeführt:

Lysispuffer (Puffer A)

NaH_2PO_4	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
pH 8,0	

Aufreinigung von Fusionsproteinen

Die Aufreinigung der Hexahistidyl-tragenden Fusionsproteine erfolgte über eine Säule, die zuvor mit 2 ml einer Ni^{2+}-NTA-Lösung beladen worden war. Ni^{2+} kann mit dem Imidazol-Ring des Histidins einen Komplex ausbilden. Histidin-tragende Proteine werden somit an die Ni^{2+}-Agarose gebunden. Die Stärke der Bindung ist von der Anzahl an Histidinen abhängig. Daher ist die Bindung eines Hexahistidyl-Fusionsproteins so stark, daß es durch die Zugabe des Waschpuffers nicht bzw. nur in geringer Menge von der Ni^{2+}-NTA-Säule eluiert wird. Die anderen Proteine des Zellextrakts werden hingegen durch den Waschpuffer entfernt. Auf diese Weise kann das Fusionsprotein von anderen Proteinen des Zellextrakts getrennt werden.

Zur Aufreinigung eines HisTag-Fusionsproteins wurden folgende Lösungen benötigt:

Waschpuffer (Puffer B)		**Elutionspuffer (Puffer C)**	
NaH_2PO_4	50 mM	NaH_2PO_4	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM	Imidazol	250 mM
pH 8,0		pH 8,0	

Zur Isolierung des Fusionsproteins aus dem *E. coli* Stamm BL21 wurden die Zellen nach IPTG-Induktion mittels einer French®-Pressure Cell bei 12,5 MPa mechanisch aufgeschlossen. Um einen vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten, wurde der Aufschlussvorgang vier mal wiederholt. Das Zellextrakt wurde anschließend für 15 min bei 4 °C und 5000 rpm sedimentiert und das Pellet verworfen. Da Ni^{2+}-NTA in 20 % EtOH aufbewahrt wurde, erfolgte zunächst eine Äquilibrierung der Säule durch dreimaliges Waschen mit 10 ml Waschpuffer. Das gewonnene Zellextrakt wurde nun auf die Säule gegeben und der Ansatz für 5 min bei 4 °C inkubiert. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule insgesamt 6 x mit je 10 ml Waschpuffer gespült. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mittels 4 ml Elutionspuffer, der aufgrund der hohen Imidazolkonzentration das Protein von dem Säulenmaterial verdrängen kann. Das Eluat wurde anschließend in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen und das Imidazol im Eluat über eine Dialyse gegen 1 x PBS oder 1 x Bandshiftpuffer entfernt.

19.6. Dialyse mit dem Dialyseschlauch

Das Prinzip der Dialyse besteht in der Diffusion der zu dialysierenden Flüssigkeit durch eine semipermeable Membran. Die gesamte Proteinlösung wurde in einen Dialyseschlauch mit 16 mm Durchmesser und einer Ausschlussgröße von 12 kDa bzw. 3,5 kDa gegeben, dieser mit Klemmen verschlossen und in einem Bechergefäß mit 1 l 1 x PBS oder 1 x Bandshiftpuffer befestigt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 12 h bei 4 °C, unter ständigem Rühren, war die Proteinlösung dialysiert und konnte in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden.

19.7. Ankonzentrierung von Proteinen über Polyethylen-Glycol 20.000

Um gelöste Proteine anzukonzentrieren, wurde die proteinhaltige Probe in einen Dialyseschlauch gefüllt und in eine Schale mit kristallinem Polyethylen-Glycol (PEG 20000) gelegt. Das stark hygroskopische PEG entzieht der Proteinlösung Wasser. War das Volumen im Dialyseschlauch auf die gewünschte Menge eingeengt, wurde die Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

19.8. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Mit der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) kann eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration photometrisch bei 595 nm durchgeführt werden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue 6250 von 465 nm auf 595 nm. Dieser Farbstoff reagiert hauptsächlich mit Arginin-Resten, in geringerem Umfang aber auch mit Histidin, Lysin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Durch die Zugabe von Proteinen und die dadurch resultierende Bindung von Aminosäuren an Coomassie Brilliant Blue 6250, wird die anionische Form des Farbstoffes stabilisiert, was die Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm bewirkt. Je mehr Protein vorhanden ist, umso intensiver ist die Farbverschiebung, welche bei 595 nm gemessen wird. Durch Vergleich mit einer Standard-Kalibrierreihe kann anschließend die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden.

Nachfolgend ist die Zusammensetzung des hierfür benötigten Bradford-Reagenz aufgeführt:

5 x Bradford-Reagenz

0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue 6250
4,8 % (v/v) Ethanol (96 %)
8,6 % (v/v) H_3PO_4 (86 %)

Vor der Proteinbestimmung wurde zunächst eine Kalibriergerade mit BSA (Bovine Serum Albumin; Stammlösung: 100 µg/ml) im Bereich von 0 – 20 µg/ml erstellt. Hierbei wurden 800 µl geeigneter Verdünnungen der BSA-Stammlösung mit 200 µl 5 x Bradford-Reagenz gut gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde anschließend bei 595 nm bestimmt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zellextrakten wurden verschiedene Verdünnungen der Extrakte in einem Gesamtvolumen von 800 µl erstellt und nach Zugabe von 200 µl 5 x Bradford-Reagenz ebenfalls für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde bei 595 nm die Extinktion bestimmt. Die Proteinkonzentration der zu bestimmenden Probe ließ sich anhand der Kalibriergeraden unter Einberechnung der Verdünnungsfaktoren ermitteln.

19.9. Herstellung polyklonaler Antikörper

Um Proteine spezifisch nachweisen zu können, wurden in Mäusen Antikörper gegen diese Proteine hergestellt. Zur Herstellung dieser spezifischen Antikörper wurde das aufgereinigte

Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach dem Blot-Vorgang wurde die Membran mit Ponceau S (0,5 % Ponceau S, 1 % Essigsäure) angefärbt und durch mehrfaches Waschen mit Wasser solange entfärbt, bis die entsprechenden Proteinbanden sichtbar wurden. Die Banden wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten, wobei je drei Nitrocellulose-Streifen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäßt vereinigt und in 200 µl DMSO gelöst wurden. Je Maus wurden 200 µl der proteinhaltigen DMSO-Lösung subkutan injiziert. DMSO erlaubt bei subcutaner Injektion eine langsame und begrenzte Diffusion des Antigens in den Blutkreislauf, was die Immunreaktion verstärkt. In einem Zeitabstand von etwa vier Wochen erfolgte eine Nachimmunisierung ("Boosten"), bei der den Mäusen erneut 200 µl der Protein-DMSO-Lösung injiziert wurde. Nach weiteren vier Wochen wurden die Mäuse geopfert und deren Blutseren gewonnen. Die Antikörper der Seren wurden im Western Blot anschließend auf ihre Bindungseigenschaften untersucht.

19.10. Proteinelution aus SDS-Polyacrylamid-Gelen

Um einzelne Proteine aus einem Proteingemisch aufzureinigen, wurden die jeweiligen Proben zuerst über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, mittels Coomassie-Färbung angefärbt und die zu reinigenden Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten. Diese Gelstücke wurden entweder bei –20 °C eingefroren oder gleich mit dem Electro-Eluter 422 der Firma Biorad aufgereinigt. Das Gerät wurde nach Herstellerangaben aufgebaut und der nötige Elutionspuffer hergestellt. Die Proteinelution erfolgte bei 10 mA je Probe für 3 – 5 h bei RT. Die eluierten Proteine wurden, falls nötig, mittels Amiconsäulen ankonzentriert und anschließend bei – 20 °C gelagert. Im Folgenden ist die Zusammensetzung des verwendeten Elutionspuffers aufgeführt.

Elutionspuffer

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %

19.11. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay)

Mit Hilfe des ELISA können Protein-Protein-Interaktionen detektiert und quantifiziert werden. Erstmals wurde dieser Assay von Engvall und Perlman im Jahr 1971 beschrieben. Zur

Durchführung werden Proteine auf einer 96-Well-Platte immobilisiert und unter Zugabe aufsteigender Mengen des zu untersuchenden Proteins, die Bindung an dieses bestimmt.
Die für die Durchführung benötigten Lösungen sind im Folgenden aufgelistet:

1 x PBS			**1 x PBST**	
NaH_2PO_4	1,82	g/l	PBS	
NaCl	5,84	g/l	Tween 20	0,05 %
Na_2HPO_4	12,50	g/l		

Zunächst wurde eine 96-Well-Platte mit humanem Keratin (2 µg/Well) beschichtet und ÜN bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells 3 x mit 1 x PBS gewaschen und jeweils gründlich ausgeklopft. Anschließend wurden die Wells zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 300 µl 10 % BSA (w/v in PBS) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte die Zugabe aufsteigender Mengen des zu untersuchenden Proteins. Die notwendigen Proteinverdünnungen wurden dabei in 1 x PBS in einem Gesamtvolumen von 200 µl hergestellt. Nach Zugabe des Proteins in die jeweiligen Wells, erfolgte eine Inkubation für 1 h bei RT. Im Anschluss wurde die Platte erneut dreimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend 200 µl Erstantikörper (Anti-HisTag-Antikörper, 1:250 in 1 x PBS) zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde dreimal mit 1 x PBS gewaschen und 200 µl des zweiten Antikörpers (Anti-Maus-Fab-Fragment, 1:10000 in 1 x PBS) in die jeweiligen Wells pipettiert. Erneut wurden die Ansätze für 1 h bei RT inkubiert und im Anschluss dreimal mit 1 x PBS gewaschen.

Die Detektion der Protein-Protein-Interaktion erfolgte über eine enzymatische Farbreaktion, wobei die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase das farblose Substrat 3,3´,5,5´-Tetra-Methylbenzidine (TMB) zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Pro Well wurden 100 µl TMB zu dem jeweiligen Ansatz pipettiert und die Blaufärbung abgewartet. Nach Erreichen einer ausreichend starken Blaufärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 2 M H_2SO_4 gestoppt und die Ansätze bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen

19.12. Gelfiltration

Die Methode der Gelfiltration dient zur Reinigung und Trennung von Proteinen und ist eine besondere Methode der Chromatographie, bei der die stationäre Phase aus gequollenen

Gelkörnern besteht und die Trennung nach der Teilchengröße erfolgt. Große Teilchen wandern mit der Flüssigkeit zwischen den Gelkörnern hindurch, kleine Teilchen werden in den Poren zurückgehalten und erscheinen zuletzt im Eluat. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, die native molare Masse des Regulatorproteins RovS aus *S. agalactiae* 6313 zu bestimmen.

Gelfiltrationsexperimente wurden mit einer Pharmacia©-Säule (Länge = 60 cm; Æ =1,6 cm) durchgeführt, die mit Superdex-200 prepgrade gefüllt und mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,2, 150 mM NaCl äquilibriert worden war. Die Laufgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, wobei letztendlich Fraktionen eines Volumens von 1 ml mit einem Fraktionssammler gesammelt wurden. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm und 219 nm gemessen und somit ein Elutionsprofil erstellt. Mit Aliquots der einzelnen Fraktionen war es anschliessend möglich, DotBlot Experimente mit Anti-HisTag-Antikörpern durchzuführen, um das Regulatorprotein in einzelnen Fraktionen eindeutig nachzuweisen.

Um die molare Masse des zu untersuchenden Proteins in ausgewählten Fraktionen bestimmen zu können, wurde eine Kalibriergerade unter den bereits oben genannten Versuchsbedingungen erstellt. Dazu wurden Proteine mit bekannter molarer Masse auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und deren das Elutionsprofil bestimmt. Dabei ergab sich für jedes Protein ein spezifischer K_{av}-Wert. Dieser berücksichtigt das Säulengesamtvolumen von 120 ml, das Säulentodvolumen von 40 ml und das Elutionsvolumen der geladenen Proben. Zusätzlich ist dieser Wert unabhängig von der Konzentration der geladenen Probe und vom Packungsmaterial der verwendeten Säule. Aus der molaren Masse der gewählten Proteine und deren K_{av}-Wert wurde eine Kalibriergerade erstellt, über dessen Geradengleichung die molare Masse des RovS-Regulatorproteins bestimmt werden konnte.

20. Analyse von Protein-DNA-Interaktionen

20.1. Gelretadationsexperimente (modifiziert nach Lucht *et al*, 1994)

Die sequenzspezifische Bindung von Proteinen an doppelsträngige DNA kann mit verschiedenen Techniken untersucht werden. Eine der einfachsten Methoden ist der sogenannte Bandshift-Assay, der auch *"electrophoretic mobility shift assay"* (EMSA), Gelshift-Assay oder *"gel retardations assay"* genannt wird (Neurath *et al*, 1997). Die Methode beruht auf der Beobachtung, daß DNA-Moleküle in einer Gelelektrophorese langsamer wandern, wenn ein

Protein oder ein Proteinkomplex an sie gebunden hat. Proteinfreie DNA-Moleküle werden nach einem Ethidiumbromidbad durch UV-Licht als Bande auf einer ihrer Länge entsprechenden Höhe sichtbar. Bindet ein zu untersuchendes Protein an eine DNA-Sonde, so ist nach Agarosegelelektrophorese, aufgrund der langsameren Wanderungsgeschwindigkeit des DNA-Protein-Komplexes, im Gel eine Bande an höherer Position als die reine DNA-Bande zu sehen, daher die Bezeichnung "*shift*".

Zur Durchführung des Gelretardationsexperiments wurden folgende Lösungen verwendet:

10 x Bindungs-Puffer		**5 x TBE**	
Tris HCl pH 7,5	100 mM	Tris	54 g/l
EDTA	10 mM	Borsäure	27,5 g/l
DTT	50 mM	EDTA (0,5 M)	20 ml/l
Glycerin	50 %		
NaCl	100 mM		
$MgCl_2$	10 mM		

Zur Durchführung des Gelretardationsexperiments wurden die jeweiligen DNA-Sonden über PCR amplifiziert und die erhaltenen PCR-Fragmente mit Hilfe des Nucleospin-Kits aufgereinigt. Das zu testende Protein wurde zweimal gegen Bindungspuffer dialysiert und dessen Protein-Konzentration mittels des Bradford-Assays bestimmt. Die gewünschten Proteinverdünnungen wurden mit 1 x Bindungspuffer hergestellt. Im Folgenden ist die Zusammensetzung des Versuchansatzes aufgeführt:

2 µl PCR-Fragment (ca. 0,1 µg)
x µl Protein der jeweiligen Verdünnung (0 µg – 1 µg)
2 µl 10 x Bindungspuffer
0,5 µl poly(dI-dC) (2 µg/µl)
mit deionisiertem Wasser auf 20 µl auffüllen

Der jeweilige Ansatz wurde 1 h bei RT inkubiert und die Proben anschließend komplett auf ein natives Polyacrylamid-Gel geladen.

Die verwendeten nativen Gele wurden in einem Minigelsystem der Firma Owl hergestellt. Die Zusammensetzung eines 5 %-igen Polyacrylamid-Gels ist folgender Tabelle zu entnehmen:

	Natives Polyacrylamid-Gel (5 %)
A. bidest	7,75 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (38:2)	1,25 ml
5 x TBE	1 ml
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	66 µl
TEMED	16 µl

Die Gelkammer wurde nach Herstellerangaben zusammengebaut und das Gel zwischen die Gelplatten gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit 0,5 x TBE-Laufpuffer aufgefüllt. Der Kamm wurde gezogen und Luftblasen unterhalb der Glasplatten durch eine Spritze entfernt. Die Proben wurden ohne Probenpuffer mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen gefüllt. Der Lauf erfolgte bei 13 mA für 30 – 90 min, je nach Größe der zu testenden DNA-Sonde. Anschließend wurde das Gel auf einer Glasplatte im Ethidiumbromid-Bad auf einer Schaufel liegend gefärbt. Mit der Gelseite nach unten wurde die Glasplatte nach dem Färbebad vom Gel gelöst. Die DNA-Banden bzw. die DNA/Protein-Komplexe wurden durch UV-Licht (λ = 312 nm), bei der das an die DNA angelagerte Ethidiumbromid fluoresziert, sichtbar gemacht und mittels einer Fotodokumentationsanlage fotografiert.

Zur Eingrenzung des RovS-Bindemotivs im *fbsA*-Promotorbereich wurden neben PCR-Produkten auch Oligonukleotide (MWG Biotech GmbH, Ebersberg) verwendet. Dazu wurden je 1 nmol zueinander komplementärer Oligonukleotide 1:2 miteinander vermischt, der Ansatz 5 min bei 95 °C aufgekocht und ÜN langsam auf RT heruntergekühlt. Ein Aliquot dieses Ansatzes wurde 1:5 mit A. bidest verdünnt und davon 1 µl (entspricht 20 pmol) in den Gelretardationsassay eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT wurden die Ansätze ohne Ladepuffer vollständig auf ein 2 %-iges Agarosegel geladen, welches im Anschluss mit Ethidiumbromid gefärbt und in der Fotodokumentationsanlage fotografiert wurde.

21. Bestimmung der ß-Galactosidase-Aktivität (modifiziert nach Miller, 1992)

Das Enzym ß-Galactosidase katalysiert nicht nur die Hydrolyse verschiedener physiologisch bedeutsamer ß-Galactoside wie Lactose, sondern es kann auch nicht-physiologische Substrate umsetzen. Die Hydrolyse nicht-physiologischer Substrate nutzt man, um *in vitro* die Menge der ß-Galactosidase über die Enzymaktivität zu bestimmen. Die colorimetrische Nachweistechnik beruht auf der Umsetzung von *o*-Nitrophenyl-*ß*-D-galactosid (oNPG), welches in wäßrigen Lösungen farblos ist. Die ß-Galactosidase hydrolysiert oNPG zu Galactose und o-Nitrophenol, welches eine gelbe Farbe aufweist. Das Absorptionsspektrum von o-Nitrophenol liegt bei alkalischem pH bei 420 nm. Wenn oNPG im Überschuß in der Reaktion vorliegt, ist die Menge des gebildeten Nitrophenolats proportional zur Enzymmenge im Ansatz (Mülhardt, 2002).

Im Folgenden sind die für die Durchführung der ß-Galactosidase-Messung notwendigen Lösungen aufgeführt:

Z-Puffer

Na_2HPO_4	60 mM
NaH_2PO_4	40 mM
KCl	10 mM
$MgSO_4$	1 mM

⇨ 0,2 g Mercaptoethanol auf 50 ml Z-Puffer (frisch dazugeben)

Na_2CO_3-Lösung

Na_2CO_3	1 M

oNPG-Lösung

4 mg/ml Z-Puffer

Permeabilitäts-Puffer

Ethanol	90 %
Toluol	10 %

Zur Durchführung der ß-Galactosidase-Messung wurden 500 µl ÜN-Kultur der zu testenden *S. agalactiae*-Stämme in je 50 ml frisches THY-Medium überimpft und schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Von diesen Hauptkulturen wurde im Abstand von 30 min 1 ml Probe entnommen, die optische Dichte (OD_{600}) der Kultur bestimmt und je 1 ml bis zur Durchführung der ß-Galactosidase-Messung bei –20 °C aufbewahrt.

Zur Durchführung der Messung wurden die jeweiligen Proben auf Eis langsam aufgetaut. Anschließend wurden 50 - 100 µl Kultur mit Z-Puffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt, nach Zugabe von 50 µl Permeabilitäts-Puffer 10 s stark gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Durch

Zugabe von 200 µl oNPG-Lösung wurde die Reaktion gestartet und bei leichter Gelbfärbung durch Zugabe von 500 µl Na_2CO_3-Lösung wieder gestoppt. Dabei wurde die Reaktionszeit auf die Sekunde genau notiert. Der Ansatz wurde nun für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und anschließend die Extinktion (OD_{420}) des Überstands bei 420 nm gemessen. Der gemessene Wert sollte dabei zwischen 0,6 und 1,0 liegen.

Zur Berechnung der Enzymaktivität [Miller Units] wurde folgende Formel verwendet:

$$A = \frac{1000 \times OD_{420}}{t \times V \times OD_{600}}$$

A = Aktivität [Miller Units]
OD_{420} = Extinktion des Überstand bei 420 nm
t = Reaktionszeit [min]
V = Ursprüngliches Volumen der eingesetzten Probe [ml]
OD_{600} = Optische Dichte der Kultur bei 600 nm

22. Hämolyseassay

Die Freisetzung von Hämoglobin aus Schaferythrozyten wurde verwendet, um die hämolytische Aktivität von *S. agalactiae* 6313 und der entsprechenden *rovS*-Deletionsmutante zu vergleichen. Im Folgenden sind die dafür notwendigen Lösungen und der entsprechende Versuchsablauf aufgeführt.

PBS – Dulbecco (Gibco)

KCl	200 mg/l
KH_2PO_4	200 mg/l
NaCl	8 g/l
Na_2HPO_4	1,15 g/l
CaCl	100 mg/l
$MgCl_2$ * 6 H_2O	100 mg/l

Hämolysinextraktpuffer

Glucose	10 g/l
Lösliche Stärke	10 g/l
Tween 80	30 ml/l

In PBS-Dulbecco aufkochen

MTHB-Stärke-Medium

THB-Fertigmedium	36 g/l
Peptosepepton No3	10 g/l
Lösliche Stärke	20 g/l

Schafblut (defibriniert, Oxoid)

Vorbereitung der Bakterienstämme

Eine ÜN-Kultur des zu untersuchenden *S. agalactiae* Stammes wurde in THY-Medium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 500 ml MTHB-Stärke-Medium 1:50 mit der jeweiligen ÜN-Kultur beimpft. Im Abstand von 30 min wurden von jeder Kultur 15 ml abgenommen, bei 5000 rpm 4 °C abzentrifugiert und das Pellet 1 x mit Zellkultur-PBS gewaschen. Zusätzlich wurde zu jedem Zeitpunkt von jeder Kultur die optische Dichte bei 600 nm gemessen, um das Wachstum der einzelnen Stämme zu beobachten. Es wurde so lange fortgefahren, bis jede Kultur die stationäre Wachstumsphase erreicht hat.

Herstellung einer Erythrozytensuspension

Zur Durchführung des Hämolyseassays wurde eine Erythrozytensuspension 1:50 in Zellkultur-PBS hergestellt. Dazu wurde das verwendete Schafsblut zuerst so lange mit Zellkultur-PBS gewaschen, bis der Überstand klar erschien. Dabei ist darauf zu achten, daß bei einer maximal Zentrifugationsgeschwindigkeit von 4000 rpm zentrifugiert wird.

Gewinnung des Hämolysins

Zur Gewinnung des Hämolysins wurden die über das Wachstum gesammelten Zellpellets jeweils in 600 µl Hämolysinextraktpuffer gelöst. Im Anschluss wurde jeder Ansatz 5 min schüttelnd bei

37 °C inkubiert, 1 min auf Eis abgekühlt und 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das im Überstand befindliche Hämolysin ist sehr instabil und sollte sofort in den Hämolyseassay eingesetzt werden.

Durchführung des Hämolyseassays

Zur Durchführung des Hämolyseassays wurden verschiedene Volumina des gewonnenen Hämolysins mit Zellkultur-PBS auf 500 µl Endvolumen aufgefüllt. Zu diesem Ansatz wurden 500 µl der Erythrocytensuspension pipettiert und die einzelnen Ansätze ohne Schütteln für 10 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die jeweiligen Proben für 1 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und die einzelnen Überstände in Küvetten überführt und deren Extinktion bei 540 nm (OD_{540}) gemessen.

Aus den daraus erhaltenen Werten und der Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm konnte letztendlich eine Aussage über die Hämolyse der zu testenden *S. agalactiae*-Stämme getroffen werden. Zur Bestimmung der Hämolyse wurde der Quotient OD_{540} / OD_{600} gegen die Zeit aufgetragen.

III. Ergebnisse

1. Einfluß des Regulators RovS auf die Virulenz von *S. agalactiae* 6313

1.1. Die *rovS*-codierende Region in *S. agalactiae*

Im Jahr 2002 wurden die Genomsequenzen der *S. agalactiae*-Stämme NEM316 und 2603 V/R veröffentlicht (Glaser *et al*, 2002; Tettelin *et al*, 2002). Beide Genomsequenzen weisen eine Reihe von Genen auf, die für potentielle Transkriptionsregulatoren codieren. In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen *gbs1555* funktionell charakterisiert, dessen Genprodukt große Ähnlichkeit zu Transkriptionsregulatoren der Rgg-Familie besitzt. Aufgrund der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse, wurde das Gen *gbs1555* aus *S. agalactiae* als *rovS* (**r**egulator **o**f **v**irulence in ***S****treptococcus agalactiae*) bezeichnet.

Abbildung 1 zeigt die Restriktionskarte der *rovS*-codierenden Region aus *S. agalactiae* NEM316, sowie die Struktur des daraus resultierenden RovS-Proteins.

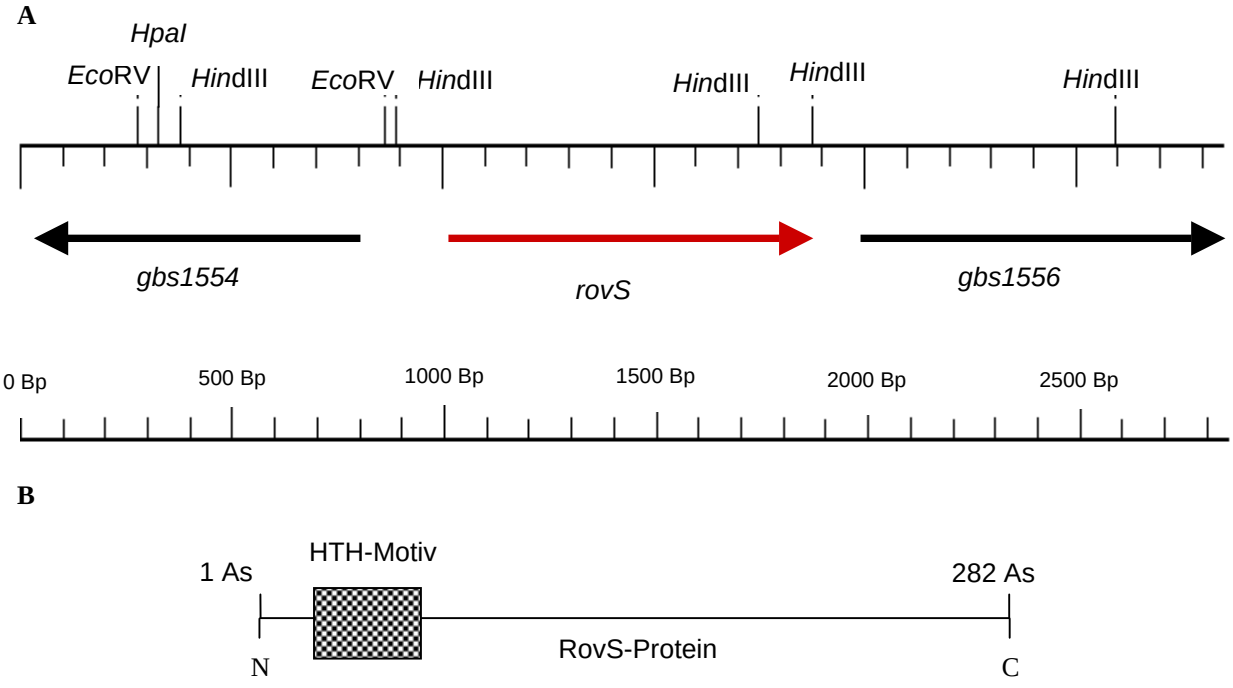


Abb. 1: (A) Restriktionskarte der *rovS*-Genregion aus *S. agalactiae* NEM316. (B) Graphische Darstellung des RovS-Proteins mit dem Helix-turn-Helix-Motiv am N-Terminus.

Das Gen *rovS* aus *S. agalactiae* 6313 besitzt eine Größe von 849 Bp und codiert für ein Protein von 282 Aminosäuren mit einer molaren Masse von 33128 Da. Am N-Terminus besitzt das RovS-Protein ein Helix-turn-Helix-Motiv von 54 Aminosäuren, bestehend aus zwei α-Helices, die über eine kurze Aminosäurekette miteinander verbunden sind. Datenbankanalysen ergaben eine 28 %ige Identität des RovS-Proteins zum Transkriptionsregulator Rgg aus *Streptococcus pyogenes* (Chaussee *et al*, 1999) und eine 25 %ige Identität zum Regulator Rgg aus *Streptococcus gordonii* (Sulavik *et al*, 1992 & 1996). Von beiden Regulatoren ist bekannt, daß sie Einfluß auf die Pathogenität der jeweiligen Bakterienart nehmen (Sulavik *et al*, 1992 & 1996; Vickermann *et al*, 2001-2003; Chaussee *et al*, 1999 & 2001-2004; Lyon *et al*, 1998; Neely *et al*, 2003). Aus diesem Grund war es Aufgabe der vorliegenden Arbeit, das *rovS*-Gen aus *S. agalactiae* 6313 funktionell zu charakterisieren und dessen Einfluß auf die Pathogenität dieser Bakterien zu untersuchen.

1.2. Bedeutung des Regulators RovS für die Virulenz von *S. agalactiae* 6313

Herstellung und Nachweis einer *rovS*-Deletionsmutante

Um den Einfluß des potentiellen Regulators RovS auf die Virulenz von *S. agalactiae* zu analysieren, wurde zunächst das *rovS*-Gen im Genom von *S. agalactiae* 6313 deletiert. Zur Herstellung des *rovS*-Deletionsplasmids wurden flankierende Bereiche des *rovS*-Gens von je ca. 500 Bp Länge mit Hilfe der Primerpaare rovS del1/2 und rovS del3/4 über PCR aus dem Genom von *S. agalactiae* 6313 amplifiziert. Da die Primer rovS del2 und rovS del3 insgesamt 21 komplementäre Basen zueinander aufweisen, ergab sich für die entstandenen PCR-Produkte ein identischer Bereich entsprechender Länge. Dies erlaubte es, die beiden PCR-Produkte als Matrize, unter Verwendung der Primer rovS del1 und rovS del4, für eine Cross-over-PCR einzusetzen. Hierbei entstand ein etwa 1 kBp großes Fragment, das die beiden flankierenden Bereiche des *rovS*-Gens enthielt und als Δ*rovS* bezeichnet wurde. Die Enden dieses Δ*rovS*-Fragments wurden durch die Restriktionsenzyme *Kpn*I und *Bam*HI verdaut und anschließend in den *Kpn*I / *Bam*HI-geschnittenen *E. coli* / *Streptococcus*-Shuttle-Vektor pG^{+}host6 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert und rekombinante Klone auf LB-Ampicillin-Agarplatten selektiert. Das resultierende Plasmid wurde als pGΔ*rovS* bezeichnet. In **Abbildung 2** ist die Herstellung dieses Plasmids schematisch dargestellt.

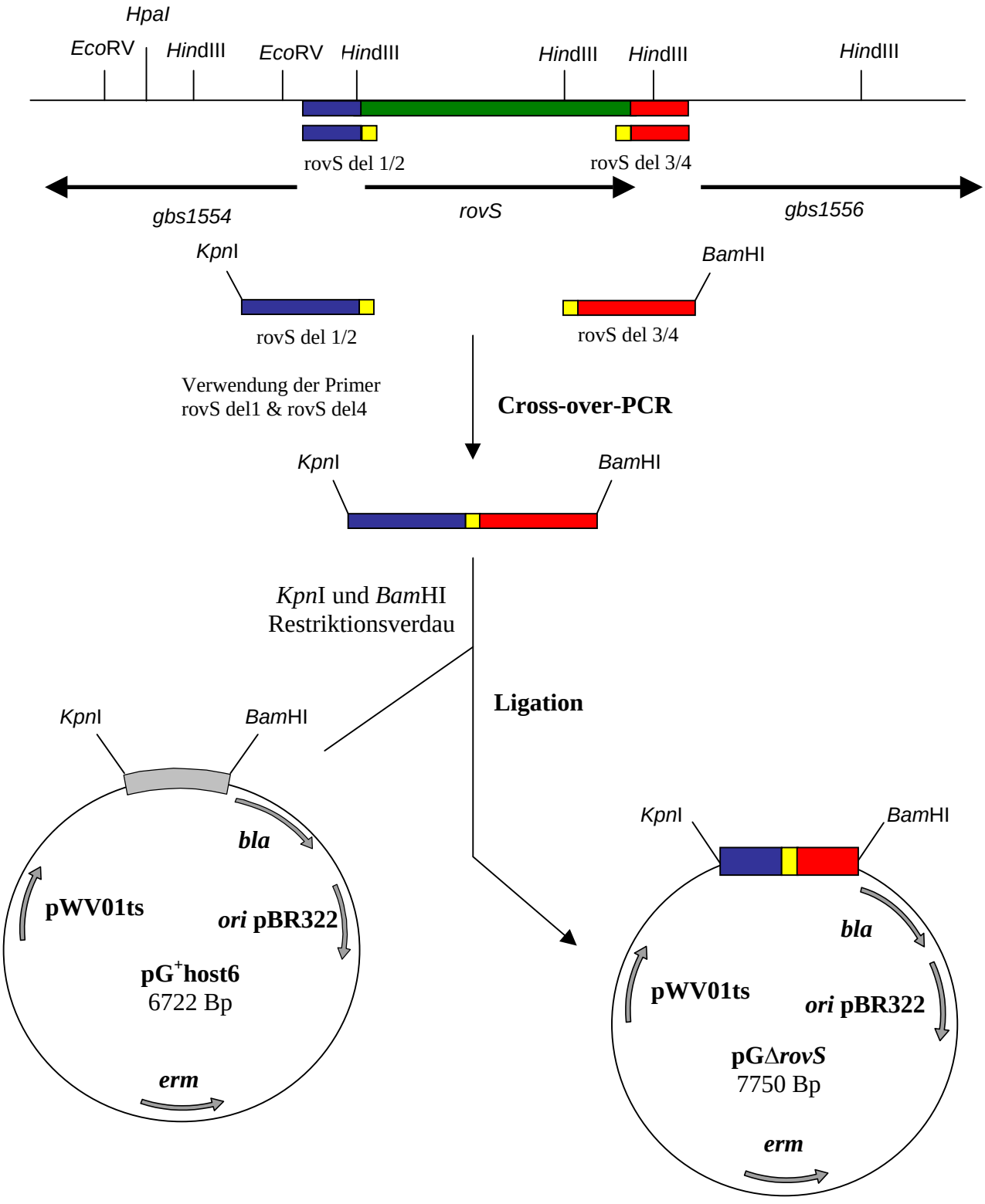


Abb. 2: Herstellung des Plasmids pGΔ*rovS* für die Konstruktion einer *rovS*-Deletionsmutante in *S. agalactiae* 6313. Die Fragmente rovS del 1/2 und rovS del 3/4 dienten als Matrize für eine nachfolgende Cross-over-PCR. Das unter Verwendung der Primer rovS del1 und rovS del4 erhaltene Cross-over-PCR-Produkt wurde nach *Kpn*I und *Bam*HI Restriktion in den entsprechend verdauten *E. coli* / *Streptococcus*-Shuttle-Vektor pG$^+$host6 ligiert.

Um das *rovS*-Gen im Genom von *S. agalactiae* zu deletieren, wurde, wie in **Abbildung 3** schematisch dargestellt, zunächst das Plasmid pGΔ*rovS* über Elektroporation in *S. agalactiae* 6313 transformiert und rekombinante *S. agalactiae* Klone auf THY-Erythromycin-Agarplatten bei 30 °C selektiert. Über eine Temperaturerhöhung auf 39 °C, bei der das temperatursensitive Plasmid pG^{+}host6 nicht replizieren kann, und einer anschließenden Selektion auf THY-Erythromycin-Agarplatten, erhielt man *S. agalactiae* Klone, die das Plasmid pGΔ*rovS* durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert hatten. Um das *rovS*-Gen in dem Genom von *S. agalactiae* zu deletieren, wurden diese Klone 7 Tage bei 30 °C inkubiert, wobei die Kulturen zweimal täglich überimpft wurden. Da das Plasmid pGΔ*rovS* aufgrund seiner Temperatursensitivität nur bei 30 °C repliziert werden kann, haben jene Bakterien einen Wachstumsvorteil, die über eine zweite homologe Rekombination das Plasmid pGΔ*rovS* wieder aus dem Genom entfernen, da zwei aktive Replikationsursprünge sich gegenseitig behindern. Anschließend wurden Verdünnungen dieser Kulturen hergestellt, auf THY-Platten ausplattiert und Einzelkolonien auf den Verlust ihrer Erythromycinresistenz überprüft. Erythromycin-sensitive Klone wurden zur Isolierung chromosomaler DNA herangezogen und mittels PCR auf die chromosomale Organisation des *rovS*-Gens analysiert. Da durch die Deletion des *rovS*-Gens ein Bereich von etwa 800 Bp im Genom von *S. agalactiae* verloren geht, waren die PCR-Produkte potentieller *rovS*-Deletionsmutanten um ca. 800 Bp kleiner, als die des *S. agalactiae* Wildtyps 6313.

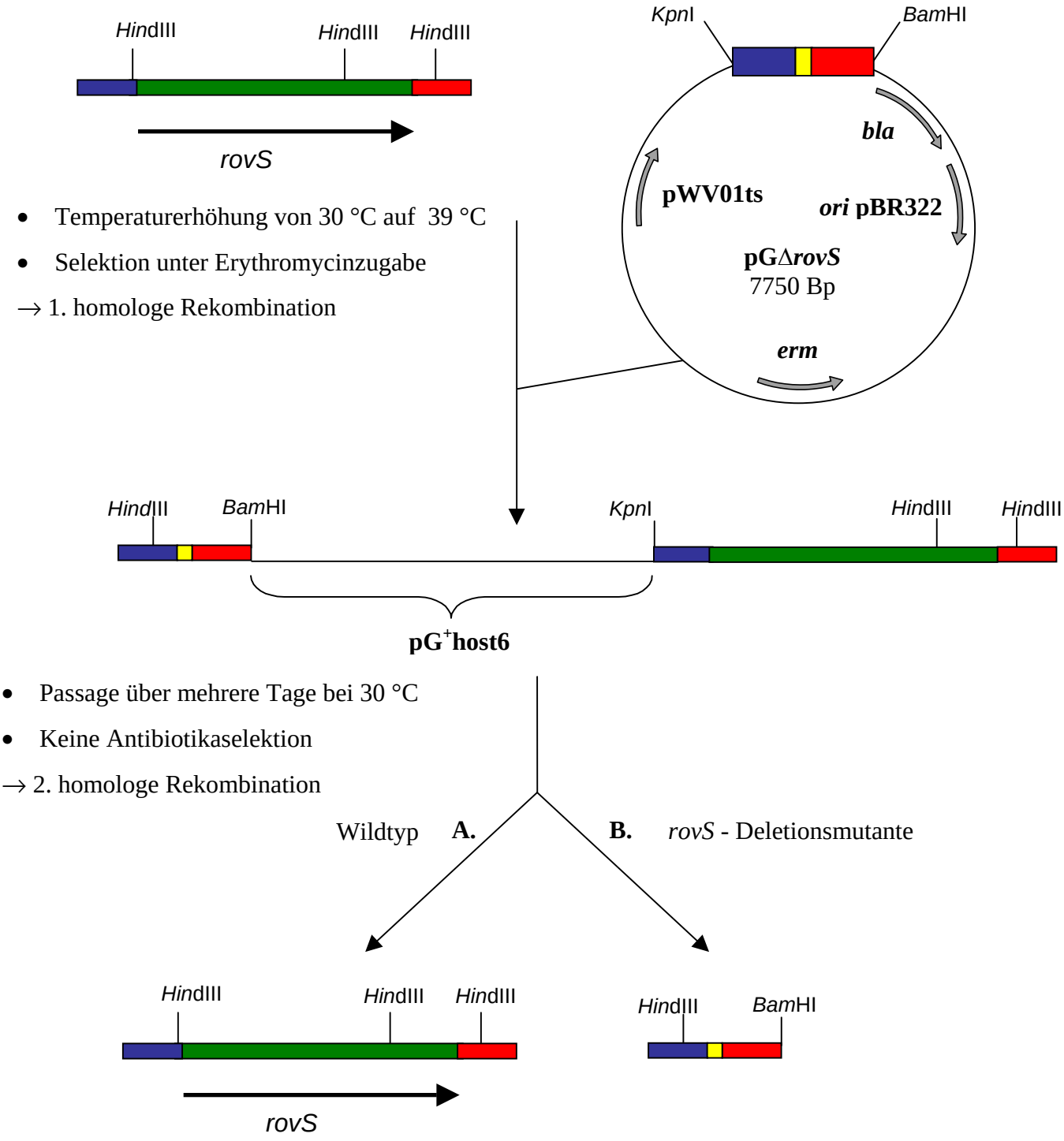


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ansatzes zur Deletion des *rovS*-Gens in *S. agalactiae* 6313. Durch eine Temperaturerhöhung auf 39 °C und anschließender Antibiotikaselektion, wurde auf Integration des Plasmids pGΔ*rovS* in das Genom von *S. agalactiae* selektiert. Nach mehrtägiger Inkubation bei 30 °C, in der die zweite Rekombination erfolgte, erhielt man Erythromycin-sensitive Klone, deren *rovS*-codierende Region die chromosomale Organisation des Wildtyps aufwies (**A**) bzw. Klone, bei denen das *rovS*-Gen deletiert worden war (**B**).

Die erfolgreiche Deletion des *rovS*-Gens in *S. agalactiae* 6313 wurde anschließend im Southern-Blot analysiert. Dazu wurde chromosomale DNA des Wildtyps und einer potentiellen *rovS*-Deletionsmutante mit dem Restriktionsenzym *Pvu*II verdaut und über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Übertragung der DNA auf eine Nitrocellulosemembran wurde diese mit einer DNA-Sonde hybridisiert, die mit den Primern rovS-SB1 und rovS-SB2 hergestellt und mit Digoxigenin markiert worden war. Die *Pvu*II-verdaute chromosomale DNA des *S. agalactiae* Wildtyps 6313 zeigte auf einem Röntgenfilm ein Signal bei etwa 4,5 kBp. Die entsprechend verdaute chromosomale DNA einer potentiellen *rovS*-Deletionsmutante lieferte hingegen ein Signal bei ca. 3,7 kBp. Da die Deletion des *rovS*-Gens zu einem Verlust von 800 Bp im Genom von *S. agalactiae* führt, belegt das Ergebnis dieses Southern-Blots, daß das *rovS*-Gen im Genom von *S. agalactiae* 6313 erfolgreich deletiert worden war. Die Mutante wurde entsprechend als 6313 Δ*rovS* bezeichnet. In **Abbildung 4** ist das Ergebnis des beschriebenen Southern Blots dargestellt.

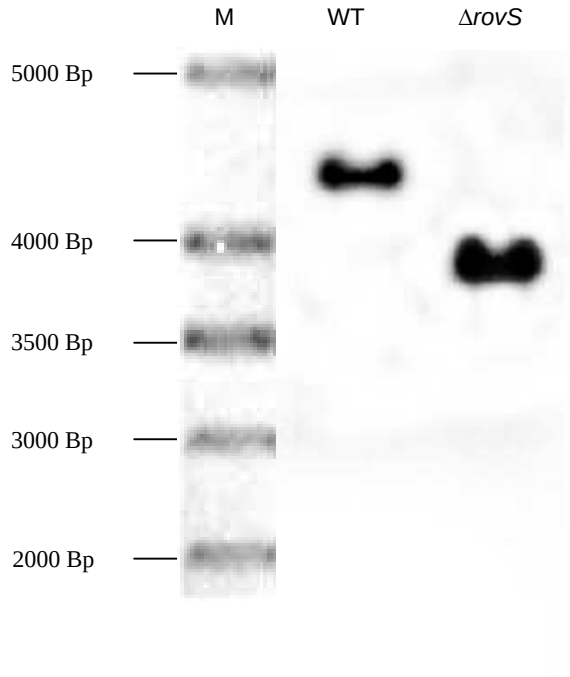


Abb. 4: Southern Hybridisierung zum Nachweis der Deletion von *rovS* im Genom von *S. agalactiae* 6313. Die chromosomale DNA wurde mit dem Enzym *Pvu*II verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Übertragung der DNA auf eine Nitrocellulosemembran wurde die DNA mit einer *rovS*-flankierenden Sonde hybridisiert. Die Detektion der gebundenen Sonde erfolgte mittels Chemilumineszenz.

Konstruktion des Komplementationsplasmids pAT*rovS*

Um die Deletion des *rovS*-Gens zu komplementieren, wurde dieses inklusive seines eigenen Promoters über PCR aus chromosomaler DNA des *S. agalactiae* Wildtyps 6313 amplifiziert. Dazu wurden die Primer rovS del1 und rovS del 4 verwendet. Das daraus resultierende PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Kpn*I und *Bam*HI geschnitten und in den entsprechend verdauten Shuttlevektor pAT19 ligiert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in den *E. coli*-Stamm DH5α wurden Plasmid-tragende Klone auf LB-Erythromycin-Agarplatten selektiert. Das resultierende Plasmid, bei dem das *rovS*-Gen unter Kontrolle seines eigenen Promoters steht, wurde als pAT*rovS* bezeichnet und ist in **Abbildung 5** dargestellt. Das Plasmid pAT*rovS* wurde in die *rovS*-Deletionsmutante transformiert, wobei hier auf THY-Erythromycin-Agarplatten selektiert wurde. Das entsprechende Ausgangsplasmid pAT19 wurde zusätzlich in den *S. agalactiae* Wildtyp 6313 und die *rovS*-Deletionsmutante transformiert, um bei späteren Untersuchungen plasmidbedingte Effekte ausschließen zu können.

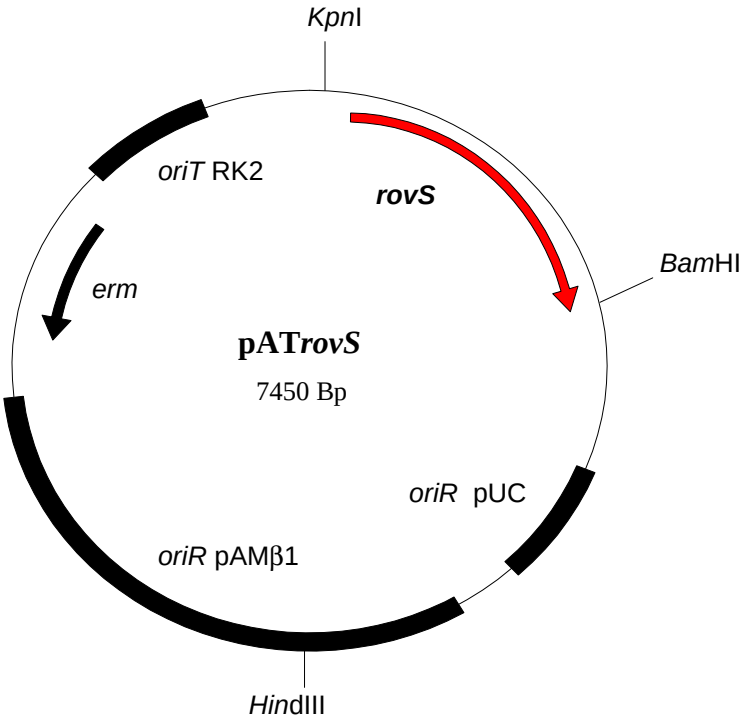


Abb. 5: Restriktionskarte des Plasmids pAT*rovS* zur Komplementation der *rovS*-Deletion in *S. agalactiae* 6313. Als Ausgangsplasmid diente der Shuttlevektor pAT19.

Bedeutung des Regulators RovS für die Bindung von *S. agalactiae* an humanes Fibrinogen

Um die Frage zu klären, ob der Regulator RovS Einfluß auf die Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen ausübt, wurden Bindungsversuche mit den *S. agalactiae*-Stämmen 6313 pAT19, Δ*rovS* pAT19 bzw. Δ*rovS* pAT*rovS* durchgeführt. Quantifiziert wurde die Bindung der mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten Bakterien an die humanen Proteine Fibrinogen und Kollagen, die in Terasakiplatten immobilisiert worden waren. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse erfolgten die Messungen in mehreren voneinander unabhängigen Versuchsreihen. Das Versuchsergebnis, das unter Verwendung von humanem Fibrinogen erzielt wurde, ist in **Abbildung 6** dargestellt. Da bereits in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß *S. agalactiae* nicht in der Lage ist, an humanes Kollagen zu binden, wurde dieses Protein in der vorliegenden Arbeit als Negativkontrolle verwendet. Entsprechend wurde auch keine Bindung der zu testenden Stämme an humanes Kollagen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Hingegen zeigten in den Bindungsversuchen 33 % der eingesetzten Zellen des *S. agalactiae* Wildtyps Bindung an humanes Fibrinogen. Von der *rovS*-Deletionsmutante wiesen 45 % der eingesetzten Zellen Bindung an Fibrinogen auf. Im Vergleich zum Ausgangsstamm besitzt die *rovS*-Deletionsmutante somit eine um 36 % erhöhte Fibrinogenbindung. Hingegen zeigten 33 % der in den Versuch eingesetzten Bakterien des Stammes Δ*rovS* pAT*rovS*, der eine plasmidvermittelte *rovS*-Expression aufweist, Bindung an immobilisiertes Fibrinogen. Dieser Wert ist identisch mit dem des *S. agalactiae*-Wildtyps. Die erhaltenen Ergebnisse deuten somit an, daß der Regulator RovS in *S. agalactiae* 6313 Einfluß auf die Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen nimmt.

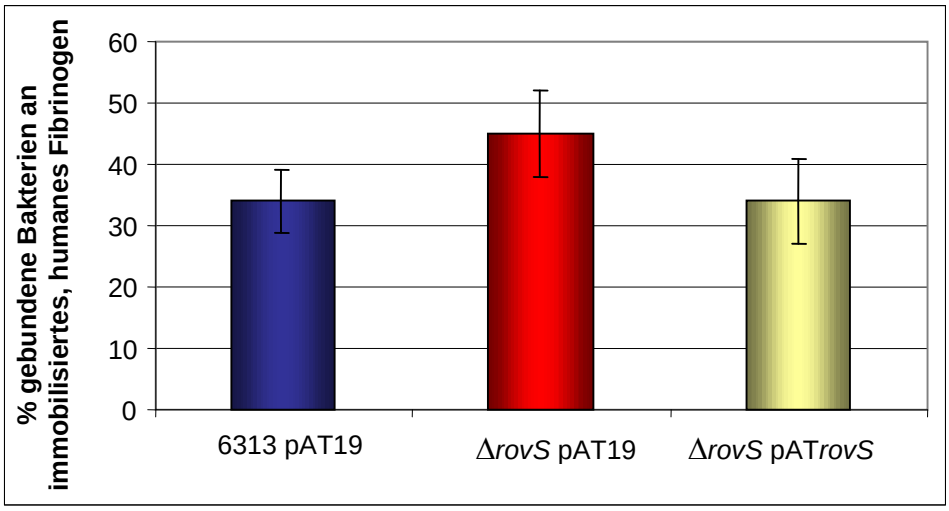


Abb. 6: Bindungsverhalten der *S. agalactiae*-Stämme 6313 pAT19, Δ*rovS* pAT19 bzw. Δ*rovS* pAT*rovS* an humanes Fibrinogen. Die Versuche wurden mit FITC-markierten Bakterien aus der stationären Wachstumsphase durchgeführt. Die Bindung der Bakterien an Fibrinogen wurde bezogen auf die Gesamtmenge an Bakterien, die in den Versuch eingesetzt wurde.

Einfluß von *rovS* auf die Adhärenz der Bakterien an und die Invasion in A549-Zellen

Die Adhärenz an und die Invasion in eukaryotische Wirtszellen stellen wichtige Schritte in der Pathogenese einer *S. agalactiae*-Infektion dar. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluß des *rovS*-Gens auf die bakterielle Adhärenz an und die Invasion in die humane Lungenepithelzelllinie A549 untersucht. Getestet wurden dabei die *S. agalactiae*-Stämme 6313 pAT19, Δ*rovS* pAT19 bzw. Δ*rovS* pAT*rovS*. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurden die entsprechenden Zellkulturexperimente in mehreren, voneinander unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Das dabei erzielte Endergebnisse ist in **Abbildung 7** dargestellt.

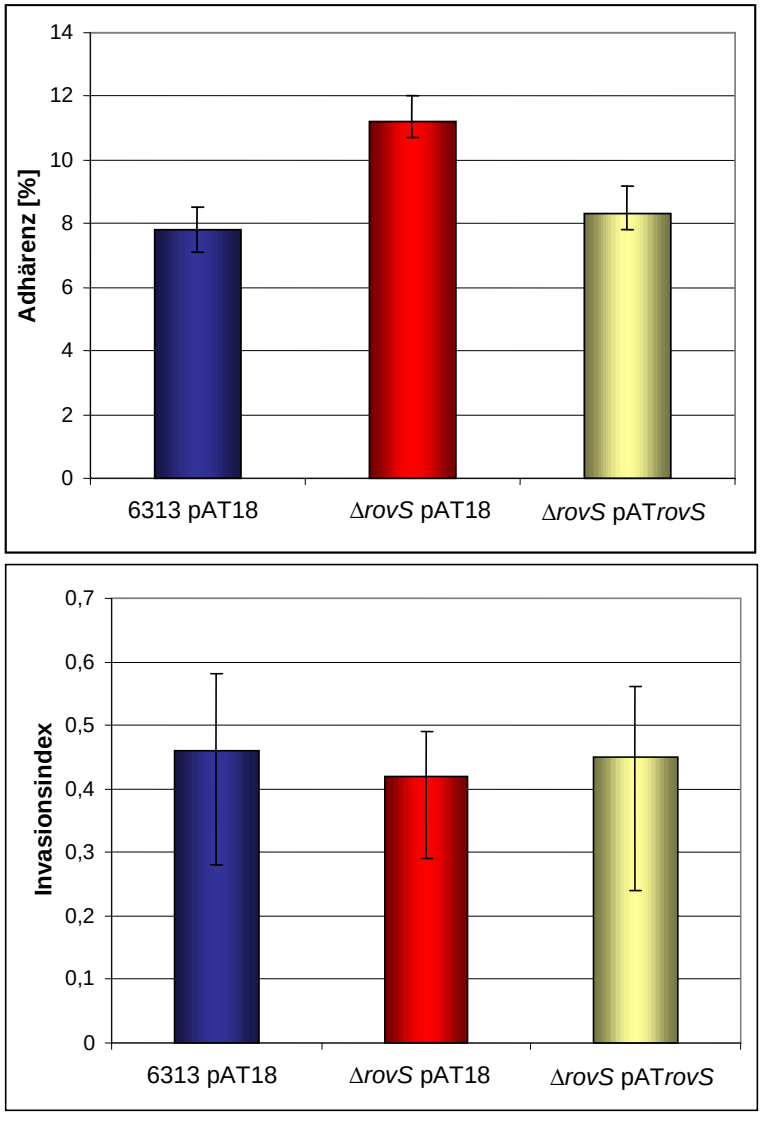


Abb. 7: Adhärenz- und Invasionsverhalten der *S. agalactiae*-Stämme 6313 pAT19, Δ*rovS* pAT19 bzw. Δ*rovS* pAT*rovS* mit der humanen Lungenepithelzelllinie A549. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Lebendzellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Wachstum in Zellkulturmedium. Der Invasionsindex stellt den Quotienten aus invasiven und adhärenten Bakterien dar.

Wie der **Abbildung 7** zu entnehmen ist, führt die Deletion des *rovS*-Gens in *S. agalactiae* 6313 zu einer um 45 % erhöhten, bakteriellen Adhärenz an A549-Zellen. Der Stamm Δ*rovS* pAT*rovS*, welcher das *rovS*-Gen plasmidcodiert trägt, zeigt hingegen das gleiche Adhärenzverhalten wie der *S. agalactiae* Wildtyp 6313. Dieses Ergebnis deutet an, daß eine Deletion des *rovS*-Gens deutlich Einfluß auf die Adhärenz von *S. agalactiae* 6313 an A549-Lungenepithelzellen nimmt und daß dieser Einfluß durch eine plasmidvermittelte Expression von *rovS* komplementiert werden kann. Geht man davon aus, daß die bakterielle Adhärenz an eukaryotische Wirtszellen häufig eine Voraussetzung für die Internalisation der Bakterien in die Zielzelle ist, zeigt der hier errechnete Invasionsindex deutlich, daß eine Deletion des *rovS*-Gens im Genom von *S. agalactiae* 6313 keinen Einfluß auf die Invasion der Bakterien ausübt.

Identifizierung RovS-regulierter Gene in *S. agalactiae* 6313

Um den Einfluß des Regulators RovS auf die Expression von bekannten und potentiellen Virulenzgenen in *S. agalactiae* zu untersuchen, wurden quantitative realtime PCR-Experimente in einem LightCycler durchgeführt. Dazu wurden die *S. agalactiae*-Stämme 6313 pAT19, Δ*rovS* pAT19 bzw. Δ*rovS* pAT*rovS* in THY-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,3 herangezogen. Im Anschluß wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA isoliert und diese mit "random hexamer" Primern in cDNA umgeschrieben. Im LightCycler wurde nun die Menge an cDNA jedes zu testenden Gens quantifiziert.

Als interner Standard zwischen den verschiedenen *S. agalactiae*-Stämmen diente das *gyrA*-Gen, welches für die GyraseA-Untereinheit codiert. Das *gyrA*-Gen wird in verschiedenen Gram-positiven Bakterien konstitutiv exprimiert (Eleaume *et al*, 2004). Daher wird es oft als Kontrollgen herangezogen, um die Expression anderer Gene auf eine konstante *gyrA*-Transkriptmenge zu beziehen. Um *gyrA* als internen Standard zur Quantifizierung von verschiedenen Transkripten zu verwenden, wurde zuerst eine Kalibriergerade mit diesem Gen erstellt. Dies wurde mit *gyrA*-spezifischen Primern und einer definierten Menge chromosomaler DNA im LightCycler durchgeführt. Die dabei erhaltene *gyrA*-Kalibriergerade ist in **Abbildung 8** dargestellt. Mit deren Hilfe war es nun möglich, anhand eines im LightCycler-Experiments erhaltenen Wendepunktes, die Menge an Transkript des zu untersuchenden Gens zu errechnen. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die Transkriptmengen der jeweiligen Gene in den zu untersuchenden *S. agalactiae*-Stämmen auf jeweils 1,3 x 10^8 Kopien *gyrA*-Transkript bezogen.

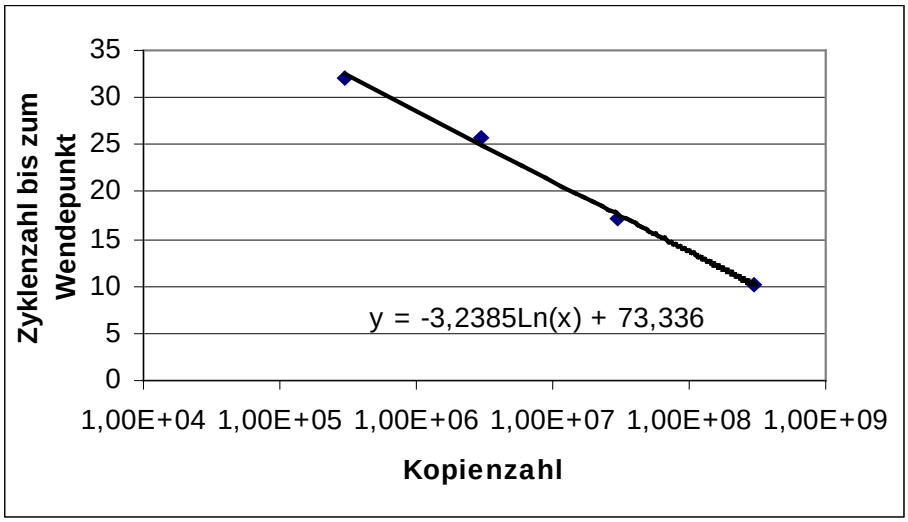


Abb. 8: Graphische Darstellung zur Bestimmung der Kopienanzahl von *gyrA* bezogen auf den Wendepunkt im LightCycler-Lauf. Die erhaltene Gerade wurde als Kalibriergerade zur Bestimmung der Transkriptmengen verschiedener Gene anhand der im LightCycler erhaltenen Wendepunkte verwendet.

In **Tabelle 3** sind die Gene bekannter bzw. potentieller Virulenzfaktoren aus *S. agalactiae* aufgelistet, die im LightCycler bezüglich ihrer Transkriptmenge in den *S. agalactiae*-Stämmen 6313 pAT19, Δ*rovS* pAT19 bzw. Δ*rovS* pAT*rovS* untersucht wurden.

Tab. 3: Auflistung der in dieser Arbeit untersuchten Gene, deren Transkriptmengen mittels LightCycler-Analysen in den *S. agalactiae*-Stämmen 6313 pAT19, Δ*rovS* pAT19 bzw. Δ*rovS* pAT*rovS* quantifiziert wurden.

Gen	**Funktion**	**Gen**	**Funktion**
cfb	CAMP-Faktor	*gbs1919*	Protein ähnlich der Neuramidase
cpsA	Regulator der Kapselpolysaccharidsynthese	*gbs2008*	Protein ähnlich der C5a-Peptidase
cylA	Gen des *cyl*-Operons	*hsh*	potentielles Adhesin
CylE	Gen des *cyl*-Operons	*hylB*	Hyaluronatlyase
cylK	Gen des *cyl*-Operons	*lmb*	Laminin-bindendes Proteins
fbsA	Fibrinogenrezeptor	*lytR*	potentieller Regulator
gbs0230	potentieller Transkriptionsregulator	*rogB*	Transkriptionsregulator RogB
gbs0850	potentielles Fibronektin bindendes Protein	*gbs1478*	potentieller Virulenzfaktor
gbs1143	potentielles Adhesin	*gbs0628*	potentieller Virulenzfaktor
gbs1263	potentielles Fibronektin bindendes Protein	*gbs0852*	potentieller Virulenzfaktor
gbs1356	potentielles Adhesin	*scp*	C5a-Peptidase
gbs1530	Transkriptionsregulator RogB2	*sodA*	Superoxiddismutase

Für die einzelnen Gene wurde ein Expressionsunterschied zwischen den verschiedenen *S. agalactiae*-Stämmen von mindestens 1,5 als signifikant betrachtet. Die Expression der meisten getesteten Gene wies jedoch keinen Unterschied zwischen den *S. agalactiae*-Stämmen 6313 pAT19, Δ*rovS* pAT19 bzw. Δ*rovS* pAT*rovS* auf (Daten nicht gezeigt).

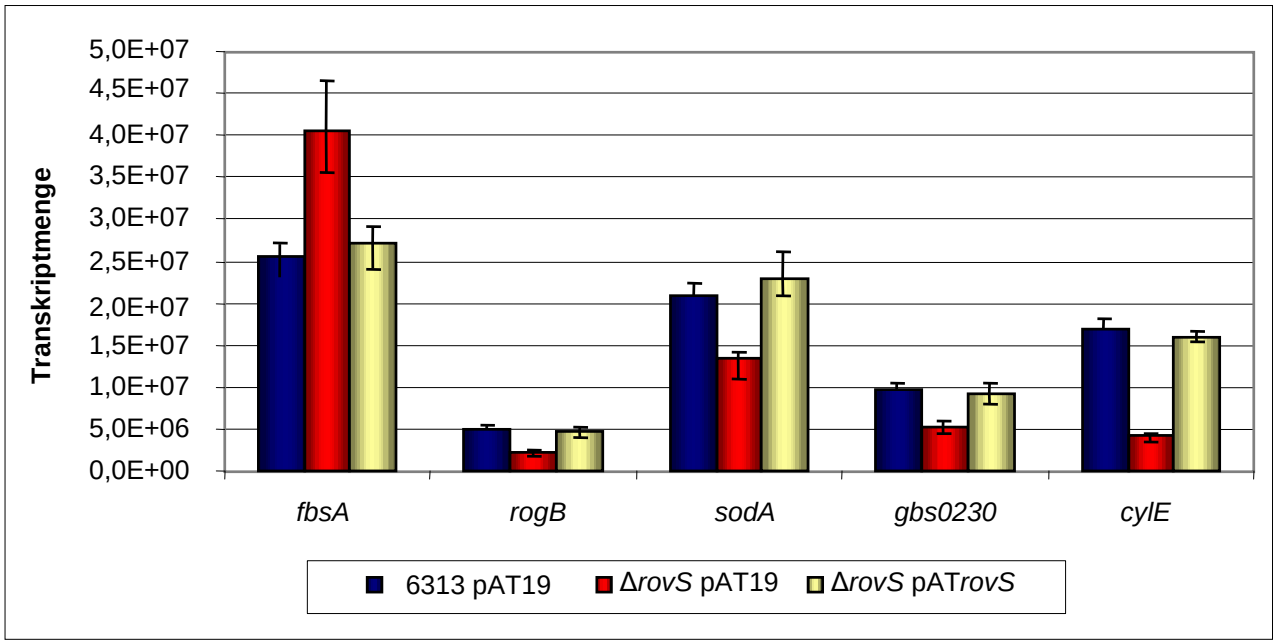


Abb. 9: Kopienanzahl der untersuchten Transkripte verschiedener bekannter und potentieller Virulenzfaktoren im *S. agalactiae* Wildtyp 6313, der *rovS*-Deletionsmutante bzw. der *rovS*-Komplementante.

Wie aus **Abbildung 9** hervorgeht, war die Transkription der Gene *rogB*, *sodA*, *gbs0230* und des *cyl*-Operons in der *rovS*-Deletionsmutante um den Faktor 2,2 ± 0,3, 1,6 ± 0,34, 1,9 ± 0,15 bzw. 4,1 ± 0,45 niedriger als im *S. agalactiae* Wildtyp. Alle getesteten *cyl*-Gene zeigten die gleiche veränderte Expression, wie das in **Abbildung 9** aufgeführte *cylE*-Gen. Die Expression des *fbsA*-Gens hingegen war in der *rovS*-Deletionsmutante im Vergleich zum Ausgangsstamm um den Faktor 1,6 ± 0,21 erhöht. In dem Stamm Δ*rovS* pAT*rovS* lag die Expression der genannten Gene auf dem Niveau des *S. agalactiae*-Wildtyps. Diese Ergebnisse deuten an, daß RovS die Expression der Gene *rogB, sodA, gbs0230* und des *cyl*-Operons stimuliert, hingegen einen negativen Einfluß auf die Expression des *fbsA*-Gens hat. Weiterhin belegen die erhaltenen Ergebnisse, daß die veränderte Transkription von Virulenzgenen in der *rovS*-Deletionsmutante durch Plasmid-vermittelte Expression von *rovS* vollständig komplementiert wird. Allgemein zeigen diese Ergebnisse, daß RovS als Transkriptionsregulator sowohl positiv als auch negativ auf die Expression bekannter und potentieller Virulenzfaktoren Einfluß nehmen kann.

1.3. Epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung des *rovS*-Gens in *S. agalactiae*

Zur Untersuchung der Verbreitung des *rovS*-Gens in *S. agalactiae* wurde chromosomale DNA von insgesamt 20 *S. agalactiae*-Stämmen mittels PCR mit den Primern rovS_N1 und rovS_C1 auf das Vorhandensein und die Größe des *rovS*-Gens getestet. Mit dem verwendeten Primerpaar wird das gesamte *rovS*-Strukurgen aus dem Genom von *S. agalactiae* amplifiziert. In **Abbildung 10** sind die für die 20 getesteten Stämme erhaltenen PCR-Produkte nach Agarose-Gelelektrophorese gezeigt. In **Tabelle 4** sind die zu den einzelnen Spuren in **Abbildung 10** zugehörigen *S. agalactiae* Stämme und deren Serotyp aufgelistet.

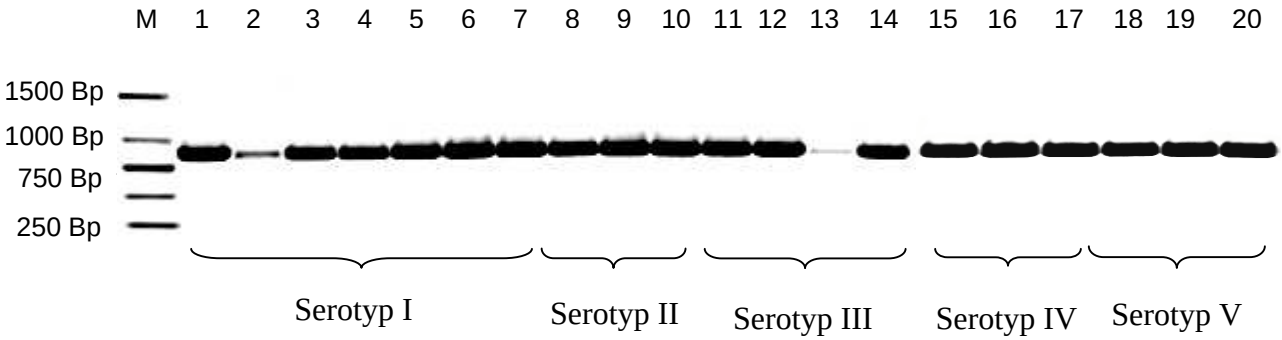


Abb. 10: Agarose-Gelelektrophorese der mit dem Primerpaar rovS_N1 / rovS_C1 und erhaltenen PCR-Produkte aus chromosomaler DNA verschiedener *S. agalactiae*-Stämme.

Tab. 4: Auflistung der 20 *S. agalactiae* Stämme, deren Ergebnis der PCR-Analyse zur Verbreitung des *rovS*-Gens in **Abbildung 10** dargestellt wurde.

1)	126 H4A	7)	A90/14	13)	0153 H4A	19)	4327 H4A
2)	706	8)	O176 H4A	14)	Nem316	20)	0171 H4A
3)	O90R	9)	516353	15)	G17		
4)	5095S2	10)	0151	16)	1121		
5)	7805	11)	6313	17)	MM9600011S		
6)	22 Ib/c	12)	Gi 736	18)	SS169		

Abbildung 10 zeigt, daß durch die PCR mit dem Primerpaar rovS-N1 / rovS-C1 das gesamte *rovS*-Strukturgen aus dem Genom verschiedener *S. agalactiae*-Stämme amplifiziert werden konnte. Dies verdeutlicht, daß *rovS* in verschiedenen klinischen *S. agalactiae*-Isolaten unterschiedlichen Genotyps weit verbreitet ist. In dem *S. agalactiae*-Stamm NEM316 besitzt das *rovS*-Gen eine Größe von 849 Bp. Für jeden getesteten Stamm, inklusive des in dieser Arbeit verwendeten Stammes 6313, erhält man mit dem gewählten Primerpaar eine Bande auf jeweils gleicher Höhe. Somit zeigt das *rovS*-Gen in *S. agalactiae* keine Größenvarianz.

1.4. Herstellung eines RovS-Fusionsproteins

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung wurde das Regulatorprotein RovS als Fusionsprotein mit einem Hexahistidyl-Rest im Stamm *E. coli* BL21 rekombinant hergestellt. Zur Konstruktion eines, am C-Terminus einen Hexahistidylrest-tragenden RovS-Fusionsproteins, wurde das *rovS*-Gen, beginnend beim Startcodon ATG, jedoch ohne Stoppcodon, in den Expressionsvektor pET28a kloniert. Dazu wurde das *rovS*-Gen zuerst mit dem Primerpaar rovS-N1 / rovS-C1 amplifiziert und das erhaltene PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Nco*I verdaut. Das PCR-Produkt wurde anschließend in den ebenfalls *Xho*I / *Nco*I-geschnittenen Vektor pET28a ligiert und der Ligationsansatz in den Stamm *E. coli* DH5α transformiert. Plasmidtragende Klone wurden auf LB-Kanamycin-Platten selektiert. Plasmide mit dem richtigen Insert wurden anschließend in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert. In **Abbildung 11** ist das zur Herstellung des RovS-Fusionsproteins verwendete Plasmid pET*rovS* dargestellt.

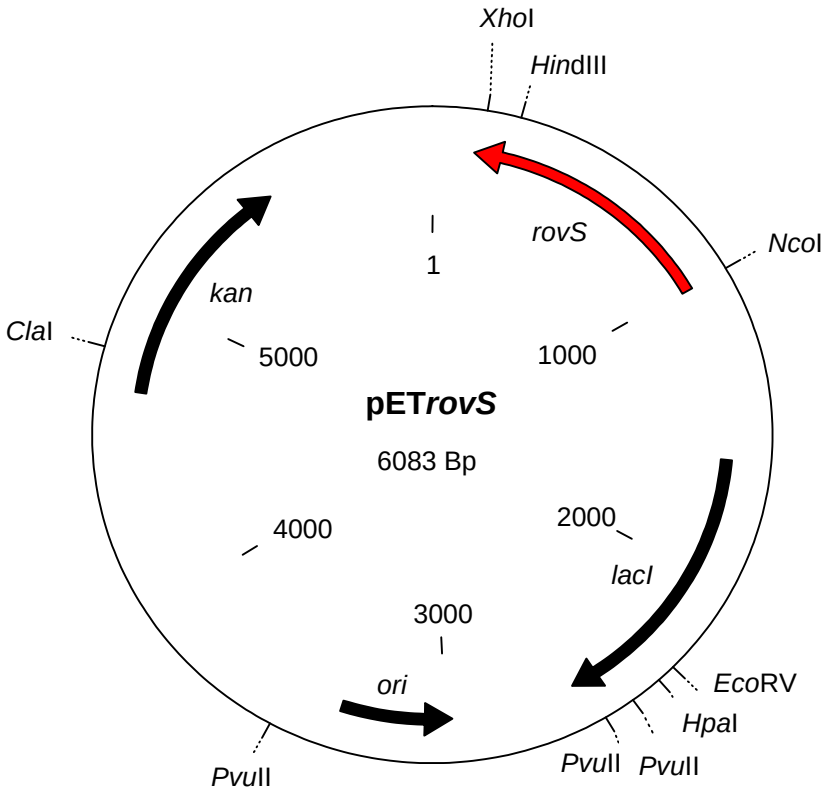


Abb. 11: Restriktionskarte des Plasmids pET*rovS* zur Synthese des RovS-Fusionsproteins.

Das Plasmid pET*rovS* codiert für ein RovS-Fusionsprotein, das einen Hexahistidyl-Rest am C-Terminus trägt, der wiederum eine Aufreinigung von RovS über Ni^{2+}-Affinitätschromatographie erlaubt. Durch Zugabe von IPTG wurde die Synthese des RovS-Fusionsproteins im *E. coli*-Stamm BL21 induziert. Die Bakterien wurden anschließend in einer French-Press-Zelle aufgeschlossen und das Fusionsprotein mittels einer Ni^{2+}-NTA-Säule aufgereinigt. Die dabei gewonnenen Eluate wurden schließlich über SDS-PAGE aufgetrennt und einer Coomassie-Färbung bzw. einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Zur spezifischen Detektion des RovS-Fusionsproteins über Western Blot wurden die Eluate nach SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und anschließend durch Maus-Anti-HisTag-Antikörper, sowie einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper über Chemilumineszenz nachgewiesen. **Abbildung 12** zeigt die Aufreinigung des RovS-Fusionsproteins aus *E. coli* BL21.

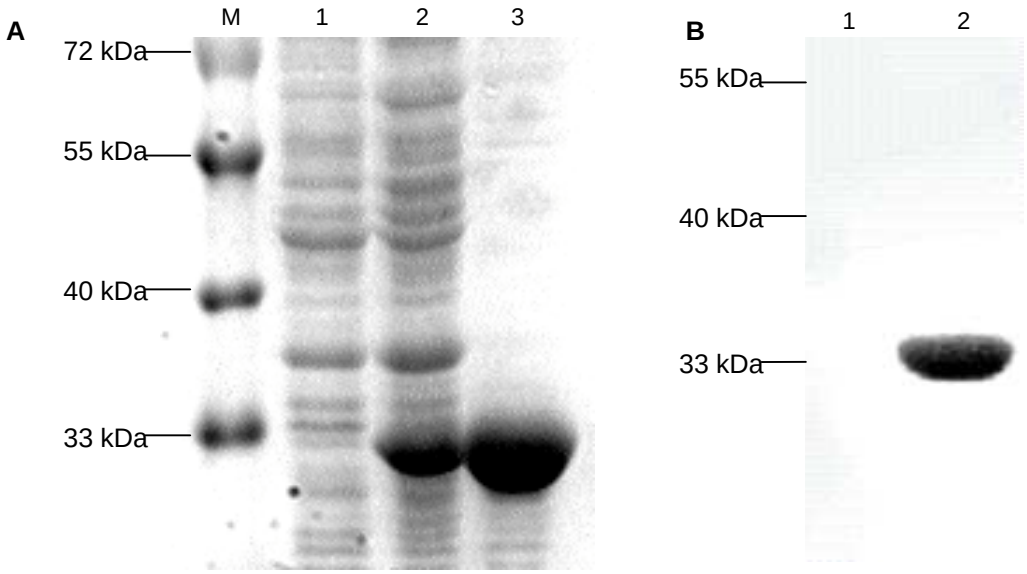


Abb. 12: (**A**) Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel zum Nachweis des RovS-Fusionsproteins in Zellextrakten von *E. coli* BL21 pET*rovS* vor (**1**) bzw. nach IPTG-Induktion (**2**), sowie aufgereinigtes RovS-Proteins nach Affinitätschromatographie (**3**). (**B**) Western Blot-Analyse zum Nachweis des RovS-Fusionsproteins in Zellextrakten des *E. coli*-Stammes BL21 pET-*rovS*. (**1**) Vor Induktion mit IPTG, (2) Nach Induktion mit IPTG.

Wie aus **Abbildung 12** zu entnehmen ist, führt die Zugabe von IPTG in *E. coli* BL21 pET*rovS* zur Synthese eines Proteins mit einer molaren Masse von etwa 33 kDa. Ein Protein mit entsprechender Größe konnte nach Aufreinigung über Affinitätschromatographie sowohl im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel als auch im Western-Blot mit Anti-HisTag-Antikörpern nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet somit an, daß RovS erfolgreich als HisTag-Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert und aus den Bakterien aufgereinigt werden kann.

1.5. Bandshift Experimente zur Identifizierung des RovS-DNA-Bindemotivs

Über LightCycler-Experimente konnte bereits ein Einfluß des Regulators RovS auf die Expression der Gene *fbsA, gbs0230, rogB, sod* und des *cyl*-Operons nachgewiesen werden. Zusätzlich war es möglich, RovS als HisTag-Fusionsprotein über Affinitätschromatographie aufzureinigen. Daher wurden Bandshift Experimente durchgeführt, um die Bindung von RovS an die Promoterregionen der erwähnten Gene und somit die direkte Beteiligung des Regulators an deren Expression zu untersuchen. Zur Durchführung der Bandshift Experimente wurden definierte DNA-Bereiche aus der Promoterregion der Gene *fbsA, gbs0230, sod, rogB* bzw. des *cyl*-Operon mittels PCR amplifiziert und als Sonden im Versuch eingesetzt. Diese DNA-Sonden wurden mit aufsteigenden Mengen an aufgereinigtem RovS-Protein inkubiert und die Ansätze anschließend auf ein 5 %iges, natives Polyacrylamidgel geladen. Als Negativkontrolle diente ein *rovS*-internes Fragment (*rovS*_int), das auch mit steigenden Mengen an RovS-Protein inkubiert wurde. Die Ergebnisse der Bandshift Experimente sind in **Abbildung 13** dargestellt.

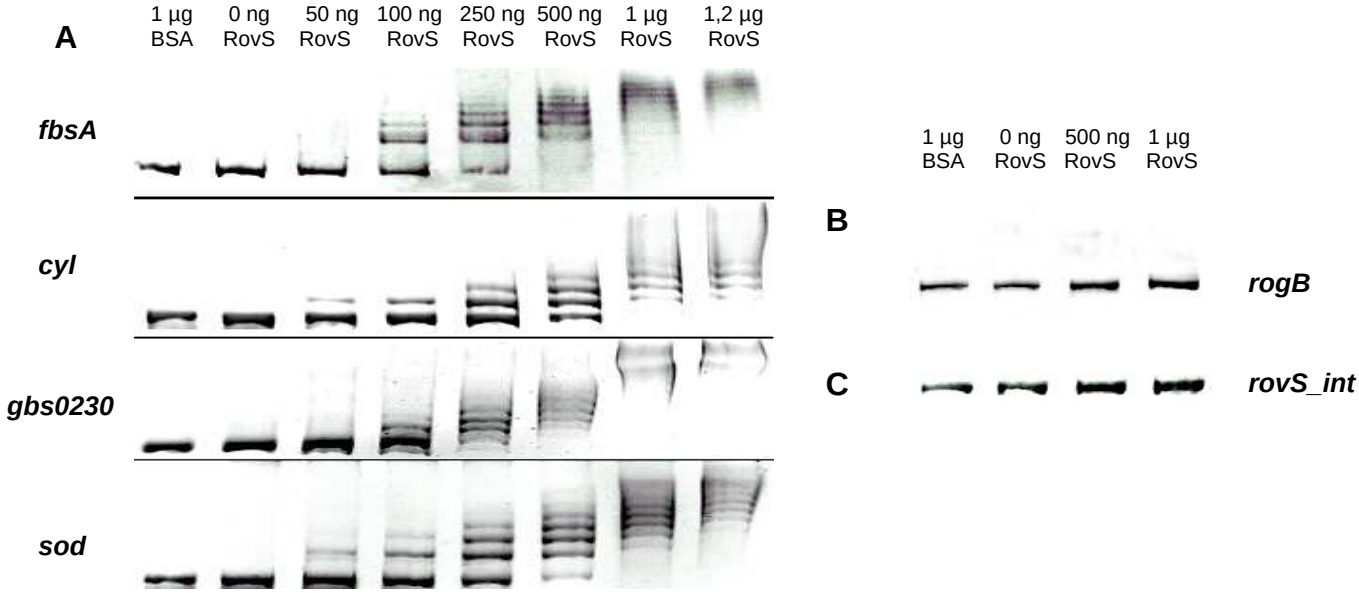


Abb. 13: (**A**) Bandshift Experimente zur Analyse der Bindung des Regulators RovS an Promoterfragmente der Gene *fbsA*, *gbs0230*, *sod* bzw. des *cyl*-Operons. (**B**) Bandshift Experimente zur Analyse der Bindung des Regulators RovS an die Promoterregion des *rogB*-Gens. (**C**) Kontroll-Bandshift Experiment unter Verwendung eines *rovS*-Gen- internen DNA-Fragments.

Wie **Abbildung 12** zeigt, bindet der Regulator RovS an die Promoterregionen der Gene *fbsA, gbs0230, sod* bzw. des *cyl*-Operons und ist somit direkt an der Regulation der Expression dieser

Gene beteiligt. Zusätzlich konnte keine Bindung des Regulators an die DNA-Sonde *rovS*-int gezeigt werden, die als Negativkontrolle eingesetzt wurde. Ein "*shift*" stellt somit eine spezifische Bindung des Proteins RovS an einen definierten DNA-Bereich dar. Auch konnte keine Bindung von RovS an die *rogB*-Promoterregion gezeigt werden. Somit liegt in diesem Fall vermutlich eine indirekte Regulation der *rogB*-Expression durch RovS vor.

Identifizierung des RovS-DNA-Bindemotivs in der Promoterregion von *fbsA*

Das *fbsA*-Gen, das für den Hauptfibrinogenrezeptor aus *S. agalactiae* codiert, wurde bereits von Schubert *et al.* (2002 & 2004) funktionell charakterisiert, insbesondere dessen Bedeutung für die Virulenz der Bakterien. Aus diesem Grund wurde die *fbsA*-Promoterregion für die Identifizierung des RovS-DNA-Bindemotivs herangezogen. Dazu wurden weitere Bandshift Experimente mit überlappenden DNA-Bereichen aus dem *fbsA*-Promoterbereich durchgeführt. Die entsprechenden Sonden F1-F12, deren Lage im Promoterbereich des *fbsA*-Gens in **Abbildung 14** dargestellt ist, wurden mittels PCR aus chromosomaler DNA von *S. agalactiae* 6313 amplifiziert. Nach Inkubation der Sonden mit 0 – 1,2 µg gereinigtem RovS-Protein, wurden die Sonden gelelektrophoretisch aufgetrennt und ihr Laufverhalten analysiert. Die Ergebnisse der Bandshift Experimente sind in **Abbildung 15** aufgeführt.

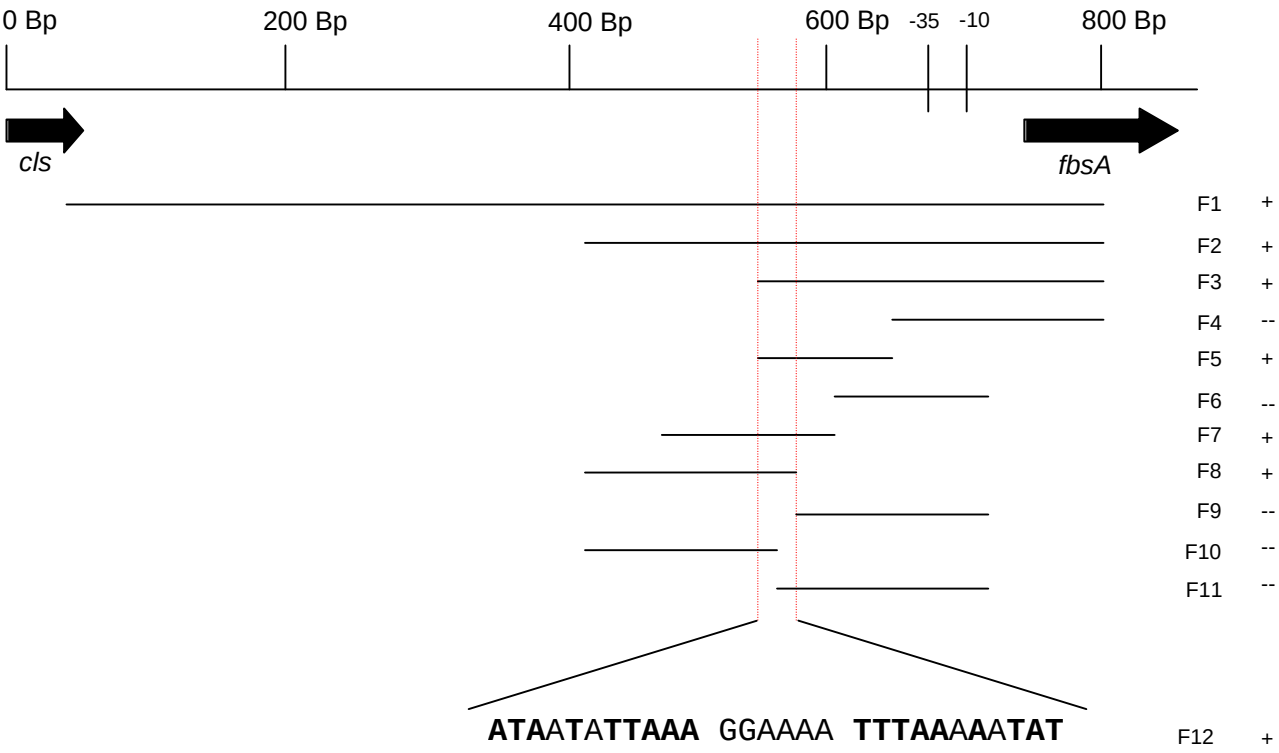


Abb. 14: Lage der in den Bandshift Analysen eingesetzten Sonden im Promoterbereich des *fbsA*-Gens. *cls* stellt das Gen der Cardiolipin-Synthetase dar. + / -- bezeichnet die Bindungseigenschaft des RovS-Proteins an die jeweilige Sonde.

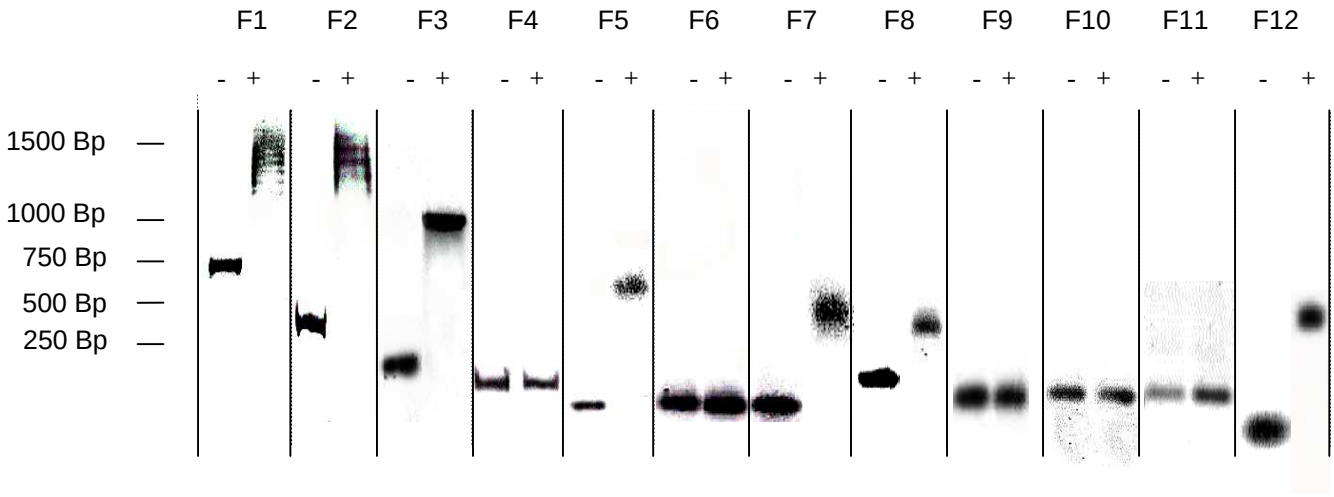


Abb. 15: Zusammenfassung aller Bandshift Experimente zur Identifizierung des RovS-Bindemotivs im *fbsA*-Promoterbereich. Dargestellt sind die Ergebnisse, die ohne Zugabe (-) bzw. unter Zugabe von 1 µg RovS-Protein (+) erzielt wurden.

Wie aus den **Abbildungen 14** und **15** deutlich wird, konnte mit Hilfe der Sonden F1-F11 das RovS-Bindemotiv auf einen Bereich von 28 Bp eingegrenzt werden. Mit dem doppelsträngigen Oligonukleotid F12 wurde die Bindung des Regulators RovS an dieses 28 Bp-Fragment bestätigt. Innerhalb der 28 Bp-Region war es möglich, das unvollständige Palindrom **ATA**A**T**A**TTAAA** NNNNNN **TTTAA**A**A**A**TAT** zu identifizieren, welches durch einen 6 Bp-Spacer unterbrochen wird. Um die Bedeutung dieses Palindroms für die Bindung von RovS zu untersuchen, wurden an verschiedenen Stellen der Orginalsequenz Mutationen eingefügt. Dazu wurden 28 Bp lange Oligonukleotide des oberen bzw. unteren DNA-Stranges mit den entsprechenden Mutationen synthetisiert, die Oligonukleotide zu doppelsträngiger DNA hybridisiert und als Sonden in Bandshift Experimente mit RovS-Protein eingesetzt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide (F13-F18) und deren Interaktion mit RovS ist in **Abbildung 16** dargestellt.

ATAATATTAAA GGAAAA TTTAAAAATAT	F12	++
ATAATATTAAA GGAAAA TCTCAAAATCT	F13	+
ATAATATTAAA TCATGT TCTACAAATCT	F14	+
AGAACAGTAGA GGAAAA TCTACAGATCT	F15	-
cTGCTATGACA GGAAAA TTTAAAAATAT	F16	+
ATAATATTAAA GGAAAA TCTAACAATGT	F17	+
cTGCTATGACA GGAAAA TCTAACAATGT	F18	-

Abb. 16: Sequenzen der in die Bandshift Experimente eingesetzten, doppelsträngigen 28 Bp-Oligonukleotide. Rot dargestellt sind die im Vergleich zur Originalsequenz eingefügten Mutationen. ++ / + / - bezeichnet das entsprechende Bindungsverhalten des RovS-Proteins an diese Fragmente.

Wie in **Abbildung 16** angedeutet, waren alle Sonden, in denen nur eine Seite des Palindroms mutiert worden war, noch in der Lage, RovS-Protein zu binden, allerdings wurden größere Mengen an RovS für die Bindung dieser Sonden benötigt. So zeigte Sonde F12, welche die Orginalsequenz des *fbsA*-Promotorbereichs trug, bereits ab einer Proteinkonzentration von 0,1 µg einen Bandshift, wohingegen die Sonden F13, F14, F16 bzw. F17, in denen jeweils eine Seite des Palindroms Mutationen aufwies, erst ab RovS-Konzentrationen von 0,5 µg geshiftet wurden. Dies deutet darauf hin, daß für eine optimale Bindung des Regulators beide Palindromseiten intakt sein müssen. Zusätzlich konnte mit Hilfe der Sonde F14 gezeigt werden, daß die Sequenz des 6 Bp-Spacers für eine Bindung des Regulators nicht ausschlaggebend ist. Hingegen wurden die Sonden F15 und F18, welche zahlreiche Mutationen auf beiden Seiten des Palindroms aufweisen, auch bei einer RovS-Proteinkonzentration von 10 µg nicht mehr geshiftet. In jeden Versuch wurde doppelsträngige DNA-Sonde in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Die beobachteten Unterschiede in der für einen Shift notwendigen RovS-Proteinkonzentration sind in **Abbildung 17** exemplarisch für die Sonden F12 und F13 dargestellt. Etwaige Unterschiede in der Intensität der Signale im Vergleich von Sonde F12 zu Sonde F13 sind auf eine unterschiedlich intensive Färbung mit Ethidiumbromid zurück zu führen.

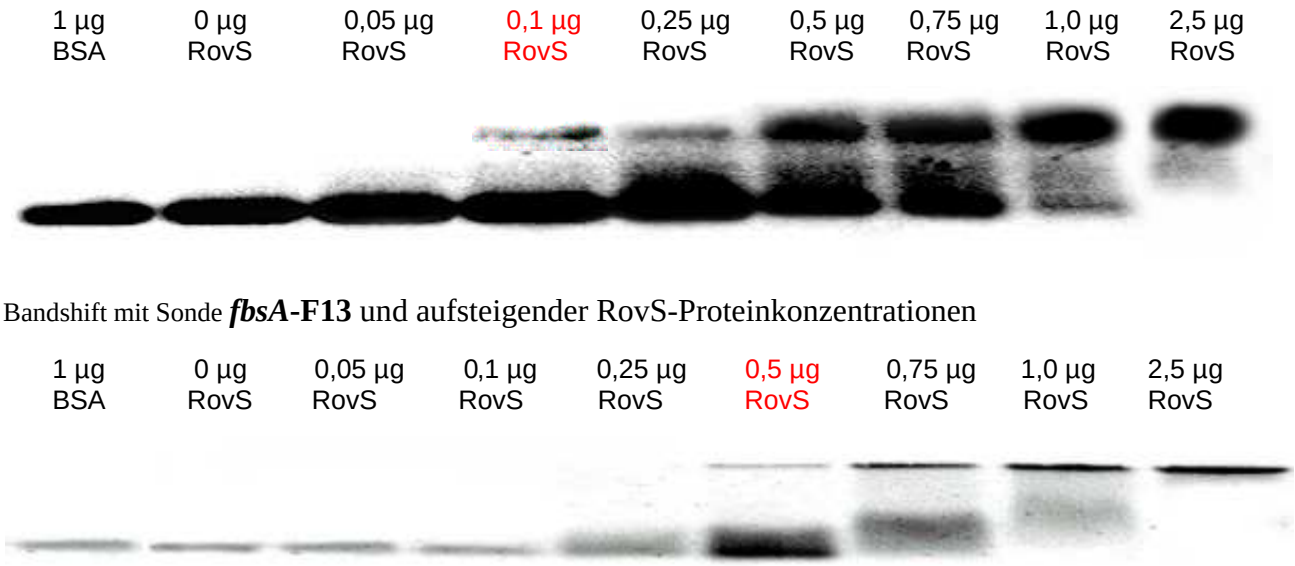


Abb. 17: Bandshift Experimente unter Verwendung der Sonden *fbsA*-F12 und *fbsA*-F13 aus der *fbsA*-Promoterregion. *fbsA*-F12 enthält die postulierte Konsensussequenz für das RovS-Bindemotiv als Orginalsequenz und wird bereits ab einer Proteinkonzentration von 0,1 µg geshiftet. *fbsA*-F13 trägt Mutationen auf einer Seite der palindormischen Sequenz des RovS-Bindemotivs und wird erst bei einer Proteinkonzentration von 0,5 µg geshiftet. *fbsA*-F13 steht exemplarisch für alle anderen Bandshiftsonden, die auf einer Seite des RovS-Bindemotivs starke Mutationen aufweisen.

Erstellen einer Konsensussequenz für das DNA-Bindemotiv des Regulators RovS

Da in Bandshift Experimenten das RovS-Protein innerhalb der Promotorregion der Gene *fbsA*, *gbs0230*, *sod* bzw. des *cyl*-Operons Bindung gezeigt hatte, wurden die Promotorregionen der letztgenannten Gene auf potentielle RovS-Bindemotive analysiert. Dazu wurden das identifizierte RovS-Bindemotiv und die Promoterbereiche dieser Gene mit Hilfe des Programmes “lalign” miteinander verglichen. Dadurch war es schließlich möglich, eine potentielle Konsensussequenz für das RovS-Bindemotiv zu erstellen. Die Alignments und das daraus ermittelte RovS-Bindemotiv sind in **Abbildung 18** dargestellt.

fbsA	**ATAAT**ATT**AA**A	N_6	**TTTAAAA**AT**AT**
gbs0230	**ATAA**AAA**TGA**A	N_6	A**TGA**T**AA**GT**AT**
sod	A**AAAT**CC**TAA**T	N_6	**TTT**T**AAA**AA**AG**
cyl	**ATAAT**GTT**TA**T	N_6	**TTTAAA**CTA**AT**
consensus	**AWAAW**VH**T**DA**W**	N_6	**WTKWWAMD**W**AK**

Abb. 18: Alignment der Promoterregionen der Gene *fbsA, gbs0230, sod* sowie des *cyl*-Operons zur Identifizierung der Konsensussequenz des RovS-Bindemotivs aus *S. agalactiae* 6313. Zum Erstellen der Konsensussequenz wurde der degenerierte Wobble-Code verwendet. In Fettschrift hervorgehoben wurden alle stark konservierten Nukleotide innerhalb des Bindemotivs.

Wie aus **Abbildung 18** deutlich wird, wurde das über Bandshift Experimente identifizierte RovS-Bindemotiv im Promoterbereich aller, in Bandshift Experimenten auf RovS-Bindung positiv getesteten Gene, gefunden. Eine Vielzahl der Nukleotide innerhalb des Bindemotivs ist stark konserviert und daher war es möglich, die oben gezeigte Konsensussequenz für das RovS-Bindemotiv zu erstellen.

1.6. Gelfiltrationsexperimente zur Bestimmung der nativen molaren Masse von RovS

Zusätzlich zur Identifizierung des RovS-DNA-Bindemotivs wurde die native, molare Masse des Regulators RovS bestimmt. Aus diesem Grund wurden Gelfiltrationsexperimente an einer Äkta-Anlage (Amersham) durchgeführt. Dazu wurden 800 µl einer über Affinitätschromatographie aufgereinigten RovS-Proteinlösung (2,5 µg/ml) auf eine Pharmacia©-Säule (Länge = 60 cm; Æ = 1,6 cm) geladen. Die Säule war mit "Superdex-200 prepgrade" gefüllt und wurde mit einem 50 mM Phosphatpuffer pH 7,2, der zusätzlich 150 mM NaCl enthielt, äquilibriert. Die Laufgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, wobei letztendlich Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml durch einen Fraktionssammler erhalten wurden. Die Fraktionen wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm bzw. 219 nm gemessen und somit ein Elutionsprofil erstellt, das in **Abbildung 19** dargestellt ist.

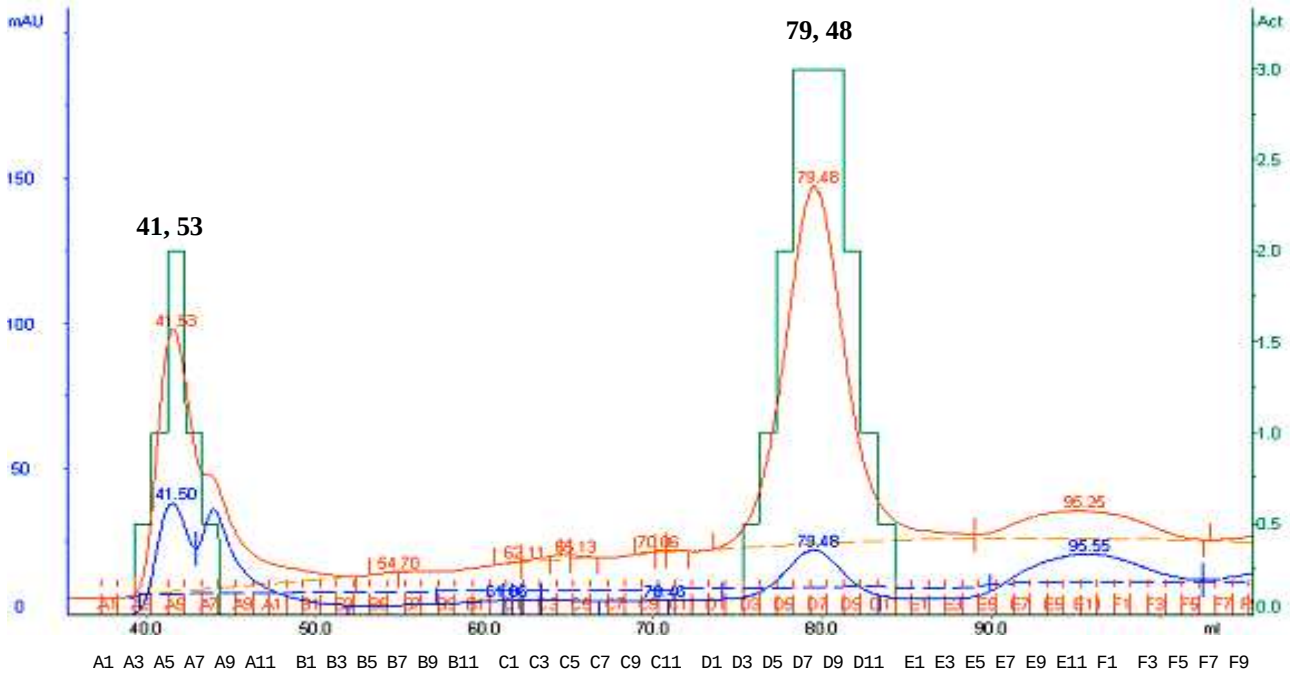


Abb. 19: Elutionsprofil der Gelfiltrationsanalyse zur Bestimmung der nativen Größe des Regulatorproteins RovS. Auf der x-Achse sind die einzelnen Fraktionen A1-F9 und das entsprechende Elutionssvolumen dargestellt. Auf der linken y-Achse sind die gemessenen Milli-Absorption-Units dargestellt, die zum einen bei einer Wellenlänge von 219 nm (blaue Kurve) und zum anderen bei einer Wellenlänge von 280 nm (rote Kurve) gemessen wurden. Auf der rechten y-Achse wurde die Aktivität der einzelnen Fraktionen aufgetragen (grüne Kurve), die aus der Intensität der einzelnen Signale eines Spot-Blots bestimmt wurden. Dabei wurden Aliquots aller Fraktionen auf eine Nitrocellulosemembran pipettiert und darin enthaltenes RovS Protein durch HisTag-Antikörpern mittels Dot Blots detektiert.

Wie aus **Abbildung 19** deutlich wird, zeigt das Elutionsprofil zwei Hauptpeaks. Der erste Peak umfaßt dabei die Fraktionen A3-A7 und zeigt sein Maximum bei einem Elutionsvolumen von 41,5 ml. Der zweite Peak umfaßt die Fraktionen D3-D11 und besitzt das Maximum bei einem Elutionsvolumen von 79,5 ml. Um nun zu überprüfen, ob diese Peaks tatsächlich auf das Regulatorprotein RovS zurückzuführen sind und nicht auf Proteinverunreinigungen in der Probe, wurden 5 µl der Fraktionen A0-F9 auf eine Nitrocellulosemembran gespottet und damit Dot Blot Experimente mit Anti-HisTag-Antikörpern durchgeführt. Das Ergebnis dieses Dot Blots ist in **Abbildung 20** dargestellt.

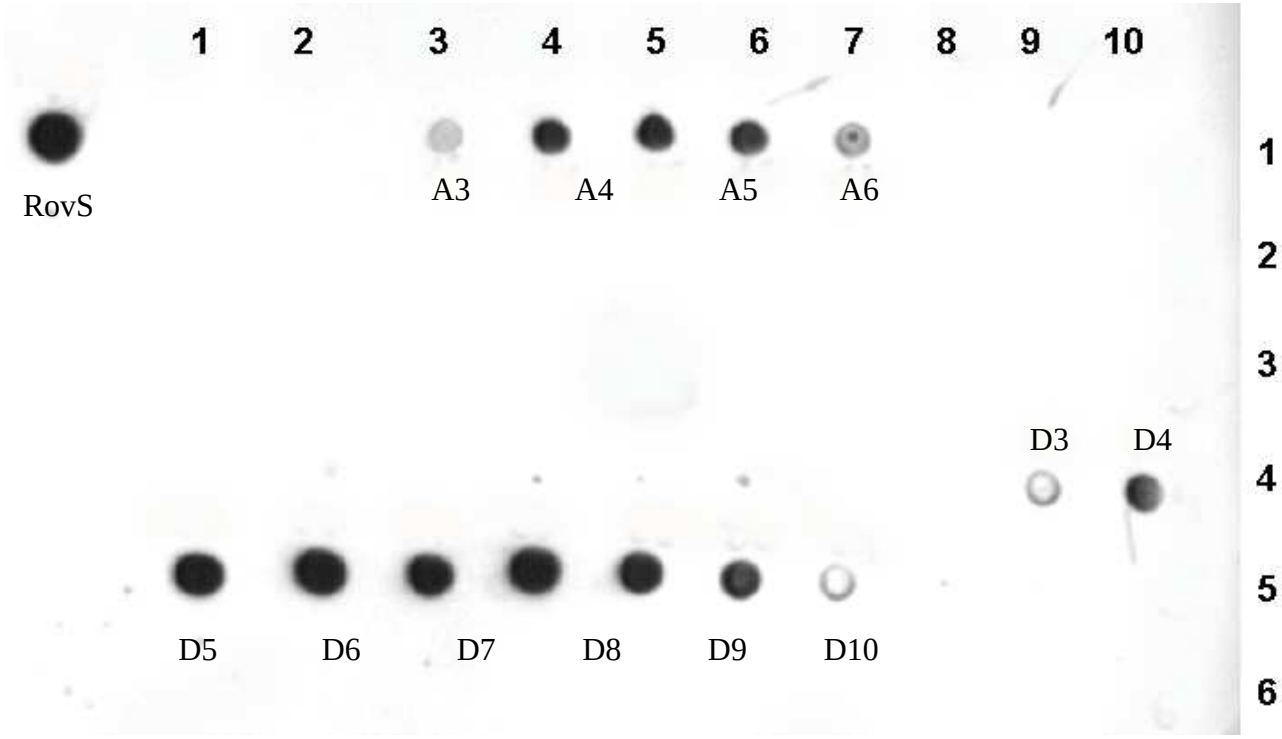


Abb. 20: Dot Blot Analyse zum Nachweis des RovS Proteins in einzelnen Fraktionen nach Auftrennung des Proteins durch Gelfiltration. Aliquots der unterschiedlichen Fraktionen wurden auf eine Nitrocellulosemembran pipettiert. Der Nachweis von RovS erfolgte über Anti-HisTag-Erstantikörper und Peroxidase-markierte Zweitantikörper. Die Entwicklung geschah mittels Chemilumineszenz. Als Positivkontrolle diente aufgereinigtes RovS Protein.

Aus **Abbildung 20** ist zu erkennen, daß RovS in den Fraktionen A3-A7 und D3-D11 nachzuweisen ist, wobei diese Fraktionen mit den beiden Hauptpeaks des Elutionsprofils übereinstimmen.

Um nun die molare Masse des Proteins in den beiden Hauptfraktionen A5 und D8 bestimmen zu können, wurde auf eine Kalibriergerade zurückgegriffen, die bereits bei früheren Experimenten

an der Äkta-Anlage von Gerd Seibold erstellt worden war. Dazu wurden Proteine mit bekannter molarer Masse auf die Gelfiltrationssäule pipettiert und deren Elutionsprofil bestimmt. Dabei ergab sich für jedes Protein ein spezifischer K_{av}-Wert. Dieser berücksichtigt das Säulengesamtvolumen von 120 ml, das Säulentodvolumen von 40 ml und das Elutionsvolumen der geladenen Proben. Zusätzlich ist dieser Wert unabhängig von der Konzentration der geladenen Probe und vom Packungsmaterial der verwendeten Säule. In **Tabelle 5** sind die Proteine mit denen die Kalibriergerade erstellt wurde, ihre native molare Masse und ihr entsprechender K_{av}-Wert aufgeführt.

Tab. 5: Auflistung der für die Erstellung der Gelfiltrations-Kalibriergeraden verwendeten Proteine, inklusive ihrer nativen molaren Massen und des ermittelten K_{av}-Wertes.

Protein	**Molare Masse [kDa]**	**K_{av}**
Cytochrom C1	12, 5	0,712
Chymotrypsinogen	25	0,638
Albumin Ei	45	0,518
BSA	68	0,444
Aldolase	158	0,329
Katalase	240	0,308
Ferritin	450	0,19

Abbildung 21 zeigt die daraus berechnete Kalibriergerade.

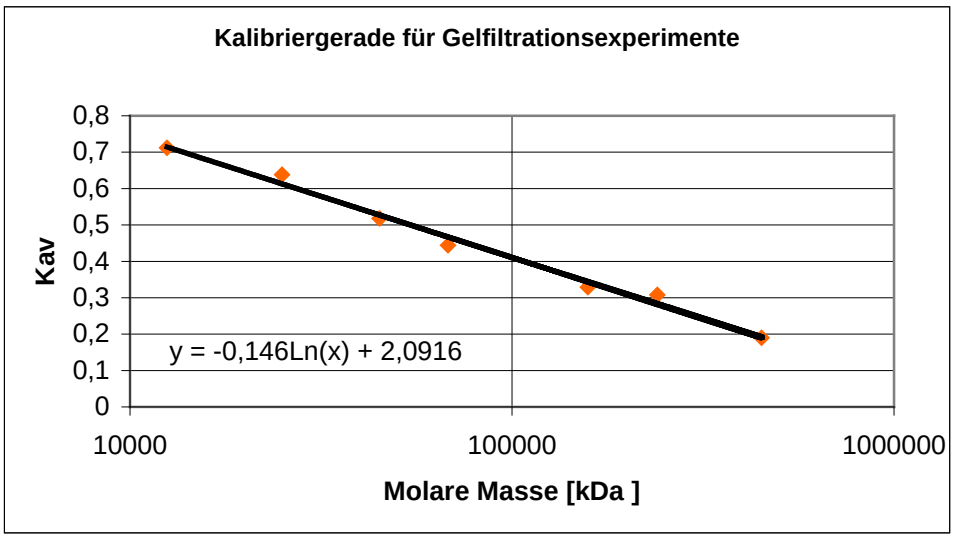


Abb. 21: Kalibriergerade zur Bestimmung der nativen molaren Masse des Regulatorproteins RovS über Gelfiltration.

Setzt man die für die beiden Hauptfraktionen ermittelten K_{av}-Werte in die Geradengleichung der Kalibriergeraden ein, so erhält man die entsprechende molare Masse des nativen RovS-Proteins. Das Ergebnis dieser Berechnung ist in Tabelle 6 dargestellt.

Proteinfraktion	**K_{av}**	**Molare Masse [kDa]**
A5	0,021	1442
D7	0,491	58

Tab. 6: Bestimmung der molaren Masse des RovS-Proteins aus den Gelfiltrationsfraktionen A5 bzw. D7 mit Hilfe der erstellten Kalibriergeraden.

Eine molare Masse von über 1400 kDa aus der ersten Hauptfraktion A5 läßt auf eine Proteinverunreinigung im Ansatz schließen, mit der auch das eigentliche Regulatorprotein interagiert. Dabei entsteht ein großer Proteinkomplex, der direkt nach dem Säulentodvolumen zu detektieren ist. Aus der zweiten Proteinfraktion D7 ergibt sich eine molare Masse von 58 kDa, was letztendlich auf ein RovS-Dimer schließen läßt, da RovS unter denaturierenden Bedingungen als Monomer eine molare Masse von etwa 30 kDa besitzt (**Abbildung 12).** Somit konnte gezeigt werden, daß RovS unter nativen Bedingungen als Dimer mit einer molaren Masse von etwa 58 kDa vorliegt.

2. Funktionelle Analysen zur Bedeutung von Hsh für die Virulenz von *S. agalactiae* 6313

Ausgangspunkt der hier beschriebenen Arbeiten waren Ergebnisse der Diplomarbeit von Stefanie Ripka (2003), in welcher der Versuch unternommen worden war, das Gen *gbs1529* im *S. agalactiae*-Stamm 6313 funktionell zu charakterisieren. In der Diplomarbeit durchgeführte Datenbankanalysen ergaben, daß im Genom von *S. agalactiae* NEM316 das Gen *gbs1529* signifikante Ähnlichkeit zu dem als *hsa* bezeichneten Gen aus *Streptococcus gordonii* aufweist (Takahashi *et al*, 2002). Aufgrund dieser signifikanten Ähnlichkeit, wurde das Gen *gbs1529* als *hsh* (***hs****a*-**h**omolog) bezeichnet. Im Rahmen ihrer Arbeit hatte Frau Ripka bereits ein Plasmid konstruiert, das die Synthese der aus 660 Aminosäuren bestehenden N-terminalen Region von Hsh sowie dessen Aufreinigung als HisTag-Fusionsprotein erlaubte. Aufgabe der hier beschriebenen Arbeit war es nun, mit Hilfe dieses Proteins potentielle, humane Interaktionspartner zu identifizieren. Zusätzlich sollte der Einfluß von *hsh* auf die Pathogenität der Bakterien untersucht werden.

2.1.Die *hsh*-codierende Region in *S. agalactiae*

Abbildung 22 zeigt die Restriktionskarte der *hsh*-codierenden Region aus *S. agalactiae* NEM316, sowie die Struktur des daraus resultierenden Hsh-Proteins.

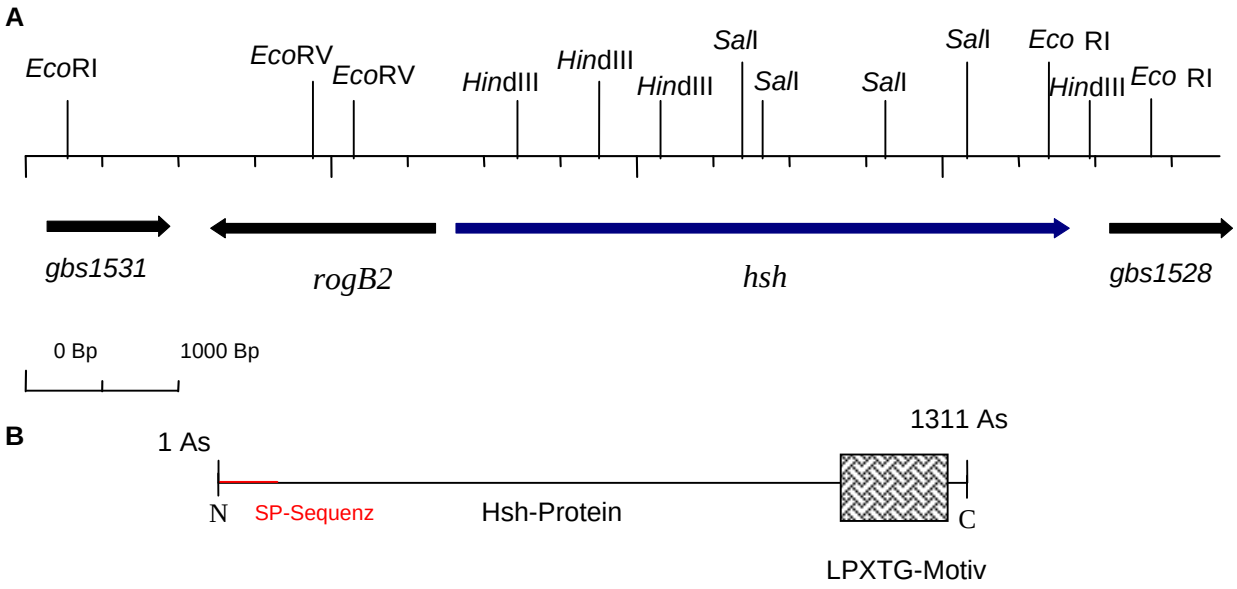


Abb. 22: (A) Restriktionskarte der *hsh*-Genregion aus *S. agalactiae* NEM316. (B) Graphische Darstellung des Hsh Proteins, inklusive der Signalpeptid-Sequenz (Sp-Sequenz) am N-Terminus bzw. des Zellwandankermotivs (LPXTG) am C-Terminus.

Das *hsh*-Gen aus *S. agalactiae* NEM316 besitzt eine Länge von 3933 Bp und codiert für ein Protein von 1310 Aminosäuren mit einer molaren Masse von 129398 Da. Am N-Terminus des Hsh-Proteins wurde eine aus 93 Aminosäuren bestehende Signalpeptidsequenz und am C-Terminus ein für Gram-positive Bakterien typisches Zellwandankermotiv mit der Sequenz "LPSTG" identifiziert. Hsh wird somit vermutlich in *S. agalactiae* über die Cytoplasmamembran transportiert und kovalent mit der Zellwand der Bakterien verknüpft. Zusätzlich befinden sich im C-Terminus von Hsh 121 Sequenzwiederholungen mit dem Aminosäuremotiv "STSA" und 29 Sequenzwiederholungen mit der Aminosäureabfolge "SMSA". Auch das Protein Hsa aus *S. gordonii* weist an vergleichbarer Stelle einen ähnlich repetitiven Bereich mit entsprechenden Sequenzwiederholungen auf (Takahashi *et al*, 2002).

2.2. Analyse der Interaktion des Hsh-Proteins mit eukaryotischen Proteinen

In *S. gordonii* wird das Hsa-Protein mit der Adhärenz der Bakterien an sialinsäurehaltige Rezeptoren und mit der bakteriellen Hämagglutination in Verbindung gebracht (Takahashi *et al*, 2002). Da Hsh in *S. agalactiae* vermutlich auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiert ist, besteht die Möglichkeit, daß *S. agalactiae* über dieses Protein mit eukaryotischen Wirtszellen interagiert. Um eine damit verbundene Bedeutung von Hsh auf die Pathogenität von *S. agalactiae* zu untersuchen, wurden Versuche zur Identifikation potentieller Hsh-Interaktionspartner durchgeführt. Für diese Analysen lag aus der Diplomarbeit von Stefanie Ripka bereits der N-Terminus des Hsh-Proteins als aufgereinigtes HisTag-Fusionsprotein sowie Hsh-spezifische Antikörper aus der Maus vor. Dadurch war es möglich, mittels SDS-PAGE und Western Blots, die Bindungsfähigkeit von Hsh an eukaryotische Proteine zu untersuchen. Dazu wurden eukaryotische Zell- und Gewebeextrakte durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Verwendet wurden dabei Gewebeextrakte von Herz, Lunge bzw. Leber der Maus, von Hirn, Herz, Lunge und Hirnendothel des Rindes sowie Gelenkflüssigkeit des Rindes. Weiterhin wurde humaner Speichel sowie Zellextrakte humaner Vorhautfibroblasten auf Interaktion mit Hsh untersucht. Die Nitrocellulosemembran wurde zunächst mit aufgereinigtem Hsh-Protein und anschließend mit Hsh-spezifischen Antikörpern inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe von Meerettich-Peroxidase-gekoppelten Esel-Anti-Maus-Fab-Fragmenten detektiert. Um eine Kreuzreaktion der verwendeten Antikörper mit Proteinen aus den Gewebeextrakten auszuschließen, wurden die geblotteten Proteine in einem parallelen Ansatz ohne Vorinkubation mit Hsh mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert.

Über Western Blot konnte keine Bindung von Hsh an Proteine aus Rind bzw. Maus nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Hingegen zeigte Hsh Interaktion mit einem Protein in humanem Speichel. In **Abbildung 23** ist das Ergebnis der Western-Blot-Analyse zum Nachweis der spezifischen Bindung von Hsh an ein humanes Speichelprotein dargestellt.

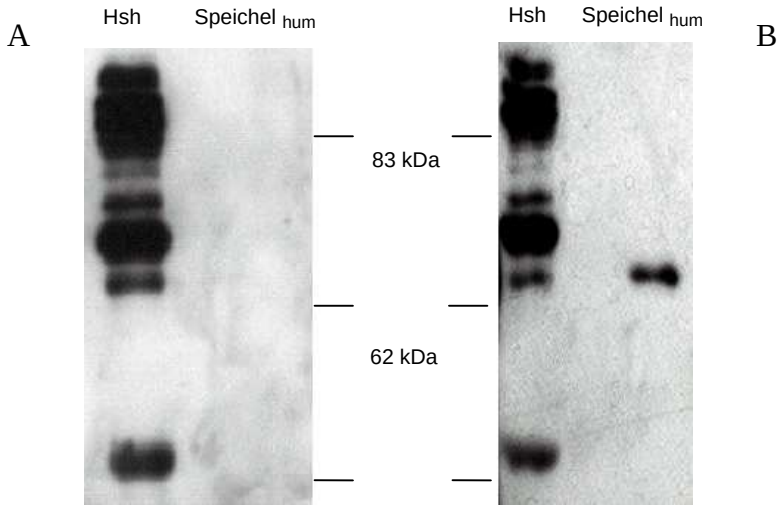


Abb. 23: Western-Blot-Analyse zum Bindungsnachweis von Hsh an ein humanes Speichelprotein. Hsh wurde dabei mit spezifischen Hsh-Antikörpern detektiert. Abbildung **(A)** zeigt das Ergebnis ohne und Abbildung **(B)** das Ergebnis nach Vorinkubation der Membran mit aufgereinigtem Hsh-Protein.

Anhand der **Abbildung 23** ist erkennbar, daß Hsh an ein humanes Speichelprotein mit einer molaren Masse von ca. 65 kDa bindet. Als Positivkontrolle wurde jeweils das aufgereinigte Hsh-Protein aufgetragen, das neben der für Hsh-N gewünschten Bande von ca. 72 kDa auch zahlreiche weitere Proteinbanden aufweist. Diese Banden sind vermutlich auf eine Multimerisierung bzw. den Abbau des Hsh-Proteins zurückzuführen. Ein Blot ohne Vorinkubation mit Hsh-Protein brachte keine Signale außer der Positivkontrolle hervor. Aus diesem Grund wurde die Bindung von Hsh an das humane Speichelprotein als spezifisch angesehen. Die gleiche Western-Blot-Analyse wurde auch mit Anti-HisTag-Antikörpern durchgeführt (Ergebnis nicht gezeigt). Dabei ergab sich das gleiche Ergebnis wie bei dem gezeigten Western Blot unter Verwendung von Hsh-spezifischen Antikörpern. Somit konnte gezeigt werden, daß aufgereinigtes Hsh-Fusionsprotein spezifisch an ein humanes Speichelprotein bindet.

Zur Identifizierung des humanen Hsh-Bindungspartners wurden in weiteren Versuchen die humanen Speichelproteine über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. **Abbildung 24** zeigt die humane Speichelprobe nach Auftrennung über SDS-PAGE.

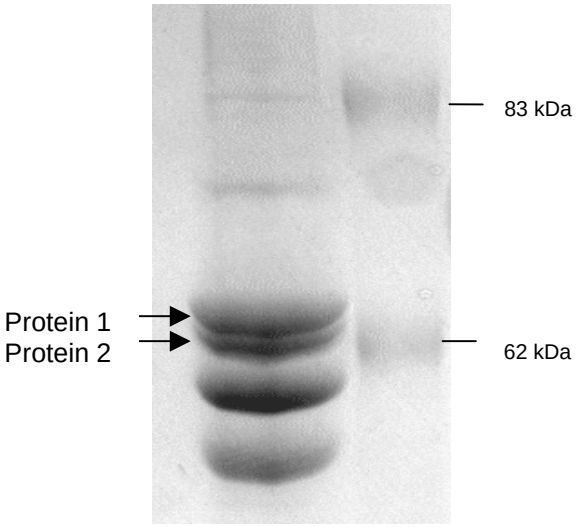


Abb. 24: SDS-PAGE zur Auftrennung humaner Speichelproteine. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt. Protein 1 und 2 wurden ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF analysiert.

Die als Protein 1 und Protein 2 bezeichneten Proteinbanden stellen aufgrund ihrer molaren Masse von ca. 62 kDa potentielle Hsh-Bindungspartner dar. Sie wurden daher aus dem Gel ausgeschnitten und zur Identifizierung über MALDI-TOF an das Forschungszentrum Jülich geschickt. Die durchgeführte MALDI-TOF-Analyse identifizierte Protein 1 als humanes Keratin 4 (Krt4) und Protein 2 als humanes Keratin 6a/b (Krt 6a/b). Um die Frage zu klären, welches der beiden Protein mit Hsh interagiert, wurden beide Proteine aus humanem Speichel mittels präparativer SDS-PAGE voneinander getrennt und im Western-Blot auf ihre Bindung an Hsh getestet. Das Ergebnis dieses Experiments ist in **Abbildung 25** dargestellt. Wie man der Abbildung entnehmen kann, bindet das Hsh-Fusionsprotein an humanes Keratin 4, jedoch nicht an humanes Keratin 6a/b. Unter Verwendung monoklonaler Anti-Keratin 4 Antikörper wurde im Western Blot ein Signal erhalten, dessen Laufverhalten mit dem Hsh-Interaktionspartner Keratin 4 identisch ist. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß es sich bei dem gefundenen Hsh-Interaktionspartner um humanes Keratin 4 handelt. Keratin 4 ist vor allem Bestandteil humaner Schleimhautepithelien im Mund- und Rachenraum, sowie im Gastrointestinal- und Vaginaltrakt.

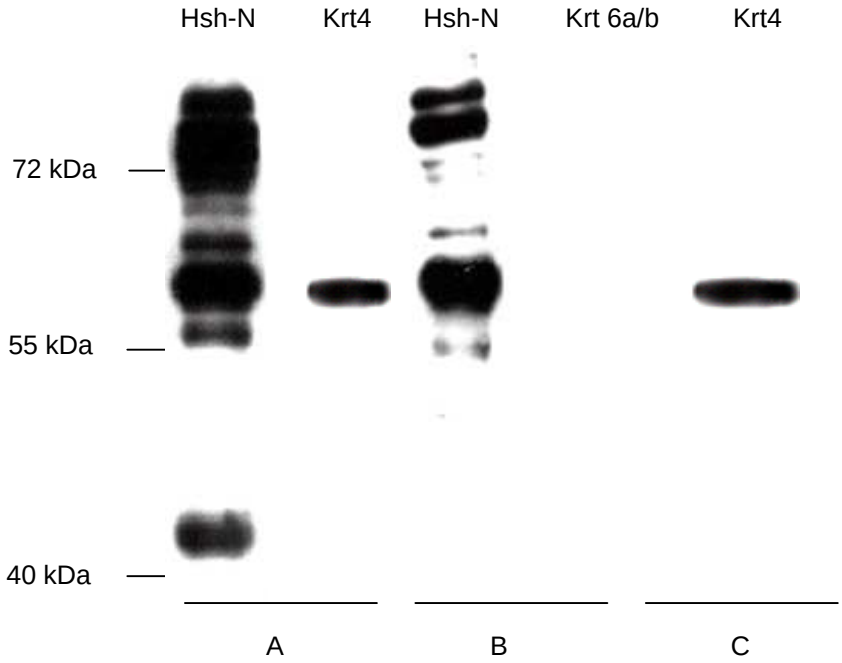


Abb. 25: Western-Blot-Analyse zum Bindungsnachweis von Hsh an die humanen Speichelprotein (**A**) Keratin 4 (Krt4) bzw. (**B**) Keratin 6a/b (Krt 6a/b). Nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, mit Hsh-Fusionsprotein und anschließend mit Hsh-spezifischen Antikörpern inkubiert. Als Positivkontrolle diente Hsh-Fusionsprotein (Hsh-N). Das in (**C**) gezeigte humane Keratin 4 wurde über monoklonale Keratin 4 - Antikörper detektiert.

2.3. Identifizierung der Keratin 4-bindenden Domäne des Hsh-Proteins

Nachdem humanes Keratin 4 als Interaktionspartner des Hsh-Proteins aus *S. agalactiae* identifiziert worden war, war es weiter von Interesse, die Keratin 4 – bindende Domäne des Hsh-Proteins zu identifizieren. Dazu wurden Bereiche des *hsh*-Gens, die für den N-Terminus von Hsh codieren, in den Vektor pET28a subkloniert. Zur Herstellung des PCR-Produktes *hsh-N1* wurde das Primerpaar hsh-N1 / hsh-N_halb_v_C1, für *hsh-N2* das Primerpaar hsh-N_halb_h_N1 / hsh-C1, für *hsh-N2-N* das Primerpaar hsh-N_halb_h_N1 / hsh-N_halb_hv_C1 und für *hsh-N2-C* das Primerpaar hsh-N_halb_hh_N1 / hsh-C1 verwendet. Die Amplifikate *hsh-N1* und *hsh-N2-N* wurden mit den Enzymen *Nco*I und *Xho*I und die Amplifikate *hsh-N2* und *hsh-N2-C* mit den Enzymen *Nco*I und *Bam*HI geschnitten. Anschließend wurden die PCR-Produkte in den entsprechen geschnittenen Vektor pET28a ligiert. Die Ligationsansätze wurden in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert und rekombinante Klone auf LB-Kanamycin-Agarplatten selektiert. Plasmide mit den gewünschten Inserts wurden anschließend in den *E. coli*-Stamm ER2566

transformiert und Plasmid-tragende Klone auf LB-Kanamycin-Agarplatten selektiert. Durch Gabe von IPTG wurde in diesen Klonen die Synthese des jeweiligen Hsh-Konstrukts induziert. In **Abbildung 26** sind die Teilbereiche von Hsh graphisch dargestellt, von denen Hexahistidyl-tragenden Hsh-Konstrukte hergestellt wurden. Die entsprechenden Fusionsproteine wurden in einer French Pressure Zelle aufgeschlossen und über Affinitätschromatographie aufgereinigt.

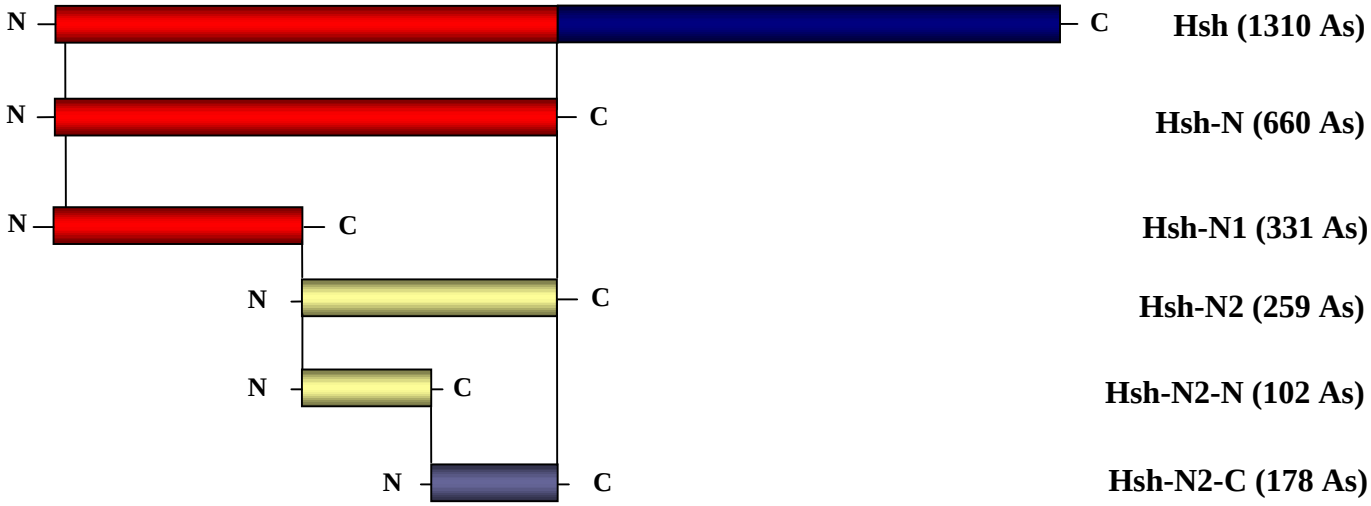


Abb. 26: Schematische Darstellung des Hsh-Proteins aus *S. agalactiae* 6313 und dessen Teilbereiche, die zur Identifizierung der Bindungsdomäne von Hsh an humanes Keratin 4 verwendet wurden.

Abbildung 27 zeigt zusätzlich die erfolgreiche Aufreinigung dieser Hsh-Fusionsproteine aus *E. coli* ER2566.

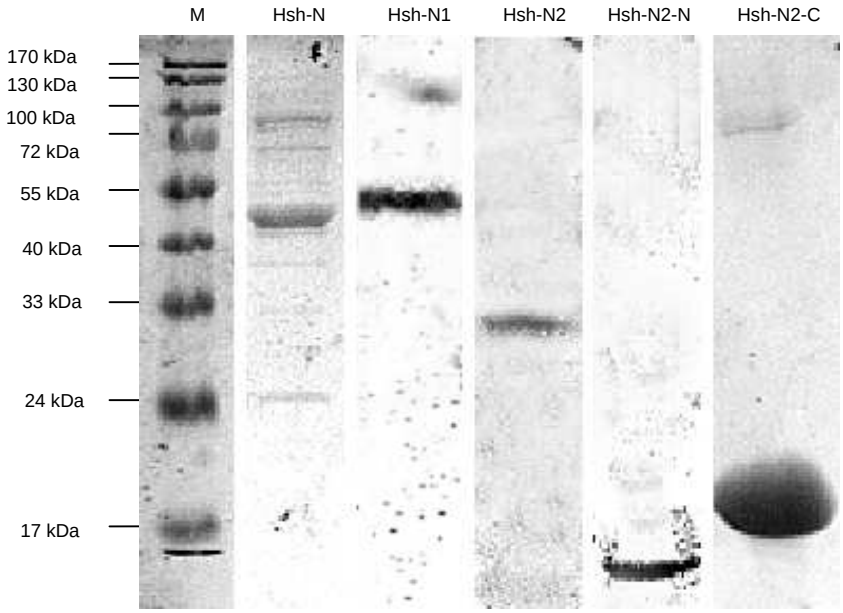


Abb. 27: Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel zum Nachweis der Hsh-Fusionsproteine aus Zellextrakten des *E. coli*-Stammes ER2566 nach Aufreinigung über Affinitätschromatographie.

Die in **Abbildung 27** gezeigten Fusionsproteine Hsh-N1, Hsh-N2, Hsh-N2-N bzw. Hsh-N2-C wurden in Western-Blot-Experimente eingesetzt, um ihre Bindung an humanes Keratin 4 zu untersuchen. Dazu wurden humanes Keratin 4 und das zu testende Fusionsprotein über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Nach Inkubation der Membran mit dem jeweiligen Hsh-Konstrukt, wurde dieses über Hsh-spezifische Erstantikörper und Peroxidase-gekoppelte Anti-Maus-Zweitantikörper nachgewiesen. Das Ergebnis der einzelnen Western-Blot-Analysen ist in **Abbildung 28** dargestellt.

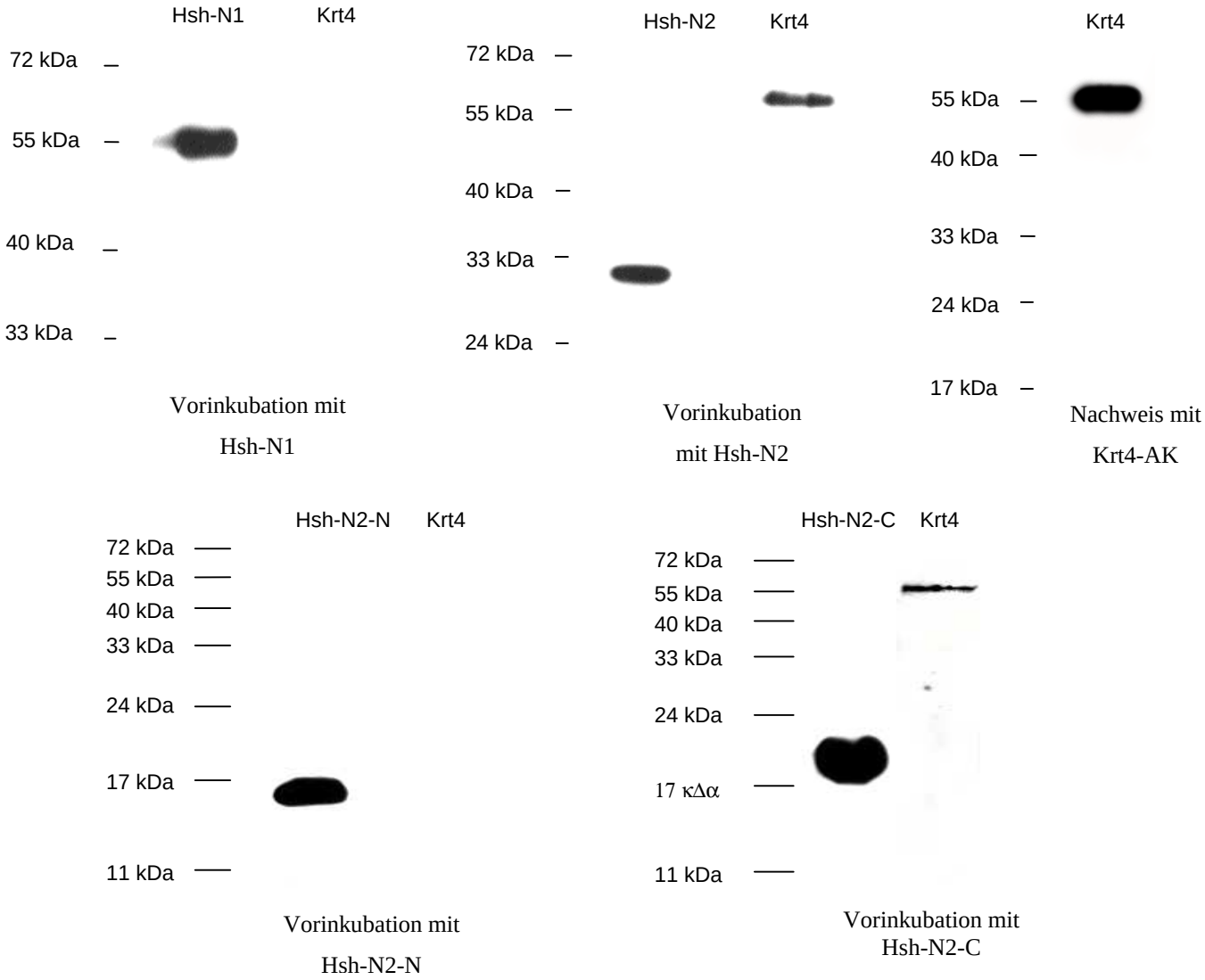


Abb. 28: Western Blot zur Identifikation der Keratin 4-bindenden Domäne in Hsh. Die Fusionsproteine Hsh-N1, Hsh-N2, Hsh-N2-N bzw. Hsh-N2-C, sowie humanes Keratin 4, wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Durch Inkubation der jeweiligen Blots mit 250 µg des entsprechenden Fusionsproteins, wurde dessen Bindung an humanes Keratin 4 getestet. Der Nachweis erfolgte über Hsh-spezifische Erstantikörper und einen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Mittels Krt4-spezifischer Antikörper wurde nachgewiesen, daß es sich bei dem Hsh-Bindungspartner um humanes Keratin 4 handelt.

Wie aus **Abbildung 28** zu erkennen ist, zeigt das Protein Hsh-N2, jedoch nicht das Protein Hsh-N1 Bindung an humanes Keratin 4. Somit konnte die Bindungsdomäne von Hsh an Keratin 4 zunächst auf 260 Aminosäuren eingegrenzt werden. In weiteren Western-Blot-Analysen mit den Proteinen Hsh-N2-N und Hsh-N2-C war eine Bindung des Proteins Hsh-N2-C, nicht aber des Proteins Hsh-N2-N an Keratin 4 festzustellen. Dadurch war es schließlich möglich, die Bindungsdomäne von Hsh an humanes Keratin 4 auf einen Bereich von 178 Aminosäuren innerhalb des Hsh-Proteins einzugrenzen.

Die Fähigkeit der verschiedenen Hsh-Fusionsproteine, an immobilisiertes, humanes Keratin 4 zu binden, wurde in ELISA- („enzyme-linked immunosorbent assay“) Experimenten quantifiziert. Hierzu wurde menschliches Keratin 4 an Plastikplatten immobilisiert und anschließend unterschiedliche Konzentrationen der verschiedenen Hsh-Fusionsproteine zugegeben. Gebundene Fusionsproteine wurden über Anti-HisTag-Antikörper und einen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper detektiert. Das Ergebnis dieses Versuches ist in **Abbildung 29** dargestellt.

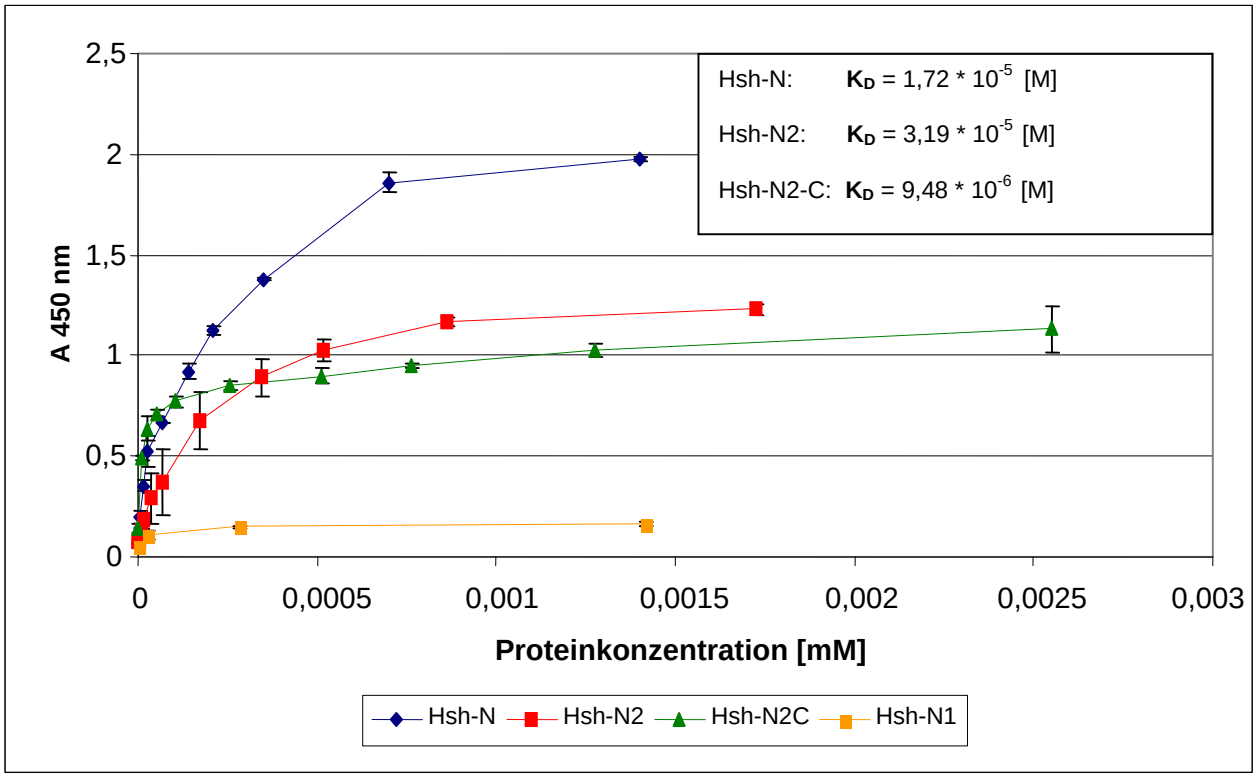


Abb. 29: Bindung unterschiedlicher Konzentrationen der Fusionsproteine Hsh-N, Hsh-N2 bzw. Hsh-N2-C an 2 µg immobilisiertes, humanes Keratin 4 im Capture-ELISA. Gebundene Fusionsproteine wurden über Anti-HisTag-Antikörper detektiert.

Aus **Abbildung 29** wird erneut deutlich, daß das Protein Hsh-N1 keine Bindung an immobilisiertes, menschliches Keratin 4 aufweist. Hingegen zeigen die Fusionsproteine Hsh-N, Hsh-N2 und Hsh-N2C eine konzentrationsabhängige Bindung an menschliches Keratin 4. Zur Bestimmung der Affinität der Keratin 4-Bindung der Hsh-Proteine erfolgte eine doppelt-reziproke Auftragung der erhaltenen Werte nach Lineweaver-Burk. Mit Hilfe folgender linearer Gleichung wurde die Dissoziationskonstante, der sog. K_D – Wert bestimmt:

$$(1 / A_{450}) = (m \bullet (1 / Konz))\ [M] + t$$

t: Verschiebung der Geraden auf der y-Achse
m: Steigung der Geraden

Der K_D-Wert entspricht (–1 / Konz) [M], wenn $(1 / A_{450}) = 0$

Mit Hilfe dieser Formel wurde für die Keratin 4-Bindung von Hsh-N ein K_D von $1{,}72 * 10^{-5}$ [M], für Hsh-N2 ein K_D von $3{,}19 * 10^{-5}$ [M] und für Hsh-N2-C ein K_D von $9{,}48 * 10^{-6}$ [M] errechnet. Somit zeigen diese Fusionsproteine im Vergleich zueinander eine etwa gleiche Affinität der Keratin 4-Bindung.

2.4. Identifizierung der Hsh-bindenden Domäne in humanen Keratin 4

Zusätzlich zur Keratin 4-bindenden Domäne des Hsh-Proteins aus *S. agalactiae* 6313 wurde die Hsh-bindende Domäne in humanen Keratin 4 identifiziert. Für diese Untersuchungen stand ein *E. coli*-Klon (RZPD, Berlin) zur Verfügung, der das Plasmid pOTB7-Krt4 trägt. Zur genauen Analyse dieses in **Abbildung 30** dargestellten Plasmids, wurde mit ausgewählten Primern dessen Insert vollständig sequenziert. Dabei konnte gezeigt werden, daß das Insert das vollständige und intakte, humane Keratin 4 Gen (*krt4*) trägt. In weiteren Versuchen wurde mittels PCR das komplette Insert mit dem Primerpaar krt4-N1 / krt4-C1, sowie der für den N-Terminus bzw. C-Terminus codierende DNA-Bereich mit dem Primerpaar krt4-N1 / krt4-NC1 bzw. krt4-CN1 / krt4-C1 aus dem Vektor pOTB7-Krt4 amplifiziert und die PCR-Produkte nach *Bam*HI- und *Hin*dIII-Verdau in den entsprechend geschnittenen Vektor pET28a kloniert. Die Ligationsansätze wurden in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert und rekombinante Klone auf LB-Kanamycin-Agarplatten selektiert. Plasmide mit den gewünschten Inserts wurden anschließend in den *E. coli*-Stamm ER2566 transformiert und Plasmid-tragende Klone wieder auf LB-Kanamycin-Agarplatten selektiert. Die resultierenden Plasmide wurde mit pET-Krt4G, pET-KrtN bzw. pET-Krt4C bezeichnet.

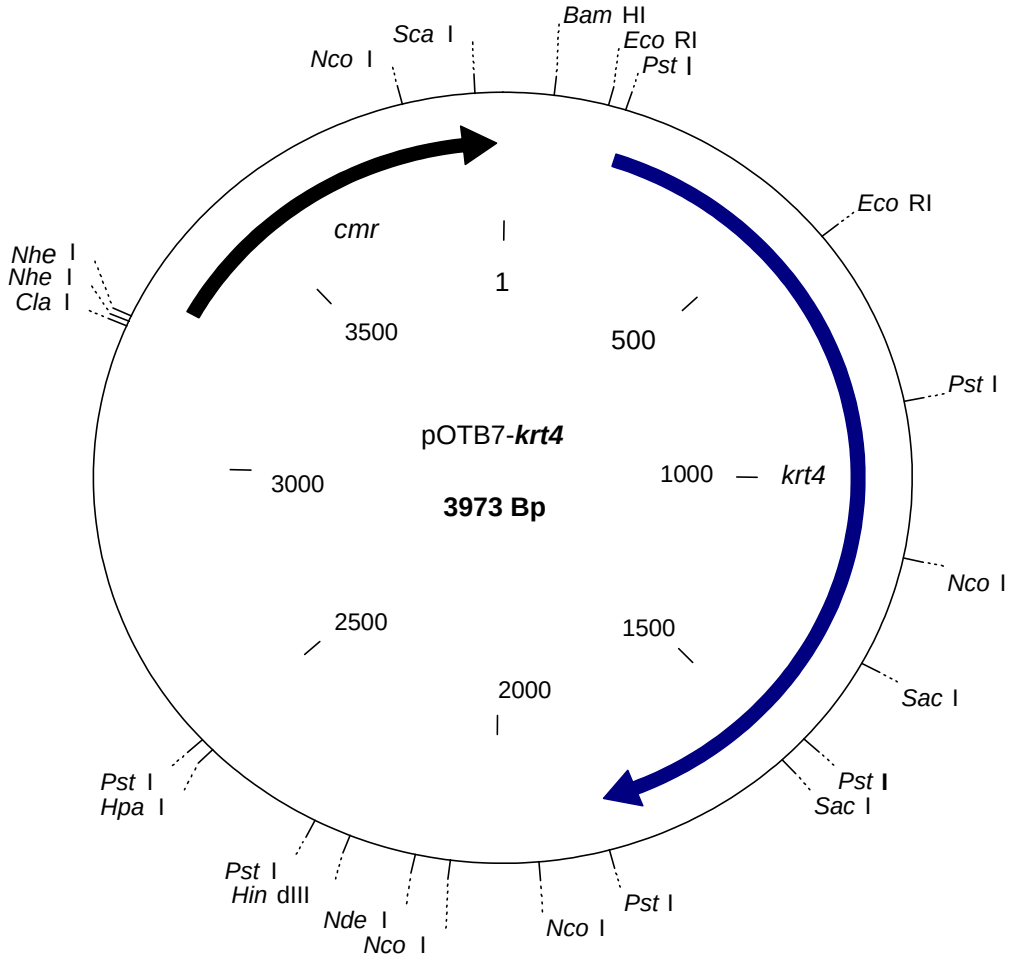


Abb. 30: Restriktionskarte des Plasmids pOTB7-Krt4 (full length clone IRALp962J1244Q), welches das gesamte humane Keratin 4 Gen (*krt4*) trägt.

Durch Gabe von IPTG zur entsprechenden *E. coli* ER2566-Kultur, wurde die Synthese des jeweiligen Krt4-Proteins induziert. Aliquots der Zellextrakte der *E. coli*-Klone ER pET-Krt4G, ER pET-Krt4N bzw. ER pET-Krt4C wurden im Anschluß über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung angefärbt. Erwartet wurde für das von pET-Krt4G codierte Keratin 4 Fusionsprotein eine molare Masse von 61 kDa, für den von pET-Krt4N codierten Keratin 4 N-Terminus eine molare Masse von 33 kDa und für den von pET-Krt4C codierten Keratin 4 C-Terminus eine molare Masse von 31 kDa. Wie aus **Abbildung 31** deutlich wird, werden alle drei Proteine in richtiger Größe von den jeweiligen *E. coli*-Stämmen in großen Mengen produziert.

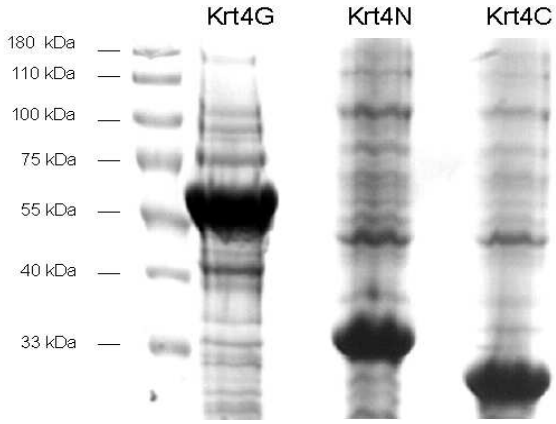


Abb. 31: Gelelektrophoretische Auftrennung der *E. coli*-Zellextrakte ER pET-Krt4G, ER pET-Krt4N bzw. ER pET-Krt4C nach Induktion mit 1 mM IPTG zur Produktion eines Keratin 4 Proteins in dessen gesamter Länge (Krt4G), sowie Derivaten, die den N-Terminus (Krt4N) bzw. den C-Terminus von Keratin 4 (Krt4C) tragen. Die Proteine wurden als Hexahistidyl-Fusionsproteine synthetisiert und über Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Zum spezifischen Nachweis der Keratin 4 Proteine im Zellextrakt der *E. coli*-Stämme, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Da die Fusionsproteine einen Hexahistidyl-Rest trugen, erfolgte der Nachweis der Proteine über Anti-HisTag-Antikörper. Parallel dazu wurden die Proteine auch über monoklonale Anti-Krt4-Antikörper detektiert. Das Ergebnis dieser Western Blot Analysen ist in **Abbildung 32** dargestellt.

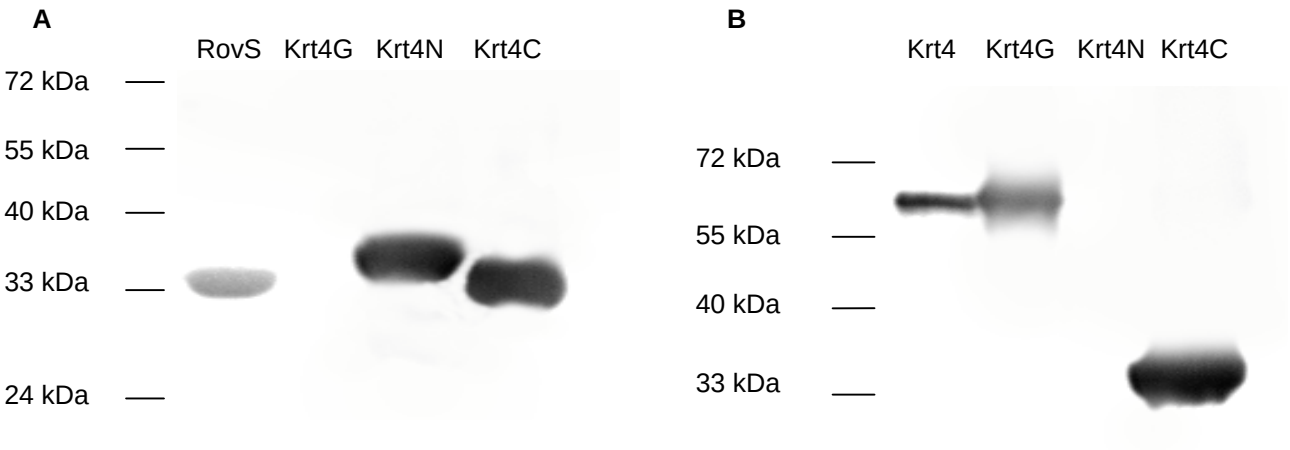


Abb. 32: Western Blot zum Nachweis der Keratin 4-Fusionsproteine Krt4G, Krt4N bzw. Krt4C in Zellextrakten von *E. coli* ER2566. Die Detektion der Proteine erfolgte über Anti-HisTag-Antikörper (**A**) bzw. über monoklonale Anti-Keratin 4-Antikörper (**B**). Gebundene Antikörper wurden durch Gabe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen und die Entwicklung erfolgte mittels Chemilumineszenz. Als Positivkontrolle wurde in (**A**) das Regulatorprotein RovS und in (**B**) aus humanem Speichel eluiertes Keratin 4 verwendet.

Wie aus **Abbildung 32** hervorgeht, wurden mit Anti-HisTag-Antikörpern nur die Keratin 4-Proteine Krt4N und Krt4C, nicht jedoch das Protein Krt4G, das dem gesamten Keratin 4 Protein entspricht, detektiert. Da durch Sequenzierung des Plasmids pET-Krt4G kein Rasterschub im *krt4* Gen gefunden wurde, kann vermutet werden, daß eine ungünstige Faltung des Proteins und somit ein verdeckter HisTag Ursache für die fehlende Detektion des Krt4G-Proteins über Anti-HisTag-Antikörper war. Die erhaltenen Ergebnisse lassen jedoch den Schluß zu, daß eine Aufreinigung des Krt4G-Proteins, aufgrund seines verdeckten HisTags, über Ni^{2+}-Affinitätschromatographie nicht möglich ist. Mit Hilfe monoklonaler Anti-Keratin 4-Antikörper wurden im Western Blot die Proteine Krt4G und Krt4C, nicht jedoch das Protein Krt4N detektiert. Dies läßt vermuten, daß der monoklonale Anti-Keratin Antikörper ein Epitop am C-Terminus des Keratin 4 Proteins erkennt und dieses bindet.

Mit Hilfe der aufgereinigten Fusionsproteine Krt4N und Krt4C, sowie des Zellextraktes aus *E. coli* ER2566 pET-Krt4G, war es möglich, Studien zur Hsh-bindenden Domäne in humanem Keratin 4 durchzuführen. Das Ergebnis der dazu vorgenommenen Western Blot Analyse ist in **Abbildung 33** dargestellt.



Abb. 33: Western Blot Analyse zur Untersuchung der Bindung von Hsh-N an humanes Keratin 4, sowie an dessen N- bzw. C-Terminus, und schematische Darstellung des humanen Keratin 4 und der Derivate Krt4-N und Krt4-C. Zellextrakt des *E. coli*-Stammes ER2566 pET-Krt4G sowie aufgereinigtes Fusionsprotein Krt4N bzw. Krt4C wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Durch Zugabe von etwa 250 µg des aufgereinigten Fusionsproteins Hsh-N wurde dessen Bindung an die Keratin 4-Derivate Krt4G, Krt4N bzw. Krt4C analysiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte über Hsh-spezifische Erstantikörper und einen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper mittels Chemilumineszenz.

Wie **Abbildung 33** zeigt, konnte die Bindung des N-Terminus von Hsh an humanes Keratin 4 bestätigt werden. Des Weiteren wurde die Bindung des Fusionsproteins Hsh-N an das Protein Krt4C detektiert. Eine Bindung von Hsh-N an das Fusionsprotein Krt4N konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses Resultat deutet an, daß die Hsh-bindende Domäne des humanen Keratin 4 Proteins in dessen C-terminalen 279 Aminosäuren lokalisiert ist.

2.5. Untersuchung zur Bindung von Hsh an Fibrinogen

BLAST-Analysen mit der Proteinsequenz des N-Terminus von Hsh ergaben eine 25 %ige Identität dieses Proteins zu SdrE aus *Staphylococcus aureus* (O'Brien *et al*, 2002) bzw. SdrG aus *Streptococcus epidermidis* (Davis *et al*, 2001). Für diese Proteine wurden bereits in unterschiedlichen Studien Fibrinogen-bindende Eigenschaften nachgewiesen. Aus diesem Grund galt es auch für Hsh aus *S. agalactiae* zu klären, ob dieses Protein in der Lage ist, an Fibrinogen zu binden. Dazu wurden Western Blot Experimente durchgeführt, in denen Hsh-Protein zunächst über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen wurde. Anschließend wurde zu der Membran natives Fibrinogen aus Mensch, Hund, Schaf bzw. Rind gegeben. Der Nachweis der Fibrinogen-Bindung erfolgte mittels Kaninchen-Anti-Fibrinogen-Antikörper, die ihrerseits mit Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper über Chemilumineszenz detektiert wurden. Dabei konnte weder für humanes Fibrinogen noch für Fibrinogen aus Hund bzw. Schaf Bindung an denaturiertes Hsh-Protein nachgewiesen werden. Allerdings wurde Bindung von nativem Rinderfibrinogen an das Hsh-Protein detektiert (Ergebnis nicht gezeigt).

Um die Bindung von Hsh an Rinderfibrinogen zu bestätigen und um zu untersuchen, an welche Fibrinogen-Untereinheit Hsh bindet, wurden erneut Western Blot Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse in **Abbildung 34** zusammengefaßt sind. Der aufgereinigte Hsh-N-Terminus wurde zusammen mit bovinem Fibrinogen über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Zur Membran wurde anschließend natives Hsh-N-Protein gegeben. Der Nachweis der Bindung von Hsh-N an die einzelnen Untereinheiten des Rinderfibrinogens erfolgte mittels Maus-Anti-Hsh-Antikörper, die wiederum mit Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper über Chemilumineszenz detektiert wurden. In einem zweiten Ansatz wurde nur Rinderfibrinogen über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und anschließend mittels Kaninchen-Anti-Fibrinogen-

Antikörper, die ihrerseits mit Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper über Chemilumineszenz detektiert wurden, nachgewiesen. Ein Vergleich der beiden Western-Blots machte die Identifizierung der Hsh-N-gebundenen Fibrinogen-Untereinheiten möglich.

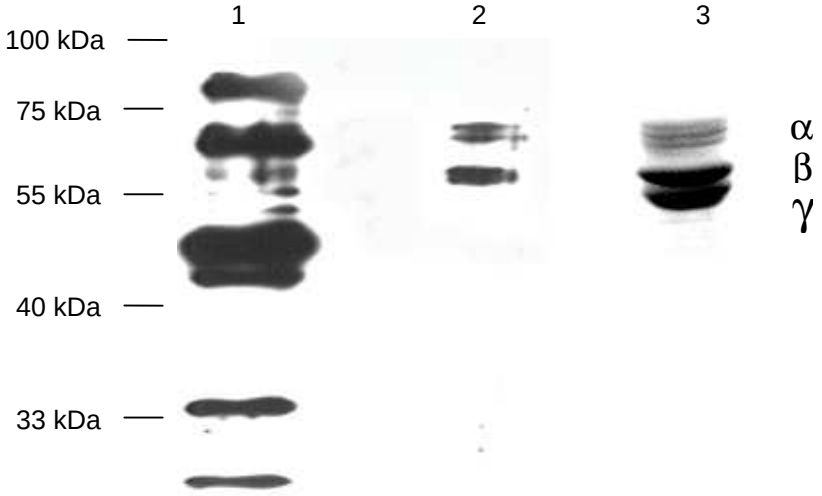


Abb. 34: Western Blot–Analyse zur Identifizierung der Hsh - bindenden Untereinheit von bovinem Fibrinogen. Rinderfibrinogen wurde mittels SDS-PAGE in die einzelnen Untereinheiten aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und auf die Bindung von Hsh-Fusionsprotein getestet. Der Nachweis von Hsh als Positivkontrolle (**1**) und an Rinderfibrinogen gebundenem Hsh-Protein (**2**) erfolgte durch Anti-HisTag-Antikörper und einen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Die Detektion wurde durch Chemilumineszenz durchgeführt. Die einzelnen Fibrinogenuntereinheiten wurden zur Größenbestimmung durch Anti-Fibrinogen-Antikörper nachgewiesen (**3**).

Wie **Abbildung 34** zeigt, bindet der N-Terminus von Hsh sowohl an die alpha- als auch an die beta-Untereinheit von Rinderfibrinogen, nicht jedoch an dessen gamma-Untereinheit. Um die Fibrinogen-bindende Domäne des Hsh-Proteins näher zu definieren, wurden die bereits in **Abbildung 26** dargestellten Hsh-Fusionsproteine in Western-Blot-Experimenten auf ihre Bindung an Rinderfibrinogen untersucht. Dazu wurden die Protein Hsh-N, Hsh-N1, Hsh-N2, Hsh-N2-N bzw. Hsh-N2-C sowie Rinderfibrinogen über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend wurde zu der Membran natives Fibrinogen vom Rind gegeben. Der Nachweis der Fibrinogen-Bindung erfolgte mittels Kaninchen-Anti-Fibrinogen-Antikörper, die ihrerseits mit Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper über Chemilumineszenz detektiert wurden. Das Ergebnis dieses Western Blots ist in **Abbildung 35** gezeigt.

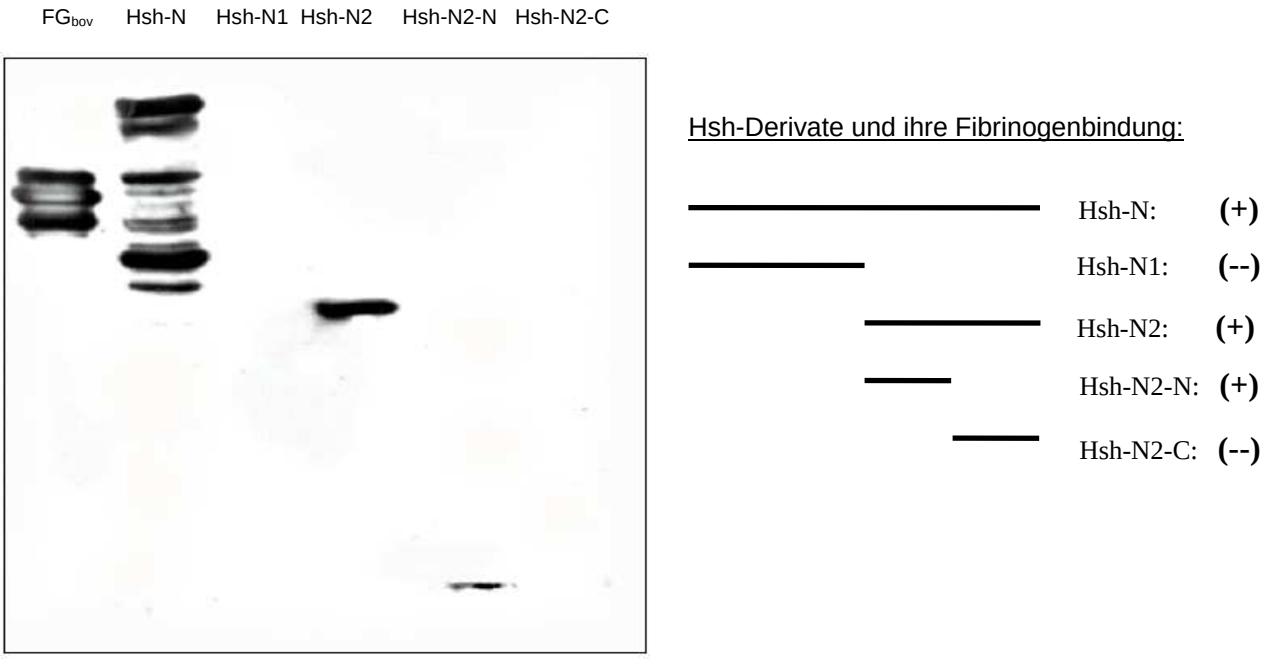


Abb. 35: Western Blot Analyse der Bindung der Proteine Hsh-N, Hsh-N1, Hsh-N2, Hsh-N2-N bzw. Hsh-N2-C an natives Rinderfibrinogen und schematische Darstellung der verwendeten Hsh-Derivate inklusive ihres Bindungsverhaltens ((+) oder (--)) an Rinderfibrinogen. Die gereinigten Hsh-Fusionsproteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und auf ihre Fähigkeit, Rinderfibrinogen zu binden getestet. Der Nachweis gebundenen Fibrinogens erfolgte über Anti-Fibrinogen-Antikörper und einen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz.

Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, bindet natives Rinderfibrinogen an die Proteine Hsh-N, Hsh-N2 bzw. Hsh-N2-N. Somit wurde die Rinderfibrinogen-bindende Domäne des Hsh-Proteins auf einen Bereich von 102 Aminosäuren in dessen N-Terminus eingegrenzt.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie für das Hsh-Protein sowohl Bindung an humanes Keratin 4 als auch Bindung an Rinderfibrinogen nachgewiesen werden. Dabei sind im Hsh-Protein die beiden Bindungsdomänen in dessen N-Terminus lokalisiert, jedoch finden sie sich in unterschiedlichen N-terminalen Bereichen von Hsh.

2.6. Bedeutung des Hsh-Proteins für die Virulenz von *S. agalactiae* 6313

Herstellung und Nachweis einer *hsh*-Deletionsmutante

Um den Einfluß von Hsh auf die Virulenz von *S. agalactiae* zu untersuchen, wurde eine *hsh*-Deletionsmutante hergestellt. Aufgrund der bereits gezeigten Bedeutung des N-Terminus von Hsh für die Bindung der Bakterien an eukaryotische Proteine, wurde nicht das komplette *hsh*-Gen deletiert, sondern nur der für den N-Terminus codierende Genombereich von 1923 Bp. Die Konstruktion der *hsh*-Deletionsmutante erfolgte analog zu der in **Abbildung 2** und **Abbildung 3** dargestellten Konstruktion einer *rovS*-Deletionsmutante. Das resultierende Plasmid wurde als pGΔ*hsh* bezeichnet. Die erfolgreiche Deletion des 5´-Endes des *hsh*-Gens in *S. agalactiae* 6313 wurde im Southern-Blot analysiert. Dazu wurde chromosomale DNA des Wildtyps und einer potentiellen *hsh*-Deletionsmutante mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI verdaut und über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Nach Übertragung der DNA auf eine Nitrocellulosemembran, wurde diese mit einer DNA-Sonde hybridisiert, die mit den Primern hsh-SB1 und hsh-SB2 hergestellt und mit Digoxigenin markiert worden war. Die *Eco*RI-verdaute chromosomale DNA des *S. agalactiae* Wildtyps 6313 zeigte auf einem Röntgenfilm ein Signal bei etwa 6,8 kBp. Eine *hsh*-Deletionsmutante lieferte hingegen ein Signal bei ca. 5,2 kBp. Da die Deletion des 5´-Endes des *hsh*-Gens zu einem Verlust von etwa 1,6 kBp im Genom von *S. agalactiae* führt, belegt das Ergebnis dieses Southern Blots, daß der für den N-Terminus des *hsh*-Gens codierende Bereich im Genom von *S. agalactiae* 6313 erfolgreich deletiert wurde. Die entsprechende Mutante wurde als *S. agalactiae ΔhshN* bezeichnet. In **Abbildung 36** ist das Ergebnis des beschriebenen Southern Blots dargestellt.

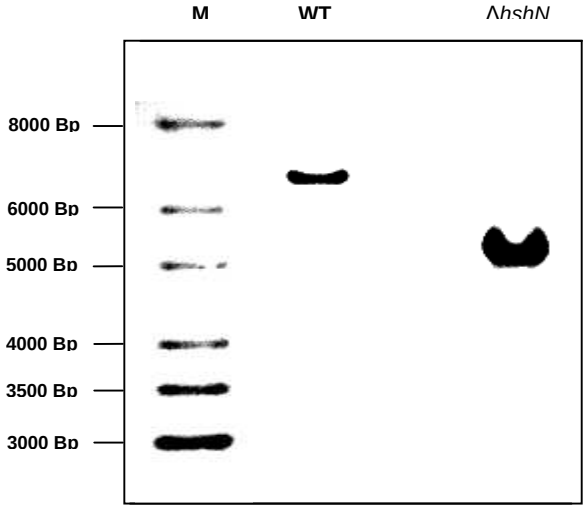


Abb. 36: Southern-Blot-Analyse zum Nachweis der Deletion des 5´-Bereichs des *hsh*-Gens in *S. agalactiae* 6313.

Konstruktion des Komplementationsplasmids pAT*hsh*

Um die Deletion des 5´-Endes des *hsh*-Gens zu komplementieren, wurde das komplette *hsh*-Gen, zusammen mit seinem eigenen Promoter, über PCR mit den Primern hsh komp1 und hsh komp2 aus chromosomaler DNA des *S. agalactiae* Wildtyps 6313 amplifiziert. Das daraus resultierende PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Kpn*I und *Bam*HI geschnitten und in den entsprechend verdauten Shuttlevektor pAT19 ligiert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in den *E. coli*-Stamm DH5α wurden Plasmid-tragende Klone auf LB-Erythromycin-Agarplatten selektiert. Das resultierende Plasmid, bei dem das *hsh*-Gen unter Kontrolle seines eigenen Promoters steht, wurde als pAT*hsh* bezeichnet und ist in **Abbildung 37** dargestellt. Das Plasmid pAT*hsh* wurde in die *hshN*-Deletionsmutante transformiert, wobei hier auf THY-Erythromycin-Agarplatten selektiert wurde. Das entsprechende Ausgangsplasmid pAT19 wurde zusätzlich in den *S. agalactiae* Wildtyp 6313 und die *hshN*-Deletionsmutante transformiert, um bei späteren Untersuchungen plasmidbedingte Effekte ausschließen zu können.

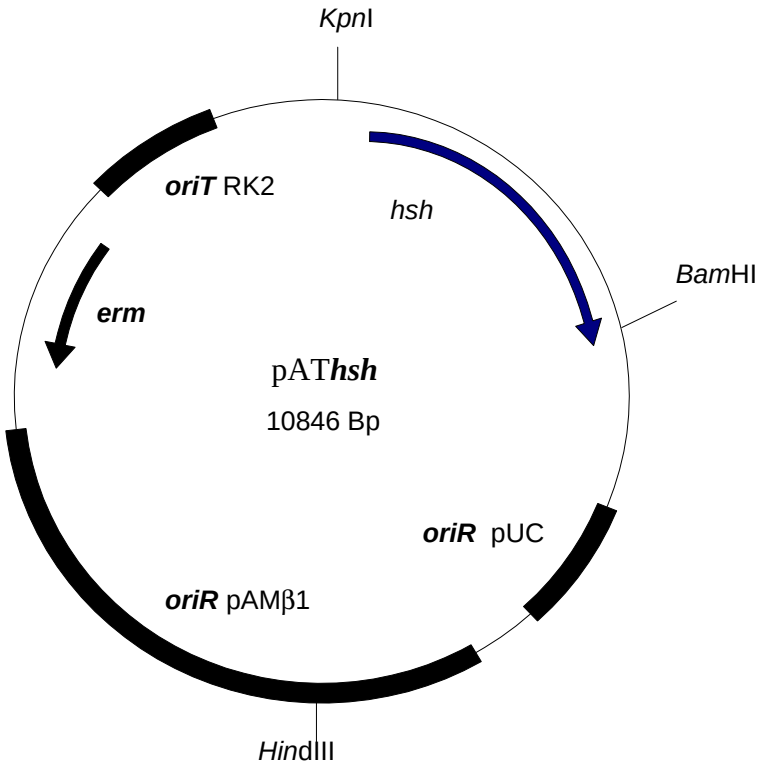


Abb. 37: Restriktionskarte des Plasmids pAT*hsh* zur Komplementation der *hsh*-Deletion in *S. agalactiae* 6313. Als Ausgangsplasmid diente der Shuttelvektor pAT19.

Bedeutung von Hsh für die Bindung von *S. agalactiae* an humanes Keratin 4

In vorangegangenen Experimenten konnte bereits auf molekularer Ebene nachgewiesen werden, daß Hsh an humanes Keratin 4 bindet. Um die Frage zu klären, ob Hsh auch die Bindung von *S. agalactiae* an humanes Keratin 4 vermittelt, wurden Proteinbindungsversuche mit den *S. agalactiae*-Stämmen 6313 pAT19, Δ*hshN* pAT19 bzw. Δ*hshN* pAT*hsh* durchgeführt. Quantifiziert wurde die Bindung der mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten Bakterien an humanes Keratin 4, das in Mikrotiterplatten immobilisiert worden war. Immobilisiertes Kollagen diente auch hier als Negativkontrolle. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse erfolgten die Messungen wieder in mehreren, voneinander unabhängigen Versuchsreihen. Das Versuchsergebnis, das unter Verwendung von humanem Keratin erzielt wurde, ist in **Abbildung 38** dargestellt.

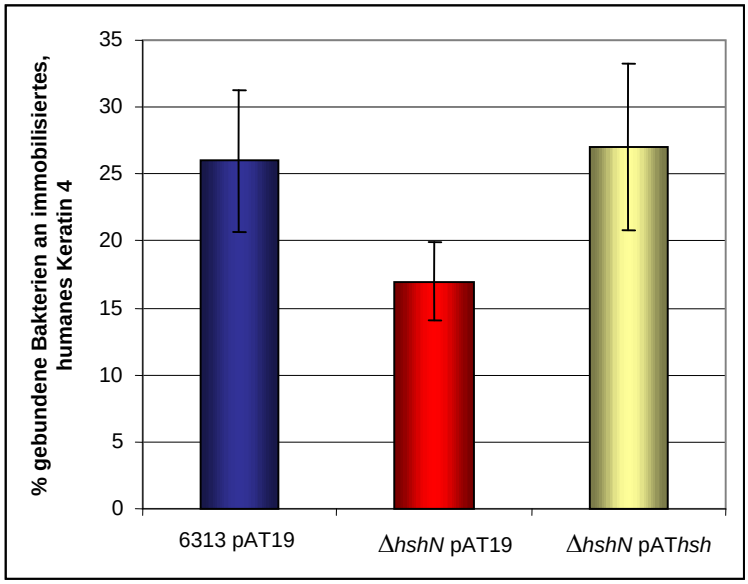


Abb. 38: Bindungsverhalten der *S. agalactiae*-Stämme 6313 pAT19, Δ*hshN* pAT19 bzw. Δ*hshN* pAT*hsh* an immobilisiertes, humanes Keratin 4. Die Versuche wurden mit FITC-markierten Bakterien aus der stationären Wachstumsphase durchgeführt. Die Bindung der Bakterien an die humanen Proteine wurde bezogen auf die Gesamtmenge an Bakterien, die in den Versuch eingesetzt wurde.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, zeigten 26 % der eingesetzten Zellen des *S. agalactiae* Wildtyps 6313 Bindung an humanes Keratin 4. Von der *hsh*-Deletionsmutante Δ*hshN* pAT19 wiesen 19 % der eingesetzten Zellen Bindung an Keratin 4 auf. Im Vergleich zum Ausgangsstamm besitzt die *hsh*-Deletionsmutante somit eine um 35 % erniedrigte Keratin 4-Bindung. Hingegen zeigten 27 % der in den Versuch eingesetzten Bakterien des Stammes Δ*hshN* pAT*hsh*, der eine plasmidvermittelte *hsh*-Expression aufweist, Bindung an

immobilisiertes Keratin 4. Dieser Wert ist identisch mit dem des *S. agalactiae*-Wildtyps. Die erhaltenen Ergebnisse deuten somit an, daß das Protein Hsh in *S. agalactiae* 6313 Einfluß auf die Bindung der Bakterien an humanes Keratin 4 nimmt.

Einfluß von *hsh* auf die bakterielle Adhärenz an eukaryotische Zellen

Um die Bedeutung des *hsh*-Gens auf die Pathogenität von *S. agalactiae* 6313 eingehender zu untersuchen, wurden Adhärenz- und Invasionsversuche mit humanen A549-Lungenepithelzellen durchgeführt. Verwendet wurden dabei der *S. agalactiae* Wildtyp 6313 und die entsprechende *hsh*-Deletionsmutante. Die erhaltenen Ergebnisse wurden als Absolutwerte angegeben und jeweils mit den Werten des Wildtyps verglichen. **Abbildung 39** zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse aus drei unabhängigen Zellkulturversuchen.

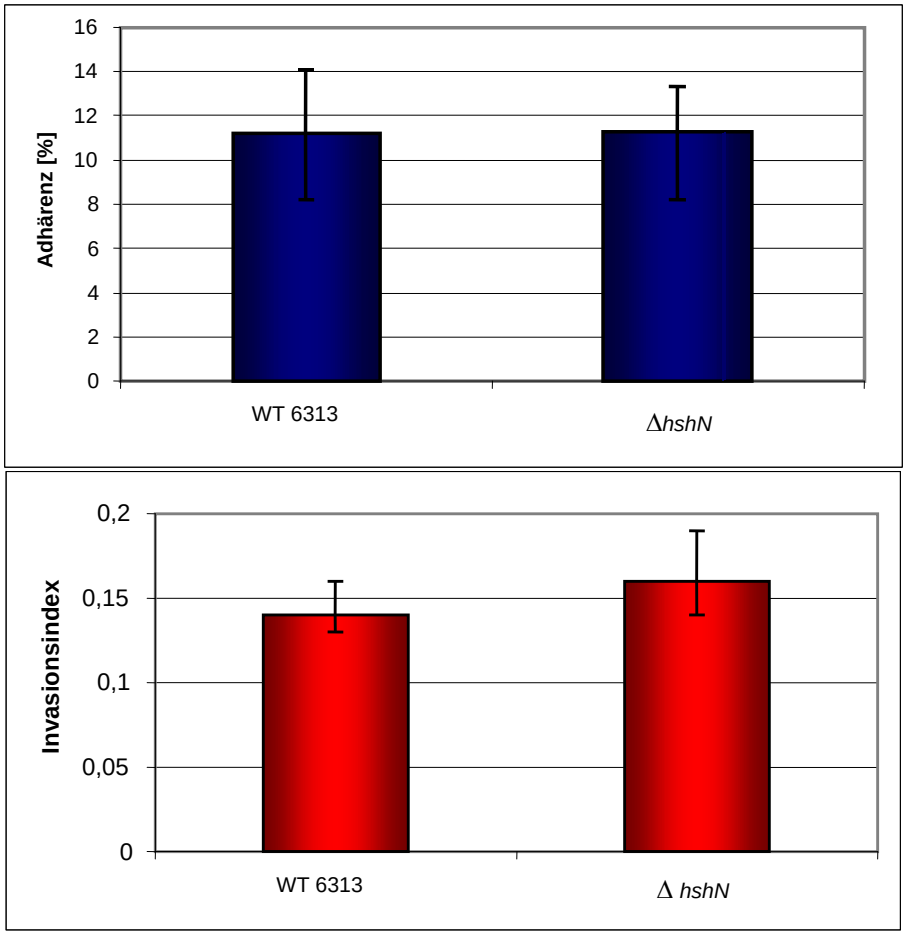


Abb. 39.: Adhärenz- und Invasionsverhalten der *S. agalactiae* Stämme 6313 und 6313 Δ*hshN* mit der Lungenepithelzelllinie A549.

Wie aus **Abbildung 39** ersichtlich wird, führt ein Verlust von Hsh in *S. agalactiae* 6313 zu keiner veränderten Adhärenz an und Invasion in die verwendete Lungenepithelzelllinie A549.

Da der Interaktionspartner von Hsh, humanes Keratin 4, ausschließlich von Zellen des Mund- bzw. Rachenraumes synthetisiert wird, wurde für weitere Zellkulturversuche die humane Rachenepithelzelllinie HEp2 verwendet. Getestet wurden dabei die *S. agalactiae*-Stämmen 6313 pAT19, Δ*hshN* pAT19 bzw. Δ*hshN* pAT*hsh*. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurden die entsprechenden Versuche in mehreren voneinander unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden erneut als Absolutwerte angegeben und jeweils mit den Werten des Wildtyps verglichen (s.o.). Das dabei erzielte Endergebnis ist in **Abbildung 40** dargestellt.

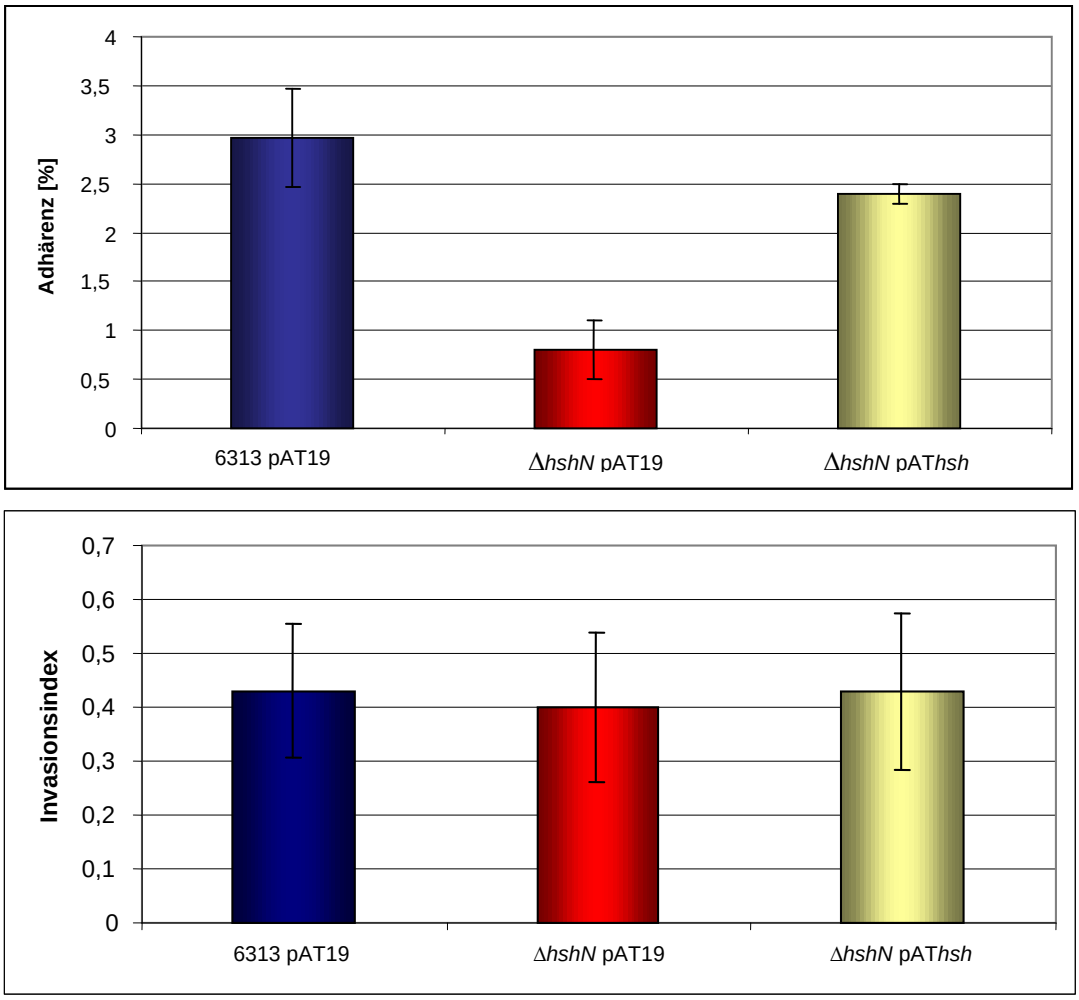


Abb. 40: Adhärenz- und Invasionsverhalten der *S. agalactiae*-Stämme 6313 pAT19, Δ*hshN* pAT19 bzw. Δ*hshN* pAT*hsh* mit der humanen Rachenepithelzelllinie HEp2. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Lebendzellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Wachstum in Zellkulturmedium. Der Invasionsindex stellt den Quotienten aus invasiven und adhärenten Bakterien dar.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß die Adhärenz der *hsh*-Deletionsmutante an die Rachenepithelzelllinie HEp2 um 75% niedriger ist, als die des Wildtyps. Hingegen weist die *hsh*-Komplementante eine zum Wildtyp vergleichbare Adhärenz auf. Diese Ergebnisse deuten an, daß eine Deletion des *hsh*-Gens deutlich Einfluß auf die Adhärenz von *S. agalactiae* 6313 an HEp2-Rachenepithelzellen nimmt und daß dieser Einfluß durch eine plasmidvermittelte Expression von *hsh* komplementiert werden kann. Wie aus **Abbildung 40** weiter hervorgeht, scheint der Verlust von Hsh hingegen keine Rolle bei der bakteriellen Invasion zu spielen.

Um zu analysieren, ob das Hsh-Protein direkt an der Adhärenz der Bakterien an HEp2-Racheneptihelzellen beteiligt ist, wurde der Einfluß gereinigten Hsh-Fusionsproteins auf das Adhärenz- und Invasionsverhalten des *S. agalactiae*-Stammes 6313 untersucht. Getestet wurde der aus 660 Aminosäuren bestehende N-Terminus von Hsh und die aus 178 Aminosäuren bestehende Keratin 4-bindende Domäne Hsh-N2-C. Als Kontrolle wurde gereinigtes Bsp-Protein verwendet, welches ebenfalls ein Oberflächenprotein aus *S. agalactiae* darstellt. Aus Vorversuchen war bereits bekannt, daß Bsp keinen Einfluß auf das Adhärenz- bzw. Invasionsverhalten von *S. agalactiae* 6313 an bzw. in Epithelzellen hat. Das Ergebnis aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Kompetitionsversuchen ist in **Abbildung 41** dargestellt.

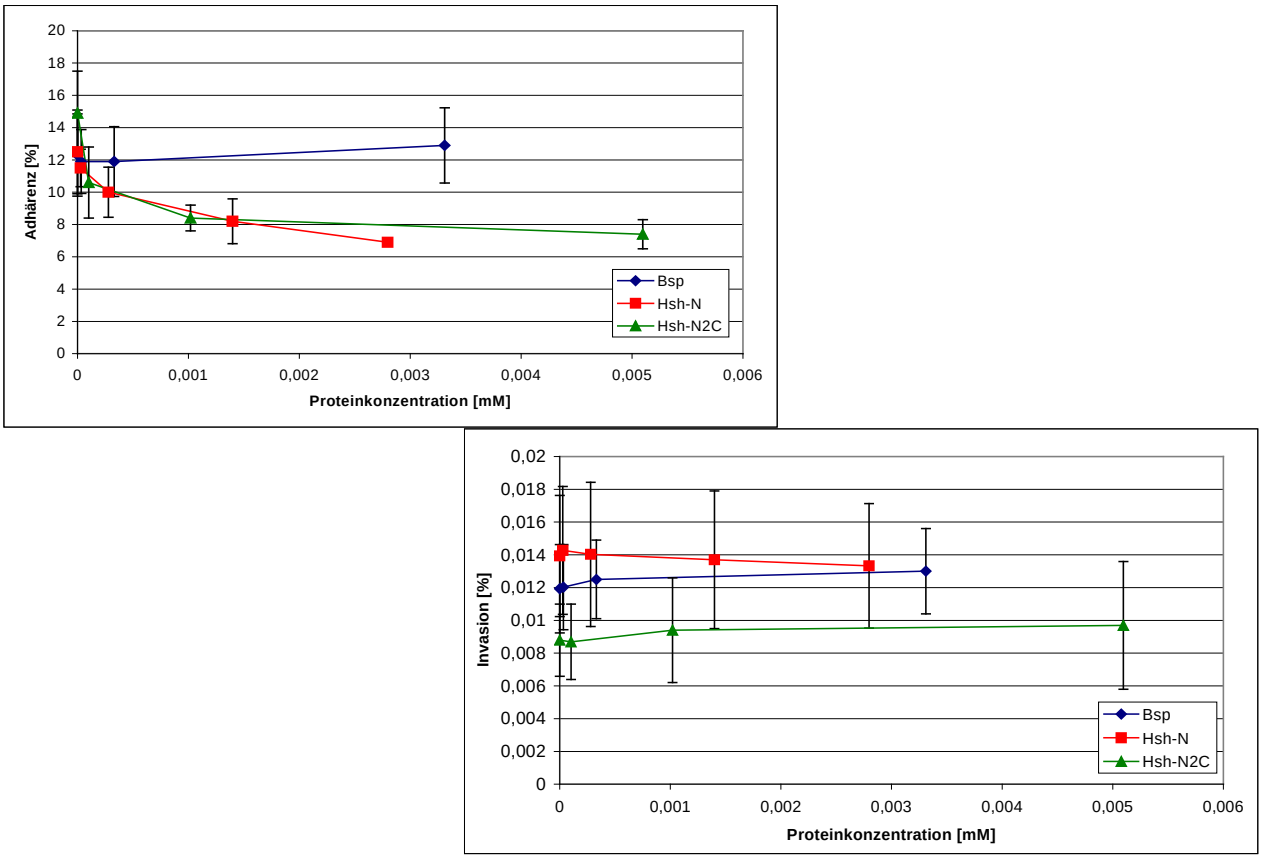


Abb. 41: Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen der Fusionsproteine Hsh-N, Hsh-N2-C bzw. Bsp auf das Adhärenz- und Invasionsverhalten von *S. agalactiae* 6313 mit HEp2-Zellen.

Wie aus **Abbildung 41** hervorgeht, hat die Zugabe steigender Mengen an Bsp-Protein keinen Einfluß auf das Adhärenz- und Invasionsverhalten von *S. agalactiae* 6313. Auch verändern steigende Konzentrationen der eingesetzten Hsh-Fusionsproteine nicht die bakterielle Invasion in HEp2-Zellen. Hingegen führt die Zugabe der Hsh-Proteine zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der bakteriellen Adhärenz. So führt eine Konzentration von 0,003 mM an Hsh-N bzw. Hsh-N2-C zu einer ca. 50 %igen Hemmung der Adhärenz von *S. agalactiae* 6313 an HEp2-Zellen. Dieses Resultat deutet somit an, daß das Hsh-Protein an der bakteriellen Adhärenz an humane Rachenepithelzellen direkt beteiligt ist, wobei die Keratin 4 bindende Domäne im Protein Hsh-N2-C dabei eine Rolle zu spielen scheint.

Nachweis von Keratin 4 in eukaryotischen Zellfraktionen

Aufgrund des unterschiedlichen Einflusses von Hsh auf das Bindungsverhalten von *S. agalactiae* an A549- bzw. HEp2-Zellen, wurden Zellfraktionen beider Zelllinien im Western Blot mittels monoklonaler Anti-Krt4-Antikörper auf das Vorhandensein von humanem Keratin 4 untersucht. **Abbildung 42** zeigt das Ergebnis des durchgeführten Western Blots.

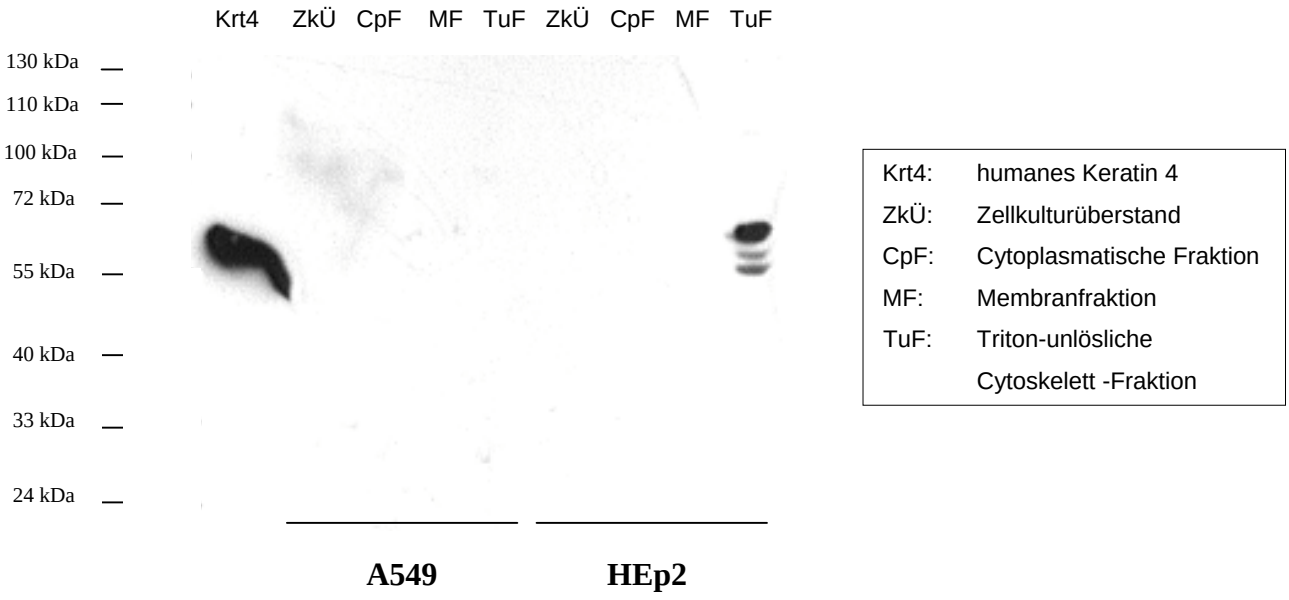


Abb. 42: Western Blot Analyse zum Nachweis von humanem Keratin 4 in Zellfraktionen der Lungenepithelzelllinie A549 bzw. der Rachenepithelzelllinie HEp2. Die Zellfraktionen beider Zelllinien wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mittels monoklonaler Anti-Keratin 4-Antikörper auf die Präsenz von Keratin 4 getestet. Der Nachweis gebundener Anti-Keratin 4-Antikörper erfolgte über Peroxidase-markierte Anti-Maus-Antikörper mit anschließender Detektion mittels Chemilumineszenz.

Wie in **Abbildung 42** zu erkennen ist, konnte in keiner der Zellfraktionen der Lungenepithelzellline A549 humanes Keratin 4 nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Zellkulturexperimente, in denen kein Einfluß von Hsh auf die Adhärenz von *S. agalactiae* an A549-Zellen gezeigt wurde. Wie aus **Abbildung 42** weiter hervorgeht, ist in der Triton-unlöslichen Cytoskelett-Fraktion der Rachenepithelzelllinie HEp2 humanes Keratin 4 eindeutig nachzuweisen. Diese Tatsache unterstützt somit auch die Ergebnisse der durchgeführten Zellkulturversuche mit dieser Zelllinie. Im Bezug auf die Adhärenz von *S. agalactiae* an die humane Rachenepithelzelllinie HEp2 scheint es somit ein direktes Zusammenspiel zwischen dem Hsh-Protein der Bakterien und dem Keratin 4 der verwendeten Zelllinie zu geben.

2.7. Epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung des *hsh*-Gens in *S. agalactiae*

Um Informationen über die Verbreitung des *hsh*-Gens innerhalb verschiedener *S. agalactiae*-Stämme zu erhalten, wurde chromosomale DNA von mehr als 100 *S. agalactiae*-Stämmen mittels PCR auf die Präsenz des *hsh*-Gens getestet. **Abbildung 43** zeigt die Lage und die Orientierung der für die PCR-Analyse eingesetzten Primerpaare hsh_N / hsh_C bzw. hsh_Cterm-N1 / hsh_Cterm_C1. In **Abbildung 44** sind die für 24 der getesteten Stämme erhaltenen PCR-Produkte nach Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. **Tabelle 8** gibt die Bezeichnung und den Serotyp der in **Abbildung 44** gezeigten *S. agalactiae*-Stämme wieder.

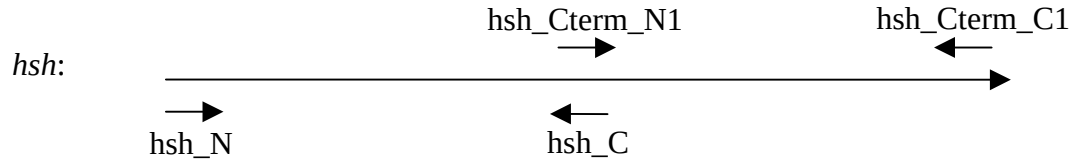


Abb. 43: Lage der für die PCR-Analyse zur Verbreitung des *hsh*-Gens verwendeten Primerpaare hsh_N / hsh_C bzw. hsh_Cterm_N1 / hsh_Cterm_C1 im *hsh*-codierenden Bereich von *S. agalactiae*.

Tab. 8: Auflistung der 24 *S. agalactiae* Stämme, deren Ergebnis der PCR-Analyse zur Verbreitung des *hsh*-Gens in **Abb. 44** dargestellt ist.

1)	126 H4A	7)	516353	13)	D1360 S3	19)	3625
2)	3978	8)	3916	14)	12351	20)	2670
3)	3979	9)	O176 H4A	15)	1121	21)	Mastitisisolat I
4)	3896	10)	6313	16)	2114	22)	Mastitisisolat II
5)	3910	11)	Nem316	17)	4290	23)	Mastitisisolat III
6)	0151 H4A	12)	4416	18)	651A	24)	Mastitisisolat IV

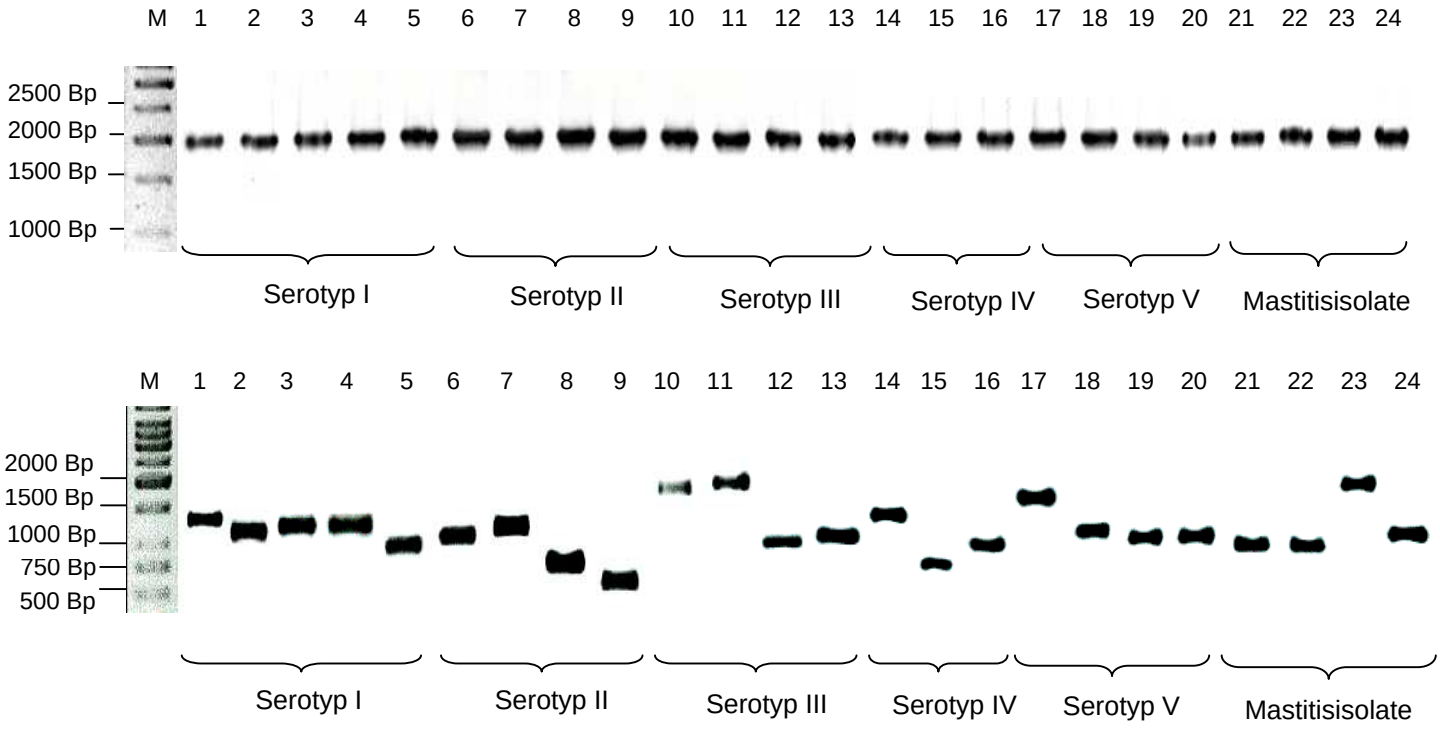


Abb. 44: Agarose-Gelelektrophorese der mit den Primerpaaren hsh_N / hsh_C bzw. hsh_Cterm_N1 / hsh_Cterm_C1 erhaltenen PCR-Produkte aus chromosomaler DNA von 24 verschiedenen *S. agalactiae*-Stämmen.

Wie **Abbildung 44** zu entnehmen ist, wurde bei allen der getesteten *S. agalactiae*-Stämme mit Hilfe der *hsh*-spezifischen Primerpaare ein PCR-Produkt erhalten, was auf eine weite Verbreitung von *hsh* in *S. agalactiae* hindeutet. Darüber hinaus weisen die PCR-Produkte des 5´-Endes von *hsh* in allen getesteten Stämmen die gleiche Größe von etwa 2 kBp auf. Die PCR-Produkte des 3´-Endes von *hsh* hingegen variieren in ihrer Größe zwischen 600 Bp und 2000 Bp zwischen den verschiedenen *S. agalactiae*-Stämmen. Die unterschiedlich großen Amplifikate sind dabei in jedem Serotyp der getesteten Stämme nachzuweisen und kommen in jedem Serotyp parallel vor. Diese Befunde deuten an, daß der 3´-terminale Bereich von *hsh* in *S. agalactiae* eine signifikante Größenvarianz aufweist. Hingegen ist das 5´-Ende des *hsh*-Gens, welches für die Untersuchungen zum Einfluß von Hsh auf die Pathogenität der von *S. agalactiae* in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, in Bezug auf seine Größe hoch konserviert.

2.8. Nachweis des Hsh-Proteins auf der Oberfläche von *S. agalactiae* 6313

Abschließend wurde untersucht, ob das Hsh-Protein im Stamm *S. agalactiae* 6313 tatsächlich zellwandgebunden vorliegt. Dazu wurde das Hsh-Protein auf der Oberfläche der Bakterien durch Immunofluoreszenz detektiert. Hierzu wurden zunächst A549-Zellen mit den *S. agalactiae*-Stämmen 6313 bzw. 6313 Δ*hshN* infiziert. Ungebundene Bakterien wurden nach einer zweistündigen Inkubationszeit durch Waschen entfernt und die adhärenten Bakterien anschließend fixiert. Nach dem Fixieren der Bakterien wurden zunächst freie Bindungsstellen durch BSA abgesättigt. Daraufhin wurden die Bakterien zunächst mit dem polyklonalen Anti-Hsh-Antikörper H4 und anschließend mit TRITC-markierten Anti-Maus-Antikörpern inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die Proben wiederum fixiert und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. In **Abbildung 45** ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Als Positivkontrolle wurden die genannten Stämme in einem parallelen Ansatz mit monoklonalen Anti-FbsA-Antikörpern inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze, welche nur mit dem Zweitantikörper inkubiert wurden.

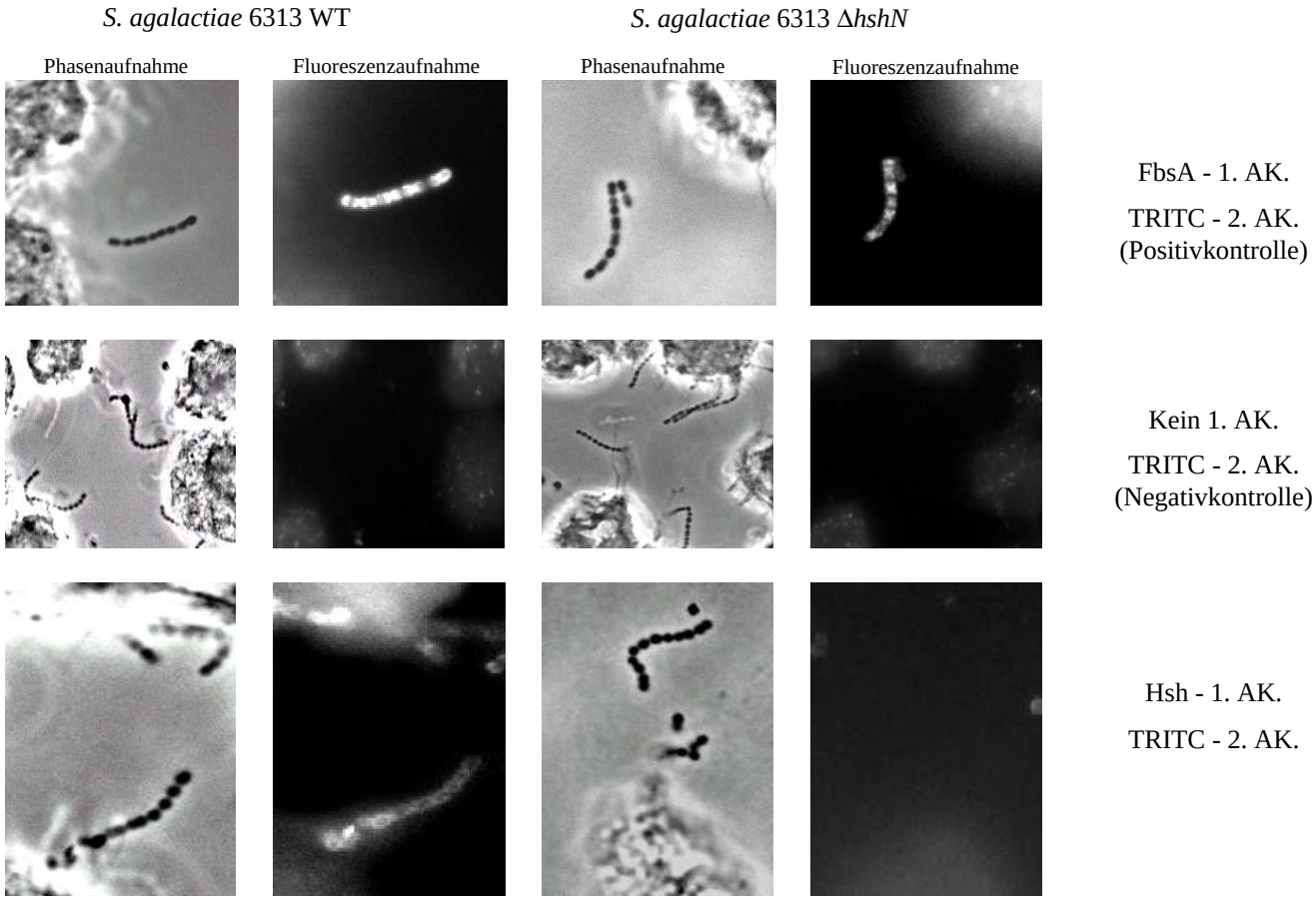


Abb. 45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *S. agalactiae* 6313 bzw. 6313 Δ*hshN* auf A549-Zellen zur Detektion des Hsh-Proteins auf der Oberfläche der Bakterien.

Wie den gezeigten Phasenaufnahmen der einzelnen Proben zu entnehmen ist, konnten in jedem Ansatz langkettige Streptokokken nachgewiesen werden. Dies zeigt, daß sowohl der *S. agalactiae* Wildtyp 6313 als auch die *hshN*-Deletionsmutante in der Lage waren, unter den gewählten Versuchsbedingungen an die humane Lungenepithelzelllinie A549 zu adhärieren. Alle Ansätze, die mit dem Anti-FbsA-Erstantikörper und dem TRITC-markierten Zweitantikörper inkubiert wurden, zeigen unter dem Fluoreszenzmikroskop viele langkettige Streptokokken. Anhand dieser Positivkontrolle, wurde somit die Funktionalität der Versuchsanordnung bestätigt. In den Ansätze, welche nur mit dem TRITC-markierten Zweiantikörper inkubiert wurden, konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop keine Streptokokken nachgewiesen werden, obwohl die gleichen Proben im Phasenkontrast viele Bakterien aufzeigten. Mit Hilfe dieser Negativkontrolle konnte somit eine unspezifische Kreuzreaktion der TRITC-markierten Zweitantikörper mit Oberflächenstrukturen der eingesetzten Stämme ausgeschlossen werden. Die Fluoreszenzaufnahmen des *S. agalactiae* Wildtyps 6313, unter Verwendung des Hsh-Antikörpers, zeigen viele langkettige Streptokokken, was die Schlußfolgerung zuläßt, daß Hsh auf der Oberfläche der Bakterien vorliegt und somit direkt an der Adhärenz der Bakterien an Epithelzellen beteiligt sein könnte. Im Gegensatz dazu, zeigen die Fluoreszenzaufnahmen der *hshN*-Deletionsmutante unter Verwendung des Hsh-Antikörpers keine Streptokokken, obwohl diese mittels Phasenkontrast im Ansatz nachgewiesen werden konnten. Die erhaltenen Ergebnisse belegen somit, daß die *hshN*-Mutante kein Hsh-Protein auf der Oberfläche trägt. Dies könnte ein Grund für die drastisch reduzierte Adhärenz dieses Stammes an die humane Rachenepithelzellline HEp2 darstellen.

3. Funktionelle Charakterisierung des Regulators RogB2 aus *S. agalactiae* NEM316

Grundlage der nachfolgend beschriebenen Arbeiten waren Untersuchungen zum Regulator RogB2 aus der Diplomarbeit von Anja Eichner (2005). In dieser Arbeit war bereits der Nachweis erbracht worden, daß RogB2 Einfluß auf die Virulenz von *S. agalactiae* nimmt. So zeigten Mutantenstämme mit einem inaktivierten *rogB2*-Gen in Zellkulturversuchen eine deutlich gesteigerte Adhärenz an humane Lungenepithelzellen. In Proteinbindungsassays wies die *rogB2*-Mutante zudem eine erhöhte Bindung an humanes Fibrinogen und an humanes Keratin 4 auf. Darüber hinaus konnte über realtime PCR Experimente gezeigt werden, daß der Regulator RogB2 die Expression bekannter und potentieller Virulenzfaktor beeinflußt. In der vorliegenden Arbeit wurden die mit der *rogB2*-Mutante erhaltenen Ergebnisse mit einer, von Anja Eichner am Ende ihrer Arbeit konstruierten *rogB2*-Komplementante, als NEM316 Δ*rogB2* pAT*rogB2* bezeichnet, komplettiert.

3.1. Bedeutung des Regulators RogB2 für die Virulenz von *S. agalactiae* NEM316

Bedeutung von RogB2 für die Bindung von *S. agalactiae* an eukaryotische Proteine

Auf genomischer Ebene weist das *rogB2*-Gen eine mehr als 50 %ige Identität zum Regulator RogB aus *S. agalactiae* auf (Gutekunst, 2000). Das RogB-Protein spielt in *S. agalactiae* eine wichtige Rolle bei der Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von *rogB2* auf die Fibrinogenbindung von *S. agalactiae* analysiert. Zusätzlich liegt das *rogB2*-Gen im Genom von *S. agalactiae* NEM316 in direkter Nachbarschaft zum *hsh*-Gen (**Abbildung 22**). Aufgrund der räumlichen Nachbarschaft des *rogB2*-Gens zum *hsh*-Gen kann vermutet werden, daß RogB2 einen regulatorischen Einfluß auf die Expression des *hsh*-Gens ausübt. Da aus Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bekannt ist, daß Hsh die Bindung an humanes Keratin 4 vermittelt, wurde in den Proteinbindungsstudien auch der Einfluß von *rogB2* auf die Bindung von *S. agalactiae* an humanes Keratin 4 untersucht. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse erfolgten die Messungen in mehreren voneinander unabhängigen Versuchsreihen. Das Endergebnis dieser Proteinbindungsstudien ist in **Abbildung 46** zusammen gefaßt.

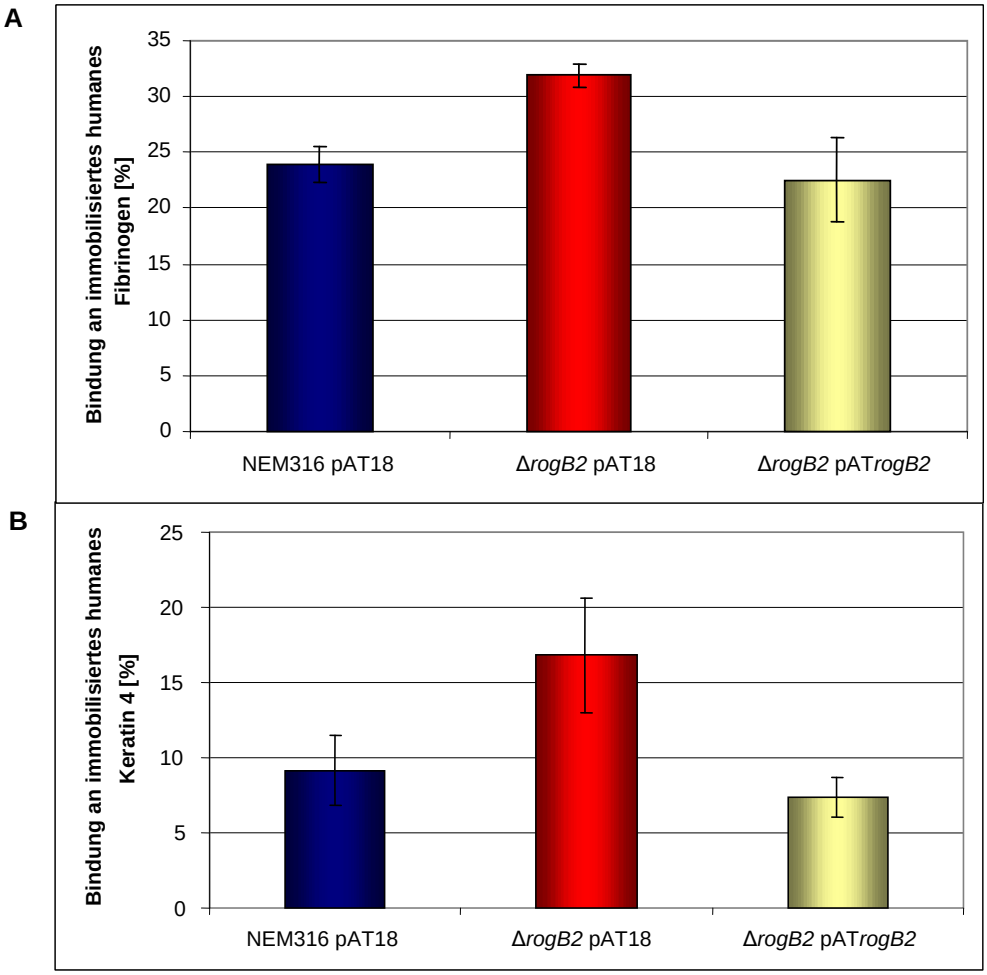


Abb. 46: Bindungsverhalten der *S. agalactiae*-Stämme NEM316 pAT18, Δ*rogB2* pAT18 und Δ*rogB2* pAT*rogB2* an immobilisiertes, humanes Fibrinogen (A) bzw. Keratin 4 (B). Die Versuche wurden mit FITC-markierten Bakterien aus der stationären Wachstumsphase durchgeführt. Die Bindung der Bakterien an die humanen Proteine wurde bezogen auf die Gesamtmenge an Bakterien, die in den Versuch eingesetzt wurden.

Wie **Abbildung 46** zu entnehmen ist, zeigten 24 % der eingesetzten Zellen des *S. agalactiae* Wildtyps NEM316 Bindung an humanes Fibrinogen. Von der *rogB2*-Deletionsmutante Δ*rogB2* pAT18 wiesen 32 % der eingesetzten Zellen Bindung an Fibrinogen auf. Im Vergleich zum Ausgangsstamm besitzt die *rogB2*-Deletionsmutante somit eine um 34 % erhöhte Fibrinogenbindung. Hingegen zeigten 22 % der in den Versuch eingesetzen Bakterien des Stammes Δ*rogB2* pAT*rogB2*, der eine plasmidvermittelte *rogB2*-Expression aufweist, Bindung an immobilisiertes Fibrinogen. Im Fall des immobilisierten Keratin 4, wiesen 9 % der eingesetzten Zellen des *S. agalactiae* Wildtyps NEM316 Bindung an diesen Protein auf. Hingegen zeigten 17 % der eingesetzten Zellen der *rogB2*-Deletionsmutante Δ*rogB2* pAT18

Bindung an Keratin 4. Im Vergleich zum Ausgangsstamm besitzt die *rogB2*-Deletionsmutante somit eine um 90 % erhöhte Keratin 4 Bindung. Von dem Stamm Δ*rogB2* pAT*rogB2* wiesen hingegen 7 % der eingesetzen Bakterien Bindung an immobilisiertes Keratin auf. Diese Ergebnisse deuteten somit an, daß der Regulator RogB2 in *S. agalactiae* NEM316 sowohl Einfluß auf die Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen also auch an humanes Keratin 4 nimmt. Somit konnte das bereits von Anja Eichner erzielte Ergebnis unter Verwendung der *rogB2*-Komplementante bestätigt werden.

Identifizierung RogB2-regulierter Gene in *S. agalactiae* NEM316

Um den Einfluß von RogB2 auf die Expression potentieller und bekannter Virulenzgene im Stamm *S. agalactiae* NEM316 zu untersuchen, wurden bereits von Anja Eichner realtime PCR Experimente am LightCyler durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse deuteten an, daß *rogB2* die Expression der Gene *hsh* und *sapA* stimuliert und die Expression des Gens *fbsA* negativ beeinflußt. Als fortführendes Experiment sollte nun in der vorliegenden Arbeit diese Beobachtung mit den Stämmen NEM316 pAT18, NEM316 Δ*rogB2* pAT18 und NEM316 Δ*rogB2* pAT*rogB2* eingehender untersucht werden.

Um anhand eines im LightCycler-Experiments erhaltenen Wendepunktes die Menge an Transkript des zu untersuchenden Gens zu errechnen, wurde auf die in **Abbildung 8** bereits gezeigte Kalibriergerade zurückgegriffen. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die Transkriptmengen der jeweiligen Gene in den zu untersuchenden *S. agalactiae*-Stämmen auf jeweils 2,63 x 10^7 Kopien *gyrA*-Transkript bezogen. Für die einzelnen Gene wurde ein Expressionsunterschied zwischen den verschiedenen *S. agalactiae*-Stämmen von mindestens 1,5 als signifikant betrachtet.

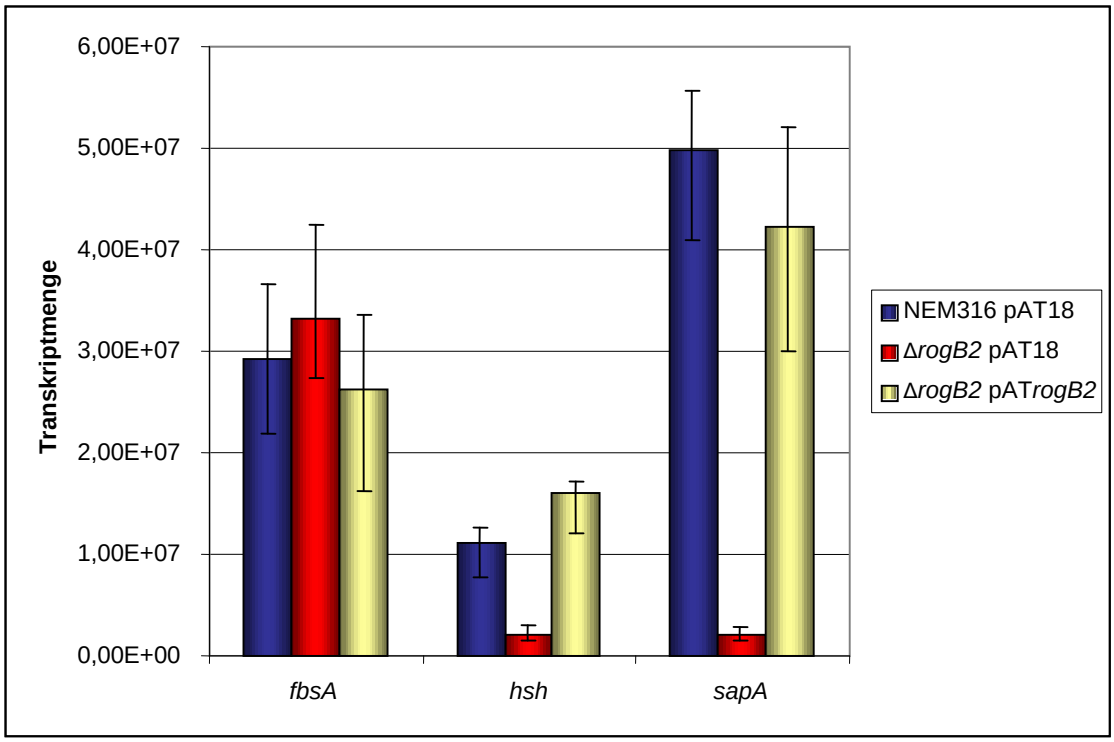


Abb. 47: Kopienzahl der Transkripte der Gene *fbsA*, *hsh* und *sapA* in den *S. agalactiae*-Stämmen NEM316 pAT18 , Δ*rogB2* pAT18 bzw. Δ*rogB2* pAT*rogB2*.

Wie aus **Abbildung 47** hervorgeht, ist die Expression der Gene *hsh* bzw. *sapA* in der *rogB2*-Deletionsmutanten im Vergleich zum *S. agalactiae* Wildtyp um den Faktor 5,5 ± 1,0 bzw. 23,2 ± 4,5 niedriger. Die Expression des *fbsA*-Gens hingegen ist in der *rogB2*-Deletionsmutante im Vergleich zum Ausgangsstamm nur minimal erhöht. Diese Ergebnisse deuten an, daß RogB2 die Expression der Gene *hsh* und *sapA* stimuliert, hingegen einen kaum meßbaren Einfluß auf die Expression des *fbsA*-Gens nimmt. Somit konnten mit Hilfe der *rogB2*-Komplementante die Ergebnisse von Anja Eichner im Bezug auf die Expression der Gene *hsh* und *sapA* bekräftigt werden. Ein Einfluß des Regulator RogB2 auf die *fbsA*-Expression wurde hingegen nicht bestätigt.

Einfluß von RogB2 auf die Adhärenz der Bakterien an eukaryotische Zellen

Parallel zu Experimenten der Diplomarbeit von Anja Eichner, wurde in Zellkulturversuchen mit der humanen A549 Lungenepithelzelllinie die Bedeutung des Regulators RogB2 auf das Adhärenz- und Invasionsverhalten der *S. agalactiae*-Stämme NEM316 pAT18, Δ*rogB2* pAT18 bzw. Δ*rogB2* pAT*rogB2* untersucht. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse, wurden die entsprechenden Versuche in mehreren voneinander unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden als Absolutwerte angegeben und jeweils mit den Werten des Wildtyps verglichen. Das dabei erzielte Endergebnis ist in **Abbildung 48** dargestellt.

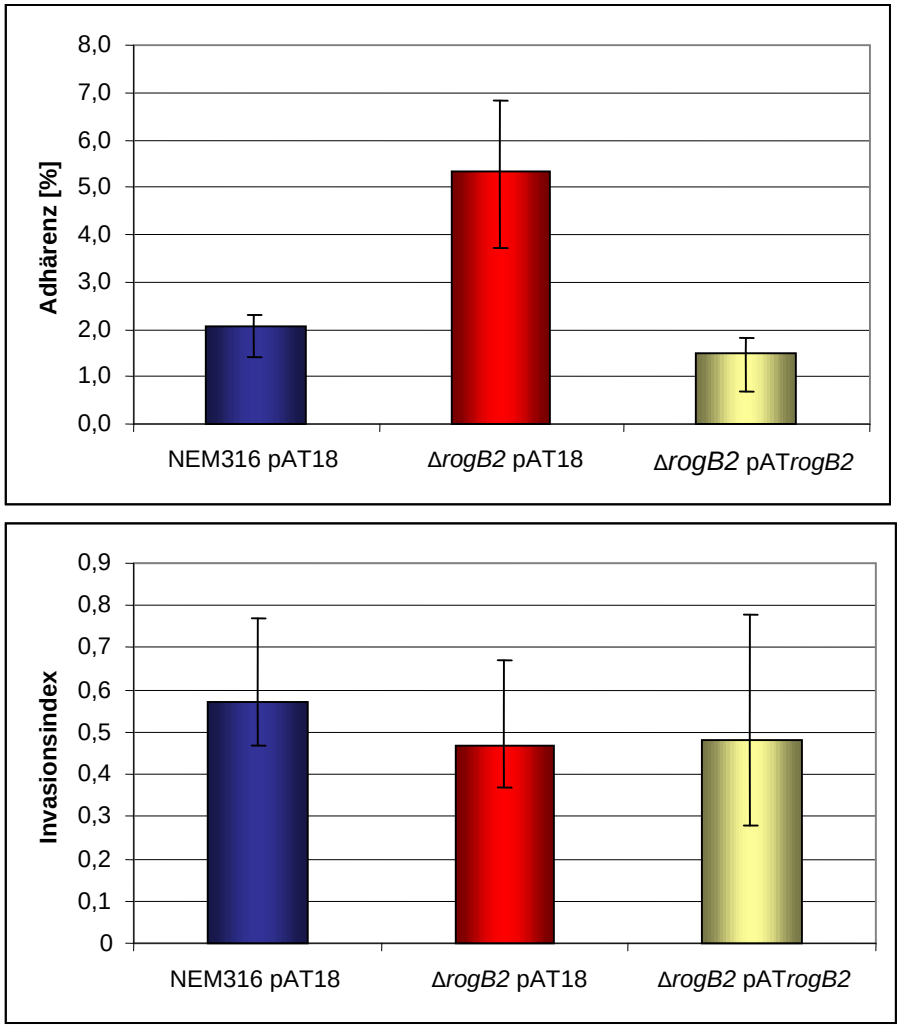


Abb. 48: Adhärenz- und Invasionsverhalten der *S. agalactiae*-Stämme NEM316 pAT18, Δ*rogB2* pAT18 bzw. Δ*rogB2* pAT*rogB2* mit der humanen Lungenepithelzelllinie A549. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Lebendzellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Wachstum in Zellkulturmedium. Der Invasionsindex stellt den Quotienten aus invasiven und adhärenten Bakterien dar.

Aus der Abbildung wird deutlich, daß eine Deletion im *rogB2*-Gen des *S. agalactiae*-Stammes NEM316 zu einer stark erhöhten Adhärenz im Vergleich zum Wildtyp führt. Da die *rogB2*-Komplementante eine zum Wildtyp vergleichbare Adhärenz aufweist, konnte somit gezeigt werden, daß der Regulator RogB2 aus *S. agalactiae* NEM316 bei der Adhärenz an die humane Lungenepithelzelllinie A549 eine wichtige und dabei hemmende Rolle spielt. Auf die Invasion des verwendeten Stammes in diese Zelllinie scheint eine Deletion des Gens *rogB2* jedoch keinen Einfluß zu haben. Somit konnten mit der *rogB2*-Komplementante die vorläufigen Ergebnisse der Diplomarbeit von Anja Eichner zur Bedeutung von *rogB2* auf das Adhärenz- bzw. Invasionsverhalten von *S. agalactiae* komplettiert werden.

Da in vorangegangenen Experimenten gezeigt worden war, daß RogB2 die Expression des *hsh* Gens stimuliert und daß eine *hshN*-Deletionsmutante eine stark reduzierte Adhärenz an die humane Rachenepithelzelllinie HEp2 aufweist, wurde das Adhärenzverhalten der *S. agalactiae* Stämme NEM316 pAT18, Δ*rogB2* pAT18 bzw. Δ*rogB2* pAT*rogB2* an diese Zelllinie untersucht. Das Endergebnis aus mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen ist in **Abbildung 49** dargestellt. Alle Ergebnisse wurden als Absolutwerte angegeben und jeweils mit den Werten des Wildtyps verglichen.

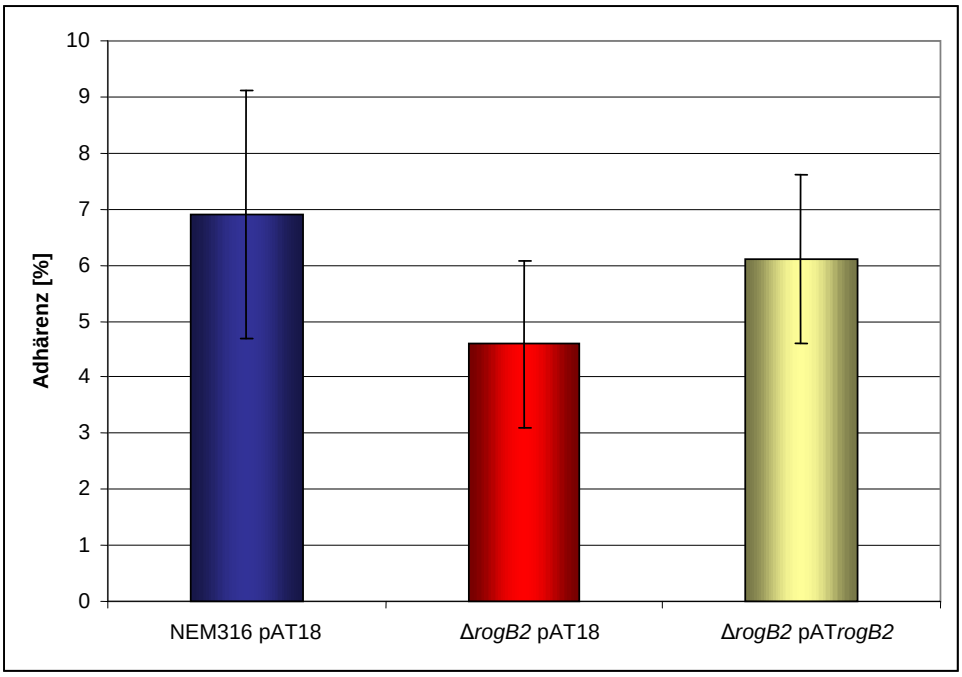


Abb. 49: Adhärenzverhalten der *S. agalactiae*-Stämme NEM316 pAT18, Δ*rogB2* pAT18 bzw. Δ*rogB2* pAT*rogB2* an die humanen Rachenepithelzelllinie HEp2. Angegeben ist der prozentuale Anteil adhärenter Bakterien bezogen auf die Lebendzellzahl der Bakterien nach zwei Stunden Wachstum in Zellkulturmedium.

Abbildung 49 zeigt, daß eine Deletion im *rogB2*-Gen zu einer um 35 % reduzierten Adhärenz der *rogB2*-Mutante im Vergleich zum *S. agalactiae* Wildtyp führt. Hingegen weist die *rogB2*-Komplementante eine zum Wildtyp vergleichbare Adhärenz auf. Diese Ergebnisse deuten an, daß eine Deletion des *rogB2*-Gens deutlich Einfluß auf die Adhärenz von *S. agalactiae* NEM316 an HEp2-Rachenepithelzellen nimmt und daß dieser Einfluß durch eine plasmidvermittelte Expression von *hsh* komplementiert werden kann. Ein Einfluß von *rogB2* auf das Invasionsverhalten der Bakterien konnte nicht festgestellt werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Somit konnte ein Zusammenhang zwischen der Regulation der *hsh*-Expression in *S. agalactiae* durch RogB2 und eine durch Hsh vermittelte Adhärenz an die humane Rachenepithelzelllinie HEp2 bestätigt werden.

IV. Diskussion

S. agalactiae, der einzige Vertreter der serologischen Gruppe B der Streptokokken (GBS), gehört bei einem Großteil der menschlichen Bevölkerung zur normalen Flora des Darms und des weiblichen Genitaltraktes. Zugleich gilt *S. agalactiae* als Hauptverursacher schwerer Meningitiden, Pneumonien und Septikämien bei menschlichen Neugeborenen (Hahn *et al*, 1991; Kayser *et al*, 1998; Schuchat, 1998). Zusätzlich ist *S. agalactiae* maßgeblich für Gebärmutterschleimhautentzündungen, Nierenbeckenentzündungen und Frühgeburten sowie Fieber bei Schwangeren und Frauen nach der Niederkunft verantwortlich (Baker & Edwards, 1995; Shet & Ferrieri, 2004). Darüber hinaus ist in den letzten Jahren die Anzahl der *S. agalactiae*-Erkrankungen, vor allem bei älteren Menschen und Erwachsenen mit geschwächtem Immunsystem, deutlich angestiegen (Akram & Kahn, 2001; Center for Disease Control and Prevention, 1996; Lee *et al*, 2005). Im Moment stellt eine Antibiotika-Therapie die einzige Möglichkeit zur Bekämpfung einer *S. agalactiae*-Infektion dar. Dies ist vor allem bei Neugeborenen aufgrund von Nebenwirkungen und Unverträglichkeiten mit einem großen Risiko behaftet (Kayser *et al*, 1998; Lim *et al*, 1986; Velaphi *et al*, 2003). Des Weiteren stellen Antibiotika-Resistenzen bei der Behandlung von *S. agalactiae*-Erkrankungen gegenwärtig und auch in Zukunft ein großes Problem dar (Daley & Garland, 2004; Uh *et al*, 2001 & 2004 & 2005). Aus diesen Gründen ist es notwendig, die Pathogenitätsmechanismen von *S. agalactiae* und dessen Überlebensstrategien im menschlichen Wirt eingehend zu untersuchen. Die Erforschung von spezifischen Virulenzfaktoren und deren Regulation werden gegebenenfalls zur Entwicklung von Impfstoffen gegen *S. agalactiae*-Infektionen führen, die eine wichtige Alternative zur Antibiotika-Therapie darstellen (Heath *et al*, 2005).

In vielen pathogenen Bakterien wurden bereits komplexe Regulationsmechanismen identifiziert, welche die Expression von spezifischen Virulenzgenen kontrollieren. (Bates *et al*, 2005; Federle *et al*, 1999; Levin *et al*, 1998; Vahling *et al*, 2005). Die Besiedelung und anschließende Infektion von verschiedenen Bereichen des menschlichen Wirtes setzen ein regulatorisches Netzwerk in *S. agalactiae* voraus, über das Umwelteinflüsse wahrgenommen werden und welches die Bildung von spezifischen Virulenzfaktoren kontrolliert. So wurde in *S. agalactiae* ein als *rgfBDAC* bezeichneter Genlocus beschrieben, der in klinischen Isolaten der Serotypen I-VIII nachgewiesen werden konnte (Spellerberg *et al*, 2002). Dieser Genlocus codiert für ein Zwei-Komponentensystem mit signifikanter Ähnlichkeit zu Quorum-Sensing-Systemen anderer Gram-positiver Bakterien und reguliert abhängig von der bakteriellen Wachstumsphase die Bindung

von *S. agalactiae* an Fibrinogen und die Synthese der C5a-Peptidase. Der Einfluß der Wachstumsphase von *S. agalactiae* auf die Expression unterschiedlicher Virulenzfaktoren wurde bereits von Ross *et al* (1999) beschrieben. Auch die Inaktivierung der Oligopeptidpermease (Opp) und eine damit gestörte Fähigkeit zur Aufnahme von Oligopeptiden nimmt Einfluß auf die Virulenz von *S. agalactiae* (Samen *et al*, 2004). Die Oligopeptidpermease wird durch die Gene *oppA1-F* codiert, die als Operon transkribiert werden. Eine *oppB*-Mutante zeichnet sich durch eine reduzierte Adhärenz an menschliche Lungenepithelzellen, eine signifikant verminderte Bindung an humanes Fibrinogen und eine herunterregulierte *fbsA*-Expression aus. Die reduzierte *fbsA*-Expression erklärt wiederum die verminderte bakterielle Bindung an humanes Fibrinogen und die geringe Adhärenz an Lungenepithelzellen. Des Weiteren wurde in *S. agalactiae* ein Zwei-Komponentensystem beschrieben, codiert durch die Gene *dltR* und *dltS*, welches deutlichen Einfluß auf die Anzahl der D-Alanin-Ester innerhalb der Lipoteichonsäure der Zellwand nimmt (Poyart *et al*, 2001). Ein weiteres für *S. agalactiae* beschriebenes Zwei-Komponentensystem stellt das Regulationssystem CovS/CovR dar. Eine *covSR*-Mutante zeigte einen im Vergleich zum Wildtyp deutlich veränderten Phänotyp, wie etwa eine erhöhte hämolytische Aktivität, eine verminderte Aktivität des CAMP-Faktors, eine gesteigerte Fähigkeit zur Adhärenz an Epithelzellen sowie eine beeinträchtigte Lebensfähigkeit in humanem Serum (Lamy *et al*, 2004; Jiang *et al*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Regulatorprotein RovS (**r**egulator **o**f **v**irulence in ***S****treptococcus agalactiae*) charakterisiert und dessen Rolle für die Virulenz von *S. agalactiae* untersucht. RovS zeigt Ähnlichkeit zu Transkriptionsregulatoren der Rgg-Familie, die man ausschließlich in Gram-positiven Bakterien findet. Vertreter dieser Familie wurden bereits in *S. pyogenes* (Chaussee *et al*, 1999 & 2001-2004; Lyon *et al*, 1998; Neely *et al*, 2003), sowie *S. gordonii* (Sulavik *et al*, 1992 & 1996; Vickermann *et al*, 2001-2003) näher untersucht. In *S. pyogenes* stimuliert Rgg die Produktion von Toxin B, auch bekannt als pyrogenes Exotoxin B oder Cystein-Protease SpeB. (Chaussee *et al*, 1993 & 1999; Ohara-Nemoto *et al*, 1994). Zahlreiche Studien lassen vermuten, daß SpeB Einfluß auf die Virulenz von *S. pyogenes* nimmt (Berge *et al*, 1995; Kapur *et al*, 1993; Nyberg *et al*, 2004; Wei *et al*, 2005). So ist SpeB in der Lage, das streptokokkale Adhäsin M1 auf der bakteriellen Oberfläche zu spalten (Berge *et al*, 1995) und extrazelluläre Matrixproteine des Wirtes, wie Fibronektin und Vitronektin, die bei der bakteriellen Adhärenz eine Rolle spielen, abzubauen (Kapur *et al*, 1993). In *S. gordonii* stellt Rgg einen Transkriptionsregulator dar, der einen stimulierenden Effekt auf die Expression des Glykosyltransferasegens *gtfG* ausübt (Sulavik *et al*, 1996). Glucan-Polymere, die über die

Glykosyltransferase aus Sucrose synthetisiert werden, ermöglichen die Akkumulation von Bakterien auf Oberflächen, welches bei der bakteriellen Biofilmbildung auf Zahnoberflächen der Fall ist. Die geschilderten Ergebnisse aus Untersuchungen mit *S. pyogenes* und *S. gordonii* zeigen die Bedeutung von Rgg für die Virulenz von Streptokokken auf. Über Rgg aus *S. agalactiae* und dessen Rolle bei der bakteriellen Pathogenität war zu Beginn der vorliegenden Arbeit jedoch nichts bekannt.

In den veröffentlichten Genomsequenzen von *S. agalactiae* war es möglich, drei Gene zu identifizieren, die für potentielle Transkriptionsregulatoren codieren und Ähnlichkeit zu Regulatoren der Rgg-Familie aufweisen. Eines der drei Gene war das *gbs1555*-Gen aus *S. agalactiae* NEM316, das für den in dieser Arbeit näher charakterisierten Regulator RovS codiert. Die Deletion des *rovS*-Gens im Genom von *S. agalactiae* führt zu einer verstärkten Bindung der Bakterien an immobilisiertes, humanes Fibrinogen. Dies läßt vermuten, daß RovS als Repressor fungiert, der Einfluß auf die bakterielle Bindung an die extrazelluläre Matrix (ECM) nimmt. Die ECM von Säugetiergeweben ist eine stabile, makromolekulare Struktur, die unterhalb von Epithel- und Endothelzellen zu finden und aus Glykoproteinen wie Kollagen, Laminin, Fibronektin und Fibrinogen zusammengesetzt ist (Hay, 1991). Von Gutekunst *et al* (2004) wurde bereits der Regulator RogB in *S. agalactiae* beschrieben, welcher Ähnlichkeit zur RALP-Familie der Transkriptionsregulatoren besitzt und einen stimulierenden Effekt auf die bakterielle Bindung an extrazelluläre Matrix- und Plasmaproteine ausübt. RofA und Nra, ebenfalls Regulatorproteine der RALP-Familie, wurden bereits in *S. pyogenes* näher auf molekularer Ebene untersucht (Beckert *et al*, 2001; Fogg *et al*, 1997; Podbielski *et al*, 1999). Dabei konnte nachgewiesen werden, daß RofA die Bindung von *S. pyogenes* an humanes Fibronektin erhöht (Fogg *et al*, 1997), hingegen Nra als Repressor agiert und die bakterielle Bindung an humanes Fibronektin und Kollagen herunterreguliert (Podbielski *et al*, 1999).

Die Interaktion von Bakterien mit Proteinen der extrazellulären Matrix ist häufig eine Voraussetzung für die erfolgreiche Besiedlung des menschlichen Wirtes. Interessanterweise führt eine Deletion von *rovS* im Genom von *S. agalactiae* zu einer erhöhten Fibrinogenbindung, sowie einer gesteigerten Adhärenz der Bakterien an die humane Lungenepithelzelllinie A549. Die von Gutekunst *et al* (2004) konstruierte *rogB*-Mutante zeigte hingegen eine verminderte Bindung an humanes Fibrinogen sowie eine verringerte Adhärenz an A549-Zellen. In *S. agalactiae* spielt die Interaktion mit Fibrinogen eine wichtige Rolle bei der Adhärenz an Epithelzellen. Deshalb darf spekuliert werden, daß eine erhöhte Bindung der *rovS*-Mutante an

humanes Fibrinogen für die gesteigerte bakterielle Adhärenz an humane Lungenepithelzellen verantwortlich war. Alternativ besteht die Möglichkeit, daß RovS in *S. agalactiae* die Synthese bisher noch nicht identifizierter Adhäsine stimuliert. In *S. pyogenes* zeigt Rgg einen deutlichen Einfluß auf die Synthese des durch das *emm*-Gen codierten M-Proteins (Chaussee *et al*, 2002). M-Proteine stellen häufig den Hauptfibrinogenrezeptor innerhalb der Serogruppe A der Streptokokken dar und nehmen als bakterielle Oberflächenproteine eine wichtige Rolle bei der Virulenz von *S. pyogenes* ein (Cunningham, 2000). Somit reguliert Rgg einen der Hauptvirulenzfaktoren in *S. pyogenes* und spielt daher selbst eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Pathogenität.

In Studien von Schubert *et al* (2002 & 2004) wurde das FbsA-Protein als Hauptfibrinogenrezeptor in *S. agalactiae* identifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, daß eine Deletion des *fbsA*-Gens in *S. agalactiae* zu einem vollständigen Verlust der Fibrinogenbindung der Bakterien führt. In nachfolgenden Arbeiten wurde auch eine signifikante Bedeutung von FbsA für die Adhärenz von *S. agalactiae* an Epithelzellen nachgewiesen (K. Zakikhany, 2002; Schubert *et al* 2004). Die erhöhte Bindung der *rovS*-Mutante an humanes Fibrinogen läßt somit eine gesteigerte Synthese des FbsA-Proteins vermuten. Tatsächlich konnte über realtime PCR Experimente gezeigt werden, daß die Inaktivierung von *rovS* im Genom von *S. agalactiae* eine Erhöhung der *fbsA*-Expression um mehr als 50 % zur Folge hat. Dieses Ergebnis deutet somit an, daß die gesteigerte Fibrinogenbindung der *rovS*-Mutante durch eine erhöhte Produktion von FbsA vermittelt wird. Kürzlich wurde noch ein weiteres Fibrinogen-bindendes Protein in *S. agalactiae* identifiziert, welches als FbsB bezeichnet wurde (Gutekunst *et al*, 2004). Allerdings zeigte die Inaktivierung des *fbsB*-Gens keinen Einfluß auf die Fibrinogenbindung von *S. agalactiae*. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß das FbsB-Protein unter bisher unbekannten Bedingungen für die Fibrinogenbindung in *S. agalactiae* von großer Bedeutung ist. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen jedoch vermuten, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen FbsA maßgeblich für die Fibrinogenbindung von *S. agalactiae* verantwortlich war.

Über quantitative realtime PCR im LightCycler wurde nicht nur der Einfluß von RovS auf die Expression von *fbsA*, sondern auch auf andere potentielle und bekannte Virulenzgene untersucht. Dabei zeigte sich ein stimulierender Effekt von RovS auf die Expression der Gene *gbs0230* bzw. *gbs1479*, die für einen weiteren Transkriptionsregulator der Rgg-Familie bzw. für den Regulator RogB aus *S. agalactiae* codieren. Die Bedeutung des Rgg-ähnlichen Regulators Gbs0230 ist

bisher noch unbekannt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen, daß dieses Protein, wie bereits für RogB gezeigt, seinerseits Einfluß auf die Expression verschiedener Virulenzgene nimmt. So zeigt RogB nicht nur autoregulatorische Eigenschaften, sondern auch einen stimulierenden Effekt auf die Expression des beschriebenen *fbsA*-Gens, sowie der Gene *gbs1477* und *gbs1478*, die für potentielle Fimbrien in *S. agalactiae* codieren (Lauer *et al*, 2005). Zusätzlich stellt RogB auch einen Negativregulator des *cpsA*-Gens dar, welches wiederum für einen Regulator der Kapselbiosynthese codiert (Griffin *et al*, 1996; Gutekunst *et al*, 2004). Der Einfluß von RovS auf die Expression von *gbs0230* und *rogB* kann somit einen indirekten Effekt auf die Transkription weiterer Virulenzgene haben. Des Weiteren wurde über quantitative realtime PCR ein positiver Effekt von RovS auf die Expression der Gene *gbs0644* bzw. *gbs0808* nachgewiesen. Das *gbs0644*-Gen ist ein Strukturgen des *cyl*-Operons, das für die Produktion eines Hämolysins von *S. agalactiae* notwendig ist (Spellerberg *et al*, 1999). Das *gbs0808*-Gen hingegen codiert für eine Mangan-abhängige Superoxiddismutase, welche Superoxidanionen in molekularen Sauerstoff und Hydrogenperoxid umwandelt, von denen letzteres durch Katalase bzw. Peroxidasen verstoffwechselt wird. Superoxiddismutase stellt einen wichtigen, bakteriellen Abwehrmechanismus gegen oxidativen Streß dar und spielt deshalb bei einigen Bakterien eine wichtige Rolle bei der Virulenz. So zeigte in Studien von Poyart *et al* (2001) eine Superoxiddismutase-Mutante im Vergleich zum *S. agalactiae* Wildtyp eine erhöhte Abtötung durch Makrophagen sowie eine drastisch verminderte Überlebensrate im Blut und Gehirn von infizierten Mäusen. Diese Ergebnisse lassen somit eine wichtige Rolle der Superoxiddismutase bei der Pathogenität von *S. agalactiae* vermuten. Die Bedeutung des streptokokkalen β-Hämolysins / Cytolysins CylE für die Invasion von *S. agalactiae* in Epithelzellen wurde bereits vor einigen Jahren nachgewiesen (Doran *et al*, 2002). In einer erst kürzlich erschienenen Studie wurde nun zum ersten Mal der *in vivo* Beweis zur Bedeutung des β-Hämolysins bei einer Neugeborenenpneumonie beschrieben. So zeigten mit dem *S. agalactiae* Wildtyp infizierte Kaninchen einen 100-fach stärkeren bakteriellen Befall als Versuchstiere, denen eine Hämolysin-Mutante verabreicht worden war. Die Mortalität fiel dabei im Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante von 40 % auf 0 % (Hensler *et al*, 2005). Aufgrund der Bedeutung der Superoxiddismutase bzw. des Hämolysins für die Pathogenität von *S. agalactiae* und deren transkriptionelle Regulation durch RovS kann somit vermutet werden, daß RovS Teil eines regulatorischen Netzwerkes in *S. agalactiae* ist, das signifikanten Einfluß auf die Virulenz der Bakterien ausübt.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob RovS an die Promotorregionen der beschriebenen Virulenzgene bindet und somit deren Transkription direkt beeinflusst, oder ob RovS durch die Wirkung auf andere regulatorische Proteine Teil einer indirekten Regulationskaskade ist. Um diese Frage zu klären, wurden Bandshift-Experimente durchgeführt, in denen eine Bindung des Regulators RovS an die Promotorregion des *cyl*-Operons bzw. der Gene *fbsA, sod* und *gbs0230* gezeigt wurde, was auf eine direkte Regulation der Expression dieser Gene durch RovS schließen läßt. In *Lactococcus sakei* aktiviert der zur Rgg-Familie gehörende Regulator LasX die Expression des für das Antibiotikum Lactosin S codierenden Operons *lasA-W* (Rawlinson *et al*, 2002). Erst kürzlich wurde der Beweis erbracht, daß LasX an die Promotorregion des *lasA-W* Operons bindet und daher direkt an dessen Regulation beteiligt ist (Rawlinson *et al*, 2005). Des Weiteren wurde gezeigt, daß Rgg aus *S. gordonii* stromaufwärts des *gtfG* Gens (Vickerman *et al*, 2003) und daß RopB aus *S. pyogenes* stromaufwärts des *speB* Gens spezifisch an die DNA bindet (Neely *et al*, 2003). An die Promotorregion des Gens *rogB* konnte in der vorliegenden Arbeit keine Bindung durch RovS nachgewiesen werden, obwohl realtime PCR Experimente einen deutlichen Einfluß des Regulators auf die Expression dieses Gens gezeigt hatten. Deshalb kann vermutet werden, daß die Transkription von *rogB* nur indirekt durch RovS stimuliert wird, etwa durch dessen Einfluß auf andere regulatorische Systeme. Auch für RofA aus *S. pyogenes* wird ein indirekt regulatorischer Effekt auf die Expression definierter Virulenzgene vermutet, da trotz des gezeigten Einflusses des Regulators auf deren Transkription, das bereits beschriebene RofA-Bindemotiv in den einzelnen Promotorregionen nicht nachweisbar ist (Beckert *et al*, 2001). Obwohl einige der Rgg-Proteine bereits näher strukturell und funktionell charakterisiert wurden, konnte für die Familie der Rgg-ähnlichen Regulatoren bis heute kein allgemein gültiges DNA-Bindemotiv aufgezeigt werden. In Studien zum Regulator LasX aus *L. sakei* wurde zwar eine 19 Bp Region im Promotorbereich des *lasA-W*-Operons als LasX-Bindestelle identifiziert, eine mögliche Konsensussequenz konnte jedoch nicht formuliert werden (Rawlinson *et al*, 2005). Um in der vorliegenden Arbeit das RovS-DNA-Bindemotiv zu identifizieren, wurden Bandshift-Experimente durchgeführt, die sich auf die Promotorregion des *fbsA* Gens konzentrierten. Unter Verwendung überlappender *fbsA*-Sonden wurde das RovS-Bindemotiv auf einen DNA-Bereich von 28 Bp eingegrenzt. Innerhalb dieser 28-Bp Region konnte die palindromische Sequenz **ATA**AT**A**T**TAAA** N_6 **TTTAA**A**A**A**TAT** identifiziert werden. Diese wird durch einen DNA-Abschnitt von sechs Basen unterbrochen (N_6) und weist zwei Fehlpaarungen auf. Auch aus anderen Studien ist bekannt, daß in Gram-positiven Bakterien Regulatorproteine an palindromische Sequenzen innerhalb von Promotorregionen binden. So reguliert in *S. gordonii* das Protein ScaR die Expression des Gens *scaA*, welches für

ein Lipoprotein auf der bakteriellen Oberfläche codiert, das für die Biofilmbildung von Bedeutung ist (Zhang *et al*, 2005). Dabei umfasst das ScaR-Bindemotiv zum einen eine unterbrochene palindromische Sequenz und zum anderen eine unvollständige palindromische Sequenz. In *Bacillus anthracis* reguliert das Protein PlcR die Expression der Gene *plc* and *sph*, welche für die Phospholipase und die Sphingomyelinase codieren und bei der Hämolyse eine wichtige Rolle spielen. Wie auch ScaR aus *S. gordonii*, bindet PlcR aus *B. anthracis* an eine unvollständige palindromische Sequenz und reguliert dadurch direkt die Expression des *plc-sph*-Operons (Pomerantsev *et al*, 2004). Das für RovS gefundene DNA-Bindemotiv stellt somit mit seinem palindromischen Aufbau einen gängigen Typ von Regulator-Bindungsstelle in Streptokokken und anderen Gram-positiven Bakterien dar (Jakubovics *et al*, 2000). Das im *fbsA*-Promotor identifizierte RovS-Bindemotiv wurde in der vorliegenden Arbeit auch in den Promotorbereichen der RovS regulierten Gene *gbs0230*, *sodA*, bzw. des *cyl*-Operons identifiziert. Aus diesem Grund war es möglich unter Verwendung des degenerierten Wobble-Codes die Konsensussequenz **AWAAW**VH**T**D**A**W N_6 **WTKWWAMD**W**AK** für das RovS-DNA-Bindemotiv in *S. agalactiae* zu formulieren. Transkriptionelle Regulatoren binden häufig in Form von Di- bzw. Tetrameren an ihre spezifischen DNA-Erkennungssequenzen (Wagner, 2000). Dabei treten die Untereinheiten des Regulators in Kontakt mit konservierten Basen innerhalb palindromischer oder sich wiederholender Sequenzen und regulieren dadurch die Transkription von Genen (Busby *et al*, 1994; Ishiama, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Gelfiltrationsexperimenten nachgewiesen, daß RovS in nativer Form als Dimer vorliegt. Somit besitzt RovS eine bei transkriptionellen Regulatoren häufig anzutreffende Multimerisierung. Allerdings bleibt zu untersuchen, ob die Bindung einer RovS-Untereinheit an nur eine Hälfte des palindromischen Bindemotivs ausreicht, um die Expression von Genen als Repressor bzw. Aktivator zu regulieren. So zeigte RovS in der vorliegenden Arbeit in Bandshift-Experimenten auch Bindung an DNA-Sequenzen, in denen jeweils eine Seite des Palindroms mutiert worden war. Die erhaltenen Ergebnisse lassen somit vermuten, daß die Untereinheiten des RovS-Dimers eventuell seitenunabhängig mit jeweils einzelnen Basen des Palindroms in Kontakt treten.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des *gbs1529*-Gens aus *S. agalactiae*, das signifikante Ähnlichkeit zum *hsa*-Gen aus *S. gordonii* aufweist (Takahashi *et al*, 2002) und deshalb als *hsh* (**hs**a-**h**omolog) bezeichnet worden war (Ripka, 2003). Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *hsh*-Gens weist am N-Terminus ein Signalpeptid und am C-Terminus einen Zellwandanker sowie eine hochrepetitive Region aus

150 Sequenzwiederholungen auf. Aufgrund der Signalpeptidsequenz und des Zellwandankermotivs kann vermutet werden, daß es sich bei Hsh um ein Oberflächenprotein von *S. agalactiae* handelt. Diese Vermutung wurde über Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung von Hsh-spezifischen Antikörpern bestätigt. Dabei war es möglich, Hsh auf der Oberfläche des *S. agalactiae* Wildtyps 6313, jedoch nicht auf der Oberfläche einer entsprechenden *hshN*-Deletionsmutante zu detektieren.

In pathogenen Bakterien stellen Oberflächenproteine potentielle Virulenzfaktoren dar, die es den Bakterien ermöglichen, mit menschlichem Wirtsgewebe zu interagieren. Neben seiner signifikanten Ähnlichkeit zum Hsa-Protein aus *S. gordonii*, zeigt Hsh am C-Terminus auch 49 % Homologie zum Fap1-Protein aus *Streptococcus parasanguis* bzw. 61 % Homologie zum SrpA-Protein aus *Streptococcus cristatus* (Handley *et al*, 2005; Takahashi *et al*, 2002; Wu *et al*, 1998 & 1999). Hsa stellt in *S. gordonii* ein Sialinsäure-bindendes Adhesin dar, das eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Kolonisierung der menschlichen Mundhöhle spielt (Takahashi *et al*, 2002). Des Weiteren wird Hsa für die Aggregation menschlicher Blutplättchen durch *S. gordonii* benötigt, was besonders bei der Pathogenese einer Endokarditis von großer Bedeutung ist (Takahashi *et al*, 2002 & 2004; Yajima *et al*, 2005). Auch Fap1 (fimbriae-associated protein) aus *S. parasanguis* stellt ein einzigartiges Adhesin dar, das vor allem als Bestandteil von Fimbrien und für die bakterielle Adhärenz an speichelbedecktes Hydroxyapatit, dem Hauptbestandteil menschlichen Zahnschmelzes, verantwortlich ist. Fap1 ist notwendig für die Bildung langer Fimbrien durch *S. parasanguis* und ein Fehlen dieses Proteins führt zu einer fehlerhaften, bakteriellen Biofilmbildung (Froeliger *et al*, 2001; Wu *et al*, 1998 & 1999). Das Protein SrpA ist in *S. cristatus* ebenfalls am Aufbau von Fimbrien beteiligt und somit wichtig für die bakterielle Biofilmbildung (Handley *et al*, 2005). Neben diesen drei genannten Proteinen zeigt Hsh aus *S. agalactiae* auch 20 % - 40 % Ähnlichkeit zur Sdr-Protein-Familie. Diese Protein-Familie beinhaltet potentielle Adhäsine aus *Staphylococcus aureus* bzw. *Staphylococcus epidermidis*. SdrA, SdrD und SdrE aus *S. aureus*, sowie SdrF, SdrG und SrdH aus *S. epidermidis* sind potentielle Oberflächenproteine, deren Liganden auf Seiten des Wirtes zum Großteil noch nicht bekannt sind (Josefsson *et al*, 1998; McCrea *et al*, 2000). Nur für SdrG, auch Fbe genannt, konnte gezeigt werden, daß es die bakterielle Bindung an Fibrinogen vermittelt (Hartfort *et al*, 2001; Pei *et al*, 2001). Auch das Protein Bbp aus *S. aureus* zählt zur Sdr-Familie. Über das zellwandgebundene Bbp-Protein ist es den Bakterien möglich, mit den Sialoglykoprotein Bsp des Knochengewebes zu interagieren, was die Grundlage für die Pathogenese einer bakteriellen Knochenhautentzündung darstellt (Tung *et al*, 2000). Weitere Mitglieder der Sdr-Proteinfamilie

sind die Fibrinogen-bindenden Clumping Faktoren ClfA bzw. ClfB aus *S. aureus* (Josefsson *et al*, 1998; McDevitt *et al*, 1994; Ni Eidhin *et al*, 1998) oder auch das Kollagen-bindende Oberflächenprotein SdrX aus *Staphylococcus capitis* (Liu *et al*, 2004).

Für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Oberflächenprotein Hsh aus *S. agalactiae* war zu Beginn der Arbeit kein Bindungspartner auf Seiten des Wirtes bekannt. Um die Interaktion von Hsh mit Komponenten aus verschiedenen tierischen und menschlichen Extrakten aufzuzeigen, wurden Western Blot Experimente mit dem aufgereinigten N-Terminus von Hsh durchgeführt, der bereits aus der Diplomarbeit von S. Ripka (2003) vorlag. Dabei zeigte Hsh Bindung an ein humanes Speichelprotein, das über MALDI-TOF-Analysen als Keratin 4 identifiziert wurde. In weiterführenden Studien wurde im N-Terminus von Hsh die Keratin 4-bindende Domäne auf einen Bereich von 178 Aminosäuren eingegrenzt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Hsh an einen, aus 279 Aminosäuren bestehenden Bereich am C-Terminus von Keratin 4 bindet. Die große Bedeutung von Hsh für die bakterielle Bindung an Keratin 4 zeigte sich durch die deutlich reduzierte Fähigkeit einer *S. agalactiae hshN*-Deletionsmutante, an humanes Keratin 4 zu binden. Keratine sind die Hauptstrukturproteine der Epidermis von Wirbeltieren (Chu *et al*, 2002). Zusammen mit Aktin-Mikrofilamenten und Mikrotubuli bilden sie das Cytoskelett von Epithelzellen. Keratine werden je nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer Sequenz in zwei verschiedene Typklassen unterteilt. Keratine des Typs II umfassen die eher basischen und etwas größeren Keratine 1 – 8, wobei die etwas saueren und kleineren Keratine 9 – 20 zum Typ I gezählt werden. Keratin-Filamente sind aus Multimeren, bestehend aus den Typen I und II, aufgebaut. Bei der Differenzierung von Epithelzellen und je nach Lage in der Epidermis, ergibt sich eine veränderte Bildung von Keratinen (Chu *et al*, 2002; Fuchs, 1995). Für Keratin 8 konnte bereits nachgewiesen werden, daß es mit der äußeren Zelloberfläche von Hepatozyten assoziiert ist und somit eine wichtige Rezeptorfunktion besitzen könnte (Hembrough *et al*, 1996). Zusätzlich wurde Keratin 8, wie auch Keratin 18 und 19 auf der Oberfläche von Mammakarzinom-Zellen lokalisiert (Godfroid *et al*, 1991). Keratin 4 wurde bisher nur als Bestandteil der Basalschicht squamöser Epithelien, wie der Schleimhaut des Mund- und Rachenraumes, der Speiseröhre und des Gebärmutterhalses nachgewiesen (Chu *et al*, 2002). Bereits für einige pathogene Bakterien wurde die Bindung an Cytokeratine gezeigt. *S. aureus*, ein häufiger Verursacher von schweren Nosokomialinfektionen, ist in der Lage, über den Clumping Faktor B (ClfB) an Keratin 10 zu binden. Diese Fähigkeit könnte vor allem bei Hautinfektionen bzw. der allgemeinen Besiedelung der Haut eine Rolle spielen (O´Brien *et al*, 2002). *Porphyromonas gingivalis*, ein häufiger Verursacher von Parodontalerkrankungen, bindet

mit Hilfe seiner Fimbrien an Cytokeratine des Typs I, was bei der Besiedelung des Zahnfleisches von Bedeutung ist (Sojar *et al*, 2002). *Burkholderia cepacia*, ein Wasser- und Bodenkeim, der auch mit Erkrankungen bei Mukoviszidose-Patienten in Verbindung gebracht wird, ist in der Lage, an Keratin 13 zu binden (Sajjan *et al*, 2000 & 2002). Dieses Keratin wird bei Patienten mit Mukoviszidose in großer Menge in den Epithelien der Atemwege gebildet. Die Bindung an Keratin 13 und eine daraus resultierende Besiedelung der Atemwege mit *B. cepacia*, kann somit eine wichtige Rolle bei Lungeninfektionen von Mukoviszidose-Patienten spielen. Desweitern wurde auch diskutiert, daß die Bindung von *B. cepacia* an Keratin 13 die bakterielle Invasion und die Zerstörung von Epithelzellen begünstigt (Sajjan *et al*, 2000 & 2002). Durch Tamura *et al* (2000) wurde für *S. agalactiae* bereits Bindung an Keratin 8 der Cytoplasmamembran humaner Lungenepithelzellen nachgewiesen. Allerdings bleibt die Bedeutung der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Bindung von *S. agalactiae* an humanes Keratin 4 für die Pathogenese dieser Bakterien weiterhin ungeklärt. Im Allgemeinen müssen Rezeptoren auf der Oberfläche von Epithelien lokalisiert vorliegen, um mit bakteriellen Adhäsinen interagieren zu können. Keratin 4 befindet sich jedoch normalerweise auf der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran von Epithelzellen und spielt dort eine Rolle bei der Verankerung des Cytoskeletts mit der Plasmamembran (Chu *et al*, 2002). Interessanterweise zeigte eine *S. agalactiae hshN*-Deletionsmutante in der vorliegenden Arbeit eine signifikant reduzierte Adhärenz an die humane Rachenepithelzelllinie HEp2, jedoch keine veränderte Bindung an die humane Lungenepithelzelllinie A549. Kompetitionsversuche mit aufgereinigtem Hsh-Protein bestätigten, daß Hsh an der bakteriellen Adhärenz an HEp2-Zellen direkt beteiligt ist. Es kann sogar vermutet werden, daß die Keratin 4-bindende Domäne von Hsh dabei eine Rolle spielt, da auch der 178 Aminosäure große Teilbereich von Hsh, der nachweislich diese Domäne trägt, einen hemmenden Einfluß auf die bakterielle Adhärenz ausübt. Zusätzlich konnte Keratin 4 mittels Western Blot Experimenten und spezifischen Antikörpern in keiner Zellfraktion von A549-Zellen, allerdings in der Cytoskelett-Fraktion von HEp2-Zellen nachgewiesen werden. Es war jedoch nicht möglich, Keratin 4 auf der Oberfläche der HEp2-Zellen zu detektieren. Auch von der Firma Intercell durchgeführt FACS-Analysen konnten Keratin 4 nicht als Oberflächenprotein von HEp2-Zellen identifizieren (Daten nicht gezeigt). Die Bedeutung der bakteriellen Bindung an humanes Keratin 4 für die Besiedelung von Wirtsepithelien mit *S. agalactiae* bleibt somit vorerst unklar. Es besteht allerdings die Möglichkeit, daß Keratin 4 auf der Oberfläche anderer Epithelzellen lokalisiert ist, die in der vorliegenden Arbeit nicht getestet wurden. Es kann auch spekuliert werden, daß *S. agalactiae* an Keratin 4 bindet, das auf der Außenseite von verletzten Epithelzellen zu finden ist. So ist *S. agalactiae* in der Lage, ein

Hämolysin zu bilden, durch welches die Oberfläche von Epithelzellen angegriffen wird (Nizet *et al*, 1996). Die Interaktion von *S. agalactiae* und Keratin 4 könnte somit Zustande kommen, nachdem die Epithelzellen durch das Hämolysin oder andere bakterielle Faktoren geschädigt wurden. Ebenfalls ist es möglich, daß *S. agalactiae* während des Invasionsprozesses mit Komponenten des Cytoskeletts, wie Keratin 4, in Verbindung tritt. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, daß *S. agalactiae* in der Lage ist, Epithelzellen zu invadieren und in das Cytoplasma der Zellen vorzudringen (Mikamo *et al*, 2004; Rubens *et al*, 1992; Winram *et al*, 1998). Obwohl in der vorliegenden Arbeit eine *hshN*-Deletion in *S. agalactiae* keinen Einfluß auf die bakterielle Invasion hatte, kann spekuliert werden, daß die Bindung an Keratin 4 gegebenenfalls eine wichtige Rolle nach der Invasion bzw. während der Transzytose spielt. Ohne daß die Bedeutung der bakteriellen Bindung an Keratin 4 abschließend geklärt wurde, deuten die erhaltenen Ergebnisse auf eine wichtige Funktion der Keratin 4-Bindung in der Pathogenese einer *S. agalactiae*-Infektion hin.

Aufgrund der Ähnlichkeit von Hsh zu den Proteinen SdrG aus *S. epidermidis* und ClfA aus *S. aureus*, deren Bindung an Fibrinogen bereits bekannt ist (Hartfort *et al*, 2001; McDevitt *et al*, 1994; Pei *et al*, 2001), wurde auch Hsh auf seine Fähigkeit getestet, mit Fibrinogenen unterschiedlichen Ursprungs zu interagieren. Fibrinogen besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten, zwei Aα-, zwei Bβ- und zwei γ-Ketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Doolittle, 1984). Als Protein des Blutplasmas und als Komponente der extrazellulären Matrix (Hay, 1991) ist Fibrinogen bei der Adhärenz der Bakterien an Wirtszellen von großer Bedeutung (Courtney *et al*, 1994; Schubert *et al*, 2004). Zusätzlich wird Fibrinogen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung (Mosesson *et al*, 2001) und beim Schutz der Bakterien vor dem Komplementsystem des Wirtes zugesprochen (Schubert *et al*, 2002). In Western Blot Analysen wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, daß das Hsh-Protein an die Aα- sowie Bβ-Untereinheiten von Rinderfibrinogen bindet, jedoch nicht mit menschlichem Fibrinogen interagiert. Die Fibrinogen-bindende Domäne von Hsh liegt dabei in einem Bereich von 102 Aminosäuren an dem N-Terminus des Proteins und ist räumlich von der Keratin 4-bindenden Domäne des Hsh-Proteins getrennt. Die Fibrinogen-bindende Domäne von Hsh könnte bei der bakteriellen Besiedelung des Euters und somit bei der durch *S. agalactiae* hervorgerufenen Euterentzündung bei Kühen von Bedeutung sein. Von Schubert *et al* (2002 & 2004) wurde bereits FbsA als Hauptrezeptor für humanes Fibrinogen in *S. agalactiae* identifiziert, jedoch wurde kürzlich noch ein weiteres Fibrinogen-bindendes Protein gefunden, das als FbsB bezeichnet wurde (Gutekunst *et al*, 2004). Mehrere Arbeiten zu diesem Protein

zeigten, daß FbsB in mindestens vier verschiedenen Varianten in *S. agalactiae* vorliegt (Gutekunst *et al*, 2004; Jacobsson, 2003; Schaller, 2005). Die einzelnen FbsB-Varianten (FbsB1-4) weisen am C-terminalen Ende starke Sequenzhomologien zueinander auf, wohingegen die N-terminale Region der vier Varianten sich sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrer Länge signifikant voneinander unterscheidet (Gutekunst *et al*, 2004; Jacobsson, 2003). In Untersuchungen von Jacobsson (2003) und Schaller (2005), wurde der konservierte C-Terminus von FbsB3 und FbsB4 als Fibrinogen-bindende Domäne beschrieben, der allerdings nur mit Rinderfibrinogen, nicht jedoch mit humanem Fibrinogen interagiert. Epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung und Größe des *hsh*-Gens in *S. agalactiae* zeigten in der vorliegenden Arbeit eine weite Verbreitung des Gens in klinischen Isolaten unterschiedlichen Serotyps. Allerdings wiesen die 3´-Enden der analysierten *hsh*-Gene signifikante Größenvariationen zueinander auf. Diese Größenvariationen des C-terminalen Bereiches von Hsh liegen wahrscheinlich in einer genetischen Instabilität begründet, welche für stark repetitive DNA-Bereiche diskutiert wird. Ein Verrutschen der DNA-Polymerase, auch als “DNA polymerase slippage“ bezeichnet, während der Replikation wird für diese genetische Instabilität verantwortlich gemacht (Morag *et al*, 1999).

Neben der funktionellen Charakterisierung des Hsh-Proteins und Untersuchungen zu dessen Einfluß auf die Virulenz von *S. agalactiae*, war es in der vorliegenden Arbeit auch von Interesse, die Regulation der *hsh*-Expression zu analysieren. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei dem Gen *gbs1530*, das für einen potentiellen Transkriptionsregulator codiert, der signifikante Ähnlichkeit zum Regulator RogB zeigt und deshalb als RogB2 bezeichnet wurde. Aufgrund der räumlichen Nähe des *rogB2*-Gens (*gbs1530*) zum *hsh*-Gen (*gbs1529*) konnte vermutet werden, daß RogB2 die Expression des *hsh*-Gens kontrolliert. Wie auch der Regulator RogB, zeigt RogB2 Ähnlichkeiten zu den Regulatoren RofA und Nra aus *S. pyogenes*, die in die Familie der RALP-Regulatoren eingeordnet werden (Kreikemeyer *et al*, 2003). In *S. pyogenes* stimuliert RofA die Expression des *prtF*-Gens, das stromaufwärts in divergenter Richtung zum *rofA*-Gen liegt, und für das Fibronektin-bindende Protein F codiert (Fogg *et al*, 1994 & 1997). Protein F ist in *S. pyogenes* wesentlich an der bakteriellen Adhärenz an und der Invasion in Epithelzellen beteiligt (Hanski *et al*, 1992; Okada *et al*, 1998). Der Regulator Nra hingegen reprimiert die Expression des *cpA*-Gens, das stromaufwärts in divergenter Richtung zum *nra*-Gen liegt, und für das Kollagen-bindende Oberflächenprotein CpA codiert (Podbielski *et al*, 1999). Die Bedeutung von RogB2 für die Virulenz von *S. agalactiae* im Allgemeinen, sowie dessen Einfluß auf die *hsh*-Expression und die damit verbundene bakterielle Bindung an Keratin 4 im Speziellen, wurde

bereits von A. Eichner (2005) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß eine Deletion des *rogB2*-Gens in *S. agalactiae* die Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen erhöht. Des Weiteren führte die Deletion des *rogB2*-Gens in *S. agalactiae* NEM316 zu einer gesteigerten bakteriellen Adhärenz an die humane Lungenepithelzelllinie A549. Eine Deletion des für den Hauptfibrinogenrezeptor codierenden *fbsA*-Gens führt in *S. agalactiae* zu einem vollständigen Verlust der Fibrinogenbindung und zeigt deutliche Auswirkungen auf die bakterielle Adhärenz an Epithelzellen (Schubert *et al*, 2002 & 2004; Zakikhany, 2002). Aus diesem Grund war es nicht erstaunlich, daß über realtime PCR Experimente ein reprimierender Einfluß des Regulators RogB2 auf die *fbsA*-Expression nachgewiesen wurde, womit sich die erhöhte Fibrinogenbindung und die erhöhte Adhärenz der *S. agalactiae rogB2*-Deletionsmutante erklären läßt. In der vorliegenden Arbeit war es nun möglich, durch Einbringen eines plasmidcodierten *rogB2*-Gens in die *S. agalactiae rogB2*-Mutante alle erwähnten Effekte auf Wildtyplevel zu senken und somit zu bestätigen, daß RogB2 in dem *S. agalactiae*-Stamm NEM316 Einfluß auf die *fbsA*-Expression, die Fibrinogenbindung und die Adhärenz an Epithelzellen nimmt. Zusätzlich zum reprimierenden Effekt von RogB2 auf die *fbsA*-Expression, wurde die bereits von A. Eichner (2005) gezeigte stimulierende Wirkung von RogB2 auf die Expression von *sapA* bestätigt. Die Funktion des SapA Proteins ist bislang ungeklärt, allerdings deuten jüngste Untersuchungen an, daß SapA Bestandteil bakterieller Fimbrien ist, für die eine Funktion bei der bakteriellen Interaktion mit Wirtsgewebe vermutet wird (Lauer *et al*, 2005). Des Weiteren konnte eine SapA-vermittelte Bindung von *S. agalactiae* an Lungenepithelzellen aufgezeigt werden (Gutekunst, 2004). Die *sapA*-Expression wird jedoch nicht nur durch RogB2 sondern auch durch den Regulator RogB beeinflußt, der in direkter Nähe zum *sapA*-Gen lokalisiert ist (Gutekunst, 2004).

Durch Arbeiten von A. Eichner (2005) mit einer *rogB2*-Deletionsmutante war gezeigt worden, daß RogB2 einen positiven Effekt auf die Expression des *hsh*-Gens ausübt. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit durch Einbringen des plasmidcodierten *rogB2*-Gens in die *rogB2*-Deletionsmutante bestätigt werden. So zeigte die *rogB2*-Komplementante die gleiche *hsh*-Expression wie der *S. agalactiae* Wildtyp, während die *rogB2*-Mutante eine deutlich reduzierte Expression des *hsh*-Gens aufwies. Da das Hsh-Protein Bindung an Keratin 4 vermittelt, war es umso erstaunlicher, daß eine *rogB2*-Deletionsmutante, trotz verminderter *hsh*-Expression, eine gesteigerte Bindung an Keratin 4 aufwies. Dies konnte nicht nur von A. Eichner (2005), sondern auch durch Experimente in der vorliegenden Arbeit, bestätigt werden. Es kann daher spekuliert werden, daß RogB2 gegebenenfalls die Bildung der bakteriellen Kapsel stimuliert, was zu einer

Maskierung des Hsh-Proteins auf der Oberfläche von *S. agalactiae* führt. In der *rogB2*-Mutante würde somit eine verminderte Kapselbildung dazu führen, daß trotz der reduzierten Expression von *hsh*, das Hsh-Protein auf der Oberfläche der Bakterien leichter zugänglich für Keratin 4 wäre. Auch bei *S. pyogenes* hemmt die Kapsel die bakterielle Aggregation mit spezifischen Speichelproteinen (Courtney *et al*, 1991). Zur Erklärung des Widerspruchs zwischen Keratin 4-Bindung und *hsh*-Expression in der *rogB2*-Mutante könnte auch vermutet werden, daß *S. agalactiae* neben Hsh noch weitere Keratin-bindende Proteine besitzt, auf deren Expression RogB2 wiederum einen negativen Effekt ausübt. Erstaunlich war zuletzt auch die Tatsache, daß eine *rogB2*-Deletionsmutante in Zellkulturexperimenten mit der humanen Rachenepithelzelllinie HEp2 eine deutlich verminderte Adhärenz zeigte. Es ist bekannt, daß Hsh die Bindung an humanes Keratin 4 vermittelt und in der verwendeten Epithelzelllinie HEp2 Keratin 4 im Cytoskelett vorliegt. Desweiteren zeigt eine *hsh*-Deletionsmutante eine reduzierte Bindung an HEp2-Zellen im Vergleich zum *S. agalactiae* Wildtyp. Die Tatsache, daß eine *rogB2*-Mutante mit verringerter *hsh*-Expression eine deutlich verminderte Adhärenz an HEp2-Zellen aufzeigt, bekräftigt die Vermutung, daß Hsh als bakterielles Oberflächenprotein eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Adhärenz an HEp2-Zellen spielt. Aufgrund der dennoch erhöhten Keratin 4-Bindung der *rogB2*-Mutante, scheint Keratin 4 vermutlich keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der bakteriellen Bindung an HEp2-Zellen zu spielen. Bei dem Bindungspartner von Hsh scheint es sich um einen Rezeptor handeln, der auf A549-Zellen im Vergleich zu HEp2-Zellen nicht vorhanden oder so verändert ist, daß er von Hsh nicht oder nur sehr schlecht erkannt werden kann.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Untersuchungen zur Bedeutung des Regulators RovS für die Virulenz von *S. agalactiae* haben verdeutlicht, daß RovS die Expression vieler bekannter und potentieller Virulenzgene kontrolliert. Wie auch die anderen Mitglieder der Rgg-Familie der Transkriptionsregulatoren aus Gram-positiven Bakterien, spielt RovS eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Pathogenität. Zum ersten Mal war es möglich, eine potentielle Konsensussequenz für das DNA-Bindemotiv eines Regulators der Rgg-Familie zu formulieren. Alle durchgeführten Untersuchungen tragen zu einem besseren Verständnis des regulatorischen Netzwerkes bei, durch welches *S. agalactiae* die Synthese verschiedener Virulenzfaktoren reguliert. Weiter war es in der vorliegenden Arbeit möglich, das bakterielle Oberflächenprotein Hsh näher zu charakterisieren und dieses als erstes bekanntes Keratin 4-bindendes Protein zu identifizieren. In weiteren Studien muß nun die Bedeutung der Keratin 4-Bindung für die Virulenz von *S. agalactiae* geklärt werden. Die Identifizierung neuer Interaktionspartner von

Hsh kann in Zukunft zu einem besseren Verständnis der Virulenz von *S. agalactiae* beitragen. Dadurch könnten Ansatzpunkte geschaffen werden, das Adhärenzverhalten der Bakterien an Wirtsgewebe besser zu begreifen Des Weiteren war es möglich, erste Ergebnisse über die Regulation der Expression des *hsh*-Gens und weiterer Virulenzfaktoren durch den zur RALP-Familie der Transkriptionsregulatoren gehörenden Regulator RogB2 zu erzielen. In weiterführenden Untersuchungen könnte die Bedeutung von RogB2 auf die Virulenz von *S. agalactiae* noch genauer analysiert werden, um das regulatorische Netzwerk, durch welches die Synthese von Virulenzfaktoren beeinflußt wird, besser zu verstehen.

V. Zusammenfassung

S. agalactiae gilt als Hauptverursacher schwer verlaufender Pneumonien, Septikämien und Meningitiden bei Neugeborenen und stellt zunehmend eine Gefahr für ältere Menschen und Erwachsene mit geschwächtem Immunsystem dar. Aufgrund der medizinischen Bedeutung von *S. agalactiae* ist es von großem Interesse, die Grundlagen der Virulenz dieser Bakterien und ihre Überlebensstrategien im menschlichen Wirt besser zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des Regulators RovS auf die Interaktion von *S. agalactiae* mit menschlichen Proteinen und Epithelzellen, sowie auf die Expression potentieller und bekannter Virulenzfaktoren untersucht. Die Deletion des *rovS*-Gens im Genom von *S. agalactiae* 6313 führte zu einer erhöhten Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen und zu einer besseren Adhärenz an die humane Lungenepithelzelllinie A549. Durch Einbringen eines plasmidcodierten *rovS*-Gens in die Deletionsmutante wurden diese Effekte wieder aufgehoben. Dies macht deutlich, daß RovS Einfluß auf die Bindung von *S. agalactiae* an humanes Fibrinogen und die bakterielle Adhärenz nimmt. Mit Hilfe von quantitativen realtime PCR-Experimenten, konnte ein negativer Einfluß von RovS auf die Expression des *fbsA*-Gens nachgewiesen werden. Da das FbsA-Protein den Hauptfibrinogenrezeptor in *S. agalactiae* darstellt und maßgeblich an der bakteriellen Adhärenz beteiligt ist, kann vermutet werden, daß die veränderte *fbsA*-Expression in der *rovS*-Deletionsmutante Grund für deren erhöhte Fibrinogenbindung und Adhärenz ist. Desweiteren konnte ein stimulierender Effekt von RovS auf die Expression der Gene *rogB*, *sodA*, *gbs0230* bzw. des *cyl*-Operons nachgewiesen werden. In Bandshift-Experimenten mit aufgereinigtem RovS-Protein war es schließlich möglich, eine Bindung des Regulators an die Promotorregionen der Gene *fbsA*, *sodA*, *gbs0230* bzw. des *cyl*-Operons zu zeigen und somit eine direkte Beteiligung von RovS an der Expression dieser Gene zu bestätigen. Letztendlich wurde ein unvollständiges Palindrom als RovS-DNA-Bindemotiv im *fbsA*-Promotorbereich identifiziert und es war möglich, dieses Motiv auch vor den Genen *sodA*, *gbs0230* bzw. vor dem *cyl*-Operon nachzuweisen. Somit konnte für die DNA-Bindung durch RovS eine potentielle Konsensussequenz, die aus einem unvollständigem Palindrom besteht, formuliert werden. Des Weiteren wurde durch Gelfiltrationsexperimente nachgewiesen, daß RovS in nativer Form als Dimer vorliegt. Letztendlich wurde über epidemiologische Untersuchungen gezeigt, daß *rovS* in *S. agalactiae* weit verbreitet ist und somit aufgrund seines deutlichen Einflusses auf die bakteriellen Virulenz einen wichtigen Pathogenitätsfaktor darstellt.

Weiter konnte in der vorliegenden Arbeit das als Hsh bezeichnete Oberflächenprotein näher charakterisiert werden. In Western-Blot-Experimenten mit dem aufgereinigten Hsh N-Terminus (HshN) wurde dessen Bindung an ein humanes Speichelprotein gezeigt, das als humanes Keratin 4 identifiziert werden konnte. Zum Nachweis der Keratin 4-bindenden Domäne des Hsh-Proteins, wurden Abschnitte von HshN als Fusionsproteine aufgereinigt. Schließlich war es möglich, die Keratin 4-bindende Domäne auf einen Bereich von 178 Aminosäuren im N-Terminus von Hsh einzugrenzen. Mit Hilfe eines *E. coli* Klons, der das humane Keratin 4-Gen auf einem Plasmid codiert trägt, konnten der N- und C-Terminus des humanen Keratin 4 als Fusionsproteine aufgereinigt werden. In Western-Blot-Experimenten wurde festgestellt, daß der C-terminale Bereich des Keratin 4 mit HshN interagiert. Aufgrund der Ähnlichkeit von Hsh zu Fibrinogen-bindenden Proteinen aus anderen Streptokokken Arten, wurde auch die Fähigkeit von HshN untersucht, an Fibrinogene unterschiedlichen Ursprungs zu binden. Dabei wurde gezeigt, daß HshN nur in der Lage ist, mit Rinderfibrinogen zu interagieren, wobei die Bindung sowohl an die α, wie auch die β-Untereinheit des Fibrinogen erfolgt. In Western-Blot-Experimenten war es schließlich möglich, die Fibrinogen-bindende Domäne des Hsh-Proteins auf einen Bereich von 102 Aminosäuren in dessen N-Terminus einzugrenzen. Dabei wurde deutlich, daß die Keratin 4-bindende und die Rinderfibrinogen-bindende Domäne in verschiedenen Domänen des Hsh-Proteins lokalisiert sind. Um auch den Einfluß von Hsh auf die Virulenz von *S. agalactiae* zu untersuchen, wurde eine *hsh*-Deletionsmutante hergestellt, in welcher der 5´-terminale Bereich des *hsh*-Gens deletiert wurde. In Zellkulturexperimenten konnte kein Einfluß dieses Defekts auf die bakterielle Adhärenz an und die Invasion in humane Lungenepithelzellen gezeigt werden. Die bakterielle Adhärenz an die humane Rachenepithelzelllinie HEp2 wurde hingegen durch die Deletion des 5´-terminalen Bereichs von *hsh* drastisch reduziert. In weiteren Untersuchungen, in denen verschiedene Hsh-Fusionsproteine in Kompetitionsversuche mit HEp2-Zellen eingesetzt wurden, konnte der Nachweis gebracht werden, daß Hsh und vermutlich dessen Keratin 4-bindende Domäne an der Adhärenz von *S. agalactiae* an HEp2-Zellen beteiligt sind. Des Weiteren zeigte die *hshN*-Deletionsmutante eine deutlich reduzierte Bindung an humanes Keratin 4 und in Western-Blot-Experimenten konnte in der Triton-unlöslichen-Cytoskelett-Fraktion von HEp2-Zellen Keratin 4 nachgewiesen werden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und Hsh-spezifischen Antikörpern war es darüber hinaus möglich, Hsh auf der Oberfläche des *S. agalactiae* Wildtyps 6313, aber nicht auf der Oberfläche der *hshN*-Mutante zu detektieren. Epidemiologische Studien, verdeutlichten zusätzlich eine weite Verbreitung von *hsh* in *S. agalactiae*, jedoch wurde festgestellt, daß der 3´-Bereich des *hsh*-Gens in verschiedenen *S. agalactiae*-Stämmen signifikante Längenunterschiede aufweist.

Zuletzt wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluß des Regulators RogB2 auf die Virulenz von *S. agalactiae* untersucht. Eine Deletion des Gens *rogB2* im Genom von *S. agalactiae* NEM316 führte dabei zu einer stark erhöhten bakteriellen Adhärenz an humane Lungenepithelzellen, einer deutlich gesteigerten Bindung an humanes Keratin 4 und einer erhöhte Bindung an humanes Fibrinogen. Diese Effekte konnten durch das Einbringen eines plasmidcodierten *rogB2*-Gens in die *rogB2*-Mutante aufgehoben werden. Dies macht deutlich, daß RogB2 Einfluß auf die Bindung von *S. agalactiae* an humanes Fibrinogen und humanes Keratin 4, sowie auf die bakterielle Adhärenz nimmt. In realtime PCR-Experimenten wurde in leicht negativer Effekt von RogB2 auf die *fbsA*-Expression nachgewiesen, was in Zusammenhang mit der erhöhten bakteriellen Adhärenz und der verbesserten Fibrinogenbindung stehen könnte. Zusätzlich wurde eine stimulierende Wirkung von RogB2 auf die Expression von *hsh* und *sapA* festgestellt. Während die Funktion des SapA Proteins bislang unbekannt ist, bindet das Hsh-Protein an humanes Keratin 4. Da nun die *rogB2*-Mutante eine gesteigerte Bindung an Keratin 4 zeigte, jedoch eine verminderte Expression des *hsh*-Gens aufwies, kann vermutet werden, daß *S. agalactiae* verschiedene Keratin-bindende Proteine besitzt, auf deren Expression RogB2 wiederum einen negativen Effekt ausübt. Zellkulturexperimente mit der humanen Rachenepithelzelllinie HEp2 ergaben letztendlich eine verminderte Adhärenz der *rogB2*-Deletionsmutante. Aufgrund der reduzierten *hsh*-Expression in der *rogB2*-Mutante, der verminderten Adhärenz der *hsh*-Mutante an HEp2-Zellen und der dennoch erhöhten Keratin 4-Bindung der *rogB2*-Mutante, läßt sich ein direkter Zusammenhang zwischen Hsh als bakterielles Oberflächenprotein und dessen Bindung an einen Wirtsrezeptor der HEp2-Zellen herstellen. Allerdings wird die genaue Rolle von Hsh bei der Adhärenz von *S. agalactiae* an Epithelzellen der Gegenstand weiterführender Studien sein.

VI. Summary

S. agalactiae is a commensal colonizing the gastrointestinal tract of a considerable part of the human population, but it is also the leading cause of bacterial pneumonia, sepsis, and meningitis in human newborns. In addition, it has emerged as an increasingly common cause of invasive disease in the elderly and in immunocompromised persons. Because of the medical relevance of *S. agalactiae* it is of great interest, to gain a better understanding of its virulence and the strategy of the bacteria to survive in the human host.

In the present study, the impact of the regulator RovS on the interaction of *S. agalactiae* with human proteins and epithelial cells, and on the expression of known and potential virulence factors was investigated. The deletion of *rovS* in the genome of *S. agalactiae* 6313 increased the binding of the bacteria to human fibrinogen and the adherence to human lung epithelial cells. A plasmid-mediated expression of *rovS* in the *rovS*-mutant restored these effects to wildtype-level. This indicates, that RovS has an effect on the binding of *S. agalactiae* to human fibrinogen and on the adherence to host cells. In quantitative realtime PCR-experiments a negative impact of RovS on the expression of the *fbsA* gene was determined. Since FbsA is the main fibrinogen receptor in *S. agalactiae* and it is involved in the adherence to epithelial cells, the results suggest that the increased *fbsA*-expression in the *rovS*-mutant caused its increased binding to human fibrinogen and its increased adherence to lung epithelial cells. Further studies showed a stimulating effect of RovS on the expression of the genes *rogB*, *sodA*, *gbs0230* and the *cyl*-operon. To answer the question whether RovS has an effect on the transcription of these genes by binding directly to their promoter regions, bandshift assays were performed. It could be shown that RovS binds directly to the promotor regions of the *cyl*-operon and of the genes *fbsA*, *gbs0230* and *sodA*. Within the *fbsA*-promotor it was possible to identify a RovS DNA binding motif, that also could be found in the promotor region of *sodA*, *gbs0230* and the *cyl*-operon. Consequently a consensus sequence for the RovS binding site, containing an imperfect palindromic sequence, could be proposed. In gelfiltration experiments the native RovS protein was found to have a dimeric structure. Finally, epidemiological studies revealed a wide distribution of the *rovS* gene in *S. agalactiae*. Therefore, RovS appears to be an important pathogenic factor due to its influence on the virulence of *S. agalactiae*.

In the present study, also the bacterial surface protein Hsh was functionally characterised. In Western blot experiments the purified N-terminus of Hsh (HshN) was demonstrated to interact

with a human salivary protein, which was identified to be keratin 4. To detect the keratin 4-binding domain of Hsh, parts of HshN were synthesized and purified as fusionproteins. Finally it was possible to localise the keratin 4-binding domain to a region of 178 aminoacids in the N-terminus of Hsh. By dint of an *E. coli* strain, carrying the human *krt4* gene on a plasmid, portions of the *krt4* gene were subcloned which allowed the purification of the N- and C-terminus of keratin 4. In Western blot experiments it was demonstrated, that the C-terminal region of keratin 4 interacts with HshN. Because of the similarity of Hsh to fibrinogen-binding proteins of different streptococcal strains, the ability of HshN to bind fibrinogen was tested. It could be shown that HshN ist able to interact with the α- and β-subunit of bovine fibrinogen. Using different parts of HshN as fusionproteins in Western blot analysis, it was possible to restrict the fibrinogen-binding domain to an area of 102 aminoacids in the N-terminus of Hsh. It became apparent that the keratin 4- and the fibrinogen-binding domain are located in different regions of the N-terminus of Hsh. To investigate the influence of Hsh on the virulence of *S. agalactiae*, a *hsh*-mutant was constructed, in which the 5´-region of the *hsh* gene (*hshN*) had been deleted. Cell culture experiments revealed no influence of this defect on the bacterial adherence to and invasion in human lung epithelial cells. However, adherence of the *S. agalactiae hshN* mutant to the human larynx cell line HEp2 was dramatically decreased. Furthermore, competition experiments with Hep2 cells demonstrated a direct involvement of HshN and its keratin 4-binding domain in the adherence of *S. agalactiae* to HEp2 cells. In addition, the *S. agalactiae hshN*-mutant showed a reduced binding to human keratin 4 and in Western blot experiments, keratin 4 could be detected in the Triton-insoluble-cytoskeleton-fraction of HEp2 cells. Via fluorescence microscopy and Hsh-specific antibodies, Hsh could be found on the surface of the *S. agalactiae* wildtype 6313, but not on the surface of the *hshN*-mutant. Epidemiological studies revealed a wide prevalence of the *hsh* gene in *S. agalactiae*, however, different clinical isolates of *S. agalactiae* showed significant size variation in the 3´-end of the *hsh* gene.

At last, the impact of the regulator RogB2 on the virulence of *S. agalactiae* was investigated in the present study. The deletion of *rogB2* in the genome of *S. agalactiae* Nem316 increased the binding of the bacteria to human fibrinogen and to human keratin 4, and enhanced the bacterial adherence to human lung epithelial cells. A plasmid-mediated expression of *rogB2* in the *rogB2*-mutant restored these effects to wildtype-level. This indicates, that RogB2 has an effect on the binding of *S. agalactiae* to human fibrinogen and to keratin 4, and on the bacterial adherence to host cells. In quantitative realtime PCR-experiments a slightly negative effect of RogB2 on the expression of the *fbsA* gene was determined. This could be associated with an increased bacterial

adherence and the improved ability of *S. agalactiae* Δ*rogB2* to bind to human fibrinogen. Furthermore, a stimulating effect of RogB2 on the expression of *hsh* and *sapA* was found. While the function of SapA is still unknown, Hsh is a keratin 4-binding protein of *S. agalactiae*. As the *rogB2*-mutant showed an increased binding to keratin 4, but a reduced expression of *hsh*, it could be speculated, that there are different keratin 4-binding proteins in *S. agalactiae*, whose expression is negatively controlled by RogB2. Cell culture experiments with the human larynx cell line HEp2 finally revealed a decreased adherence of *S. agalactiae* Δ*rogB2*. Due to a reduced *hsh*-expression in this strain, a decreased adherence of the *hsh*-mutant to HEp2 cells and a still increased binding of the-mutant to keratin 4, there is direct correlation between Hsh as a bacterial ligand that interacts with a receptor of Hep2-cells. However, further studies are required to elucidate the precise role of Hsh in the adherence of *S. agalactiae* to epithelial cells.

VII. Literaturverzeichnis

Adderson E.E., S. Takahashi, and J.F. Bohnsack. 2000. Bacterial genetics and human immunity to group B streptococci. Mol Genet Metab. 71: 451-454.

Akram M., and I.A. Khan. 2001. Isolated pulmonic valve endocarditis caused by group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*) – a case report and literature review. Angiology 52: 211-215.

Areschoug T., M. Stalhammar-Carlemalm, I. Karsson, and G. Lindahl. 2002. Streptococcal beta protein has separate binding sites for human factor H and IgA-Fc. J Biol Chem. 277: 12642-12648.

Aoyagi Y., E.E. Adderson, J.G. Min, M. Matsushita, T. Fujita, S. Takahashi, Y. Okuwaki, and J.F. Bohnsack. 2005. Role of L-ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes in the opsonophagocytosis of type III group B streptococci. J Immunol. 174: 418-425.

Baker C.J., and M.S. Edwards. 1995. Group B streptococcal infections, p. 980-1054. In J.S. Remington and J.O. Klein (ed.), Infectious disease of the fetus and newborn infant. The W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.

Bates C.S., C. Toukoki, M.N. Neely, and Z. Eichenbaum. 2005. Characterization of MtsR, a new metal regulator in group A *Streptococcus*, involved in iron acquisition and virulence. Infect Immun. 73: 5743-5753.

Beardsall K., M.H. Thompson M.H., and R.J. Mulla. 2000. Neonatal group B streptococcal infection in South Bedfordshire, 1993-1998. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 82: 205-207.

Beckert S., B. Kreikemeyer, and A. Podbielski. 2001. Group A streptococcal *rofA* gene is involved in the control of several virulence genes and eukaryotic cell attachment and internalization. Infect Immun. 69: 534-537.

Beckmann C., J.D. Waggoner, T.O. Harris, G.S. Tamura, and C.E. Rubens. 2002. Identification of novel adhesins from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. Infect Immun. 70: 2869-2876.

Bensing B.A, J.A. Lopez, and P.M. Sullam. 2004. The *Streptococcus gordonii* surface proteins GspB and Hsa mediate binding to sialylated carbohydrate epitopes on the platelet membrane glycoprotein Ibalpha. Infect Immun. 72: 6528-6537.

Berge A., and L. Björck. 1995. Streptococcal cysteine proteinase releases biologically active fragments of streptococcal surface proteins. J Biol Chem. 270: 9862–9867.

Berridge B.R., H. Bercovier, and P.F. Frelier. 2001. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. Vet Microbiol. 78:165-73.

Bignardi G.E. 1999. Surveillance of neonatal group B streptococcal infection in Sunderland. Commun Dis Public Health. 2: 64-65.

Birnboim H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Meth Enzymol. 100: 243-255.

Blankas D., M. Santin, M. Olmo, F. Alcaide, J. Carratala, and F. Gudiol. 2004. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics, and outcome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 23: 168-173.

Bohnsack J.F., X.N. Zhou, P.A. Williams, P.P. Cleary, C.J. Parker, and H.R. Hill. 1991. Purification of the proteinase from group B streptococci that inactivates human C5a. Biochim Biophys Acta. 1079: 222-228.

Bohnsack J.F., X.N. Zhou, J.N. Gustin, C.E. Rubens, C.J. Parker, and H.R. Hill. 1992. Bacterial evasion of the antibody response: human IgG antibodies neutralize soluble but not bacteria-associated group B streptococcal C5a-ase. J Infect Dis. 165: 315-321.

Bolduc G.R., M.J. Baron, C. Gravekamp, C.S. Lachenauer, and L.C. Madoff. 2002. The alpha C protein mediates internalization of group B *Streptococcus* within human cervical epithelial cells. Cellular Microbiology. 4: 751-758.

Boyle E.C., and B.B. Finlay. 2003. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. Curr Opin Cell Biol. 15: 633-639.

Broughton R.A., and C.J. Baker. 1983. Role of adherence in the pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection. Infect Immun. 39: 837-843.

Brown J.H. 1919. The use of blood agar for the study of streptococci. New York, The Rockefeller Institute for Medical Research; Monograph No 9: 122.

Brown J.H. 1939. Double-zone beta haemolytic streptococci. J Bacteriol. 37: 133-144.

Bulgakova T.N., K.B. Grabovskaya, M. Ryc, and J. Jelinkova. 1986. The adhesin structures involved in the adherence of group B streptococci to human vaginal cells. Folia Microbiol. 31: 394-401

Busby S.A., and R.H. Ebright. 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. Cell. 79: 743-746.

Butler K.M., C.J. Baker, and M.S. Edwards. 1987. Interaction of soluble fibronectin with group B streptococci. Infect Immun. 55: 2404-2408.

Calvin N.M, and P.C. Hanawalt. 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. J Bacteriol. 170: 2796-2801.

Campbell J.R, S.L. Hillier, M.A. Krohn, P. Ferrieri, D.F. Zaleznik, and C.J. Baker. 2000. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. Obstet Gynecol. 96: 498-503.

Chaussee M.A, E.A. Callegari, and M.S. Chaussee. 2004. Rgg regulates growth phase-dependent expression of proteins associated with secondary metabolism and stress in *Streptococcus pyogenes*. J Bacteriol. 186: 7091-7099.

Chaussee M.S., D. Gerlach, C.E. Yu, and J.J. Ferretti. 1993. Inactivation of the streptococcal erythrogenic toxin B gene (*speB*) in *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun. 61: 3719–3723

Chaussee M.S., D. Ajdic, and J.J. Ferretti. 1999. The *rgg* gene of *Streptococcus pyogenes* NZ131 positively influences extracellular SpeB production. Infect Immun. 67: 1715-1722.

Chaussee M.S., R.O. Watson, J.C. Smoot, and J.M. Musser. 2001. Identification of Rgg-regulated exoproteins of *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun. 69: 822-831.

Chaussee M.S., G.L. Sylva, D.E. Sturdevant, L.M. Smoot, M.R. Graham, R.O. Watson, and J.M. Musser. 2002. Rgg influences the expression of multiple regulatory loci to coregulate virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun. 70: 762-770.

Chaussee M.S., G.A. Somerville, L. Reitzer, and J.M. Musser,. 2003. Rgg coordinates virulence factor synthesis and metabolism in *Streptococcus pyogenes*. J Bacteriol. 185: 6016-6024.

Cheng Q., D. Stafslien, S.S. Purushothaman, and P. Cleary. 2002. The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. Infect Immun. 70: 2408-2413.

Chhatwal G.S., I.S. Dutra, and H. Blobel. 1985. Fibrinogen binding inhibits the fixation of the third component of human complement on surface of groups A, B, C, and G streptococci. Microbiol Immunol. 29: 973-980.

Chieslewicz M.J., D.L. Kasper, Y. Wang, and M.R. Wessels. 2001. Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. J Biol Chem. 276: 139-146.

Chu P.G., and L.M. Weiss. 2002. Keratin expression in human tissues and neoplasms. Histophatology. 40: 403-439.

Cleary P.P., J. Handley, A.N. Suvorov, A. Podbielski, and P. Ferrieri. 1992. Similarity between the group B and A streptococcal C5a peptidase genes. Infect Immun. 60: 4239-4244.

Colebrook L., and A.W. Purdie. 1937. Treatment of 106 cases of puerperal fever by sulphanilamide. Lancet. 2: 1237-1242.

Courtney H.S, and D.L. Hasty. 1991. Aggregation of group A streptococci by human saliva and effect of saliva on streptococcal adherence to host cells. Infect Immun. 59:1661-1666.

Courtney H.S., Y. Li, J.B. Dale, and D.L. Hasty. 1994. Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. Infect Immun. 62:3937-3946.

Cunningham M.W. 2000. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clin Microbiol Rev.13: 470-511.

Cue D., P.E. Dombek, H. Lam, and P.P. Cleary. 1998. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. Infect Immun. 66: 4593-4601.

Dalton T.L., and J.R. Scott. 2004. CovS inactivates CovR and is required for growth under conditions of general stress in *Streptococcus pyogenes*. J Bacteriol. 186: 3928-3937.

Daley A.J., and S.M. Garland. 2004. Prevention of neonatal group B streptococcal disease: Progress, challenges and dilemmas. J Paediatr Child Health. 40: 664-668.

DiRita V.J., and J.J. Mekalanos. 1989. Genetic regulation of bacterial virulence. Annu Rev Genet. 33: 455-482.

Doolittle RF. 1984. The structure and evolution of vertebrate fibrinogen. Ann N Y Acad Sci. 408: 13-27.

Doran K.S., J.C. Chang, V.M. Benoit, I. Eckmann, and V. Nizet. 2002. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. J Infect Dis. 185: 196-203.

Dubendorff J.W., and F.W. Studier. 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. J Mol Biol. 219: 45-59.

Edwards M.S., D.L. Kasper, H.J. Jennings, C.J. Baker, and A. Nicholson-Weller. 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. J Immunol. 128: 1278-1283.

Eleaume H., and S. Jabbouri. 2004. Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during *in vitro* growth. J Microbiol Methods. 59: 363-370.

Eichner A. 2005. Funktionelle Charakterisierung des Regulators RogB2 aus *Streptococcus agalactiae.* Diplomarbeit an der Universität Ulm.

Eickhoff T.C., J.O. Klein, K.L. Daly, D.I. Ingall, and M. Finland. 1964. Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. N Engl J Med. 271: 1221-1228.

Elsinghorst E.A. 1994. Measurement of invasion by gentamicin resistance. Methods Enzymol. 236: 405-419.

Embleton N., U. Wariyar, and E. Hey. 1999. Mortality from early onset group B streptococcal infection in the United Kingdom. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 80: F139-F141.

Farley M.M., R.C. Harvey, T. Stull, J.D. Smith, A. Schuchat, J.D. Wenger, and D.S. Stephens. 1993. A population-based assessment of invasive disease due to group B *Streptococcus* in nonpregnant adults. N Engl J Med. 328: 1807-1811.

Farley M.M. 1995. Group B streptococcal infection in older patients: Spectrum of disease and management strategies. Drugs and Aging. 6: 293-300.

Federle M.J., K.S. McIver, and J.R. Scott. 1999. A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A *Streptococcus*. J Bacteriol. 181: 3649-3657.

Feldman R.G., G.T. Rijkers, M.E. Hamel, S. David, and B.J. Zegers. 1998. The group B streptococcal capsular carbohydrate: immune response and molecular mimicry. Adv Exp Med Biol. 435: 261-269.

Ferretti J.J. 2000. Gram-positive Pathogens. American Society for Microbiology.

Ferrieri P. 1988. Surface-localized protein antigens of group B streptococci. Rev Infect Dis. 10 Suppl 2: S363-S366.

Fogg G.C., C.M. Gibson, and M.G. Caparon. 1994. The identification of *rofA*, a positive-acting regulatory component of *prtF* expression: use of an gamma delta-based shuttle mutagenesis strategy in *Streptococcus pyogenes*. Mol Microbiol. 11: 671-684.

Fogg G.C., and M.G. Caparon. 1997. Constitutive expression of fibronectin binding in *Streptococcus pyogenes* as a result of anaerobic activation of *rofA*. J Bacteriol. 179: 6172-6180.

Froeliger E.H., and P. Fives-Taylor. 2001. *Streptococcus parasanguis* fimbriae-associated adhesin Fap1 is required for biofilm formation. Infect Immun. 69: 2512-2519.

Fuchs F. 1995. Keratins and the skin. Annu Rev Cell Dev Biol. 11: 123-153.

Gaillot O., C. Poyart, P. Berche, and P. Trieu-Cuot. Molecular characterization and expression analysis of the superoxide dismutase gene from *Streptococcus agalactiae*. Gene. 204: 213-218.

Garrity G.M., M. Winters, and D.B. Searles. 2001 Taxonomic outline of the prokaryotic genera Bergey´s manual of systemic bacteriology. Sec. Ed., Springer Verlag; New York, Berlin, Heidelberg.

Gase K., J. Ozegowski, and H. Malke. 1998. The *Streptococcus agalactiae hylB* gene encoding hyaluronate lyase: completion of the sequence and expression analysis. Biochim Biophys Acta. 1398: 86-98.

Gibson R.L., M.K. Lee, C. Soderland, E.Y. Chi, and C.E. Rubens. 1993 Group B streptococcal invade epithelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion. Infect Immun. 61: 478-485.

Glaser P., C. Rusniok, C. Buchrieser, F. Chevalier, L. Frangeul, T. Msadek, M. Zouine, E. Couve, L. Lalioui, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, and F. Kunst. 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. Mol Microbiol. 45: 1499-1513.

Godfroid E., M. Geuskens, T. Dupressoir, I. Parent, and C. Szpirer. Cytokeratins are exposed on the outer surface of established human mammary carcinoma cells. J Cell Sci. 99 :595-607.

Gordillo M.E., K.V. Singh, C.J. Baker, and B.E. Murray. 1993. Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. J Clin Microbiol. 31: 1430-1434.

Granok A.B., D. Parsonage, R.P. Ross, and M.G. Caparon. 2000. The RofA binding site in *Streptococcus pyogenes* is utilized in multiple transcriptional pathways. J Bacteriol. 182: 1529-1540.

Gravekamp C., D.L. Kasper, J.L. Michel, D.E. Kling, V. Carey, and L.C. Madoff. Immunogenicity and protective efficacy of the alpha C protein of group B streptococci are inversely related to the number of repeats. Infect Immun. 65: 5216-5221.

Griffin A.M., V.J. Morris, and M.J. Gasson. 1996. The *cpsABCDE* genes involved in polysaccharide production in *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* strain NCBF 2393. Gene. 183: 23-27.

Gutekunst H. 2000. Isolierung und Charakterisierung des Regulatorgens *rogB* aus *Streptococcus agalactiae*. Diplomarbeit an der Universität Ulm.

Gutekunst H., B.J. Eikmanns, and D.J. Reinscheid. 2003. Analysis of RogB-controlled virulence mechanisms and gene repression in *Streptococcus agalactiae*. Infect Immun. 71: 5056-5064.

Gutekunst H., B.J. Eikmanns, and D.J. Reinscheid. 2004. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. Infect Immun. 72: 3495-3504.

Haase R., F. Nagel, W. Hirsch, and U. Sitka. 2003. Severe late-onset group B streptococcal infection: A case report. Z Geburtshilfe Neonatol. 207: 186-189.

Hahn H., D. Falke, and P. Klein. 1991. Medizinische Mikrobiologie. Springer-Verlag, Berlin.

Hanahan D. 1985. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. 166: 557-580.

Handley P.S, F.F. Correia, K. Russell, B. Rosan, and J.M. DiRienzo. 2005. Association of a novel high molecular weight, serine-rich protein (SrpA) with fibril-mediated adhesion of the oral biofilm bacterium *Streptococcus cristatus*. Oral Microbiol Immunol. 20:131-140.

Hanski E., and M. Caparon. 1992. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. Proc Natl Acad Sci. 89: 6172-6176.

Harris O.H., D.W. Shelver, J.F. Bohnsack, and C.E. Rubens. 2003. A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. J Clinic Inv. 111: 61-70.

Hartford O., L. O´Brian, K. Schofield, J. Wells, and T.J. Foster. 2001. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. Microbiology. 147: 2545-2552.

Hay E.D. 1991. Cell biology of extracellular matrix. Plenum Press, New York.

Heath A., V.J. DiRita, N.L. Barg, and N.C. Engleberg. 1999. A two-component regulatory system, CsrR-CsrS, represses expression of three *Streptococcus pyogenes* virulence factors, hyaluronic acid capsule, streptolysin S, and pyrogenic exotoxin B. Infect Immun. 67: 5298-5305.

Heath A., A. Miller, V.J. DiRita, and N.C Engleberg. 2001. Identification of a major, CsrRS-regulated secreted protein of group A *Streptococcus*. Microb. Pathog. 31: 81-89.

Heath P.T., G. Balfour, A.M. Weisner, A. Efstratiou, T.L. Lamagni, H. Tighe, L.A. O´Connell, M. Cafferkey, N.Q. Verlander, A. Nicoll, and A.C. McCartney. 2004. Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. Lancet. 363: 292-294.

Heath P.T, and R.G. Feldman. 2005. Vaccination against group B *Streptococcus*. Expert Rev Vaccines. 4: 207-218.

Heden L.O., E. Frithz, and G. Lindahl. 1991. Molecular characterization of an IgA receptor from group B streptococci: sequence of the gene, identification of a proline-rich region with unique structure and isolation of N-terminal fragments with IgA-binding capacity. Eur J Immunol. 21: 1481-1490.

Helmig R., N. Uldbjerg, J. Boris, and M Kilian. 1993. Clonal analysis of *Streptococcus agalactiae* isolated from infants with neonatal sepsis or meningitis and their mothers and from healthy pregnant women. J Infect Dis. 168: 904-909.

Hembrough T.A., L. Li, and S.L. Gonias. 1996. Cell-surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue-type plasminogen activator. J Biol Chem. 271: 25684-25691.

Hensler M.E., G.Y. Liu, S. Sobczak, K. Benirschke, V. Nizet, and G.P. Heldt. 2005. Virulence role of group B *Streptococcus* beta-hemolysin/cytolysin in a neonatal rabbit model of early-onset pulmonary infection. J Infect Dis. 191:1287-1291.

Herbert M.A., C.J. Beveridge, and N.J. Saunders. 2004. Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B *Streptococcus*. Curr Opin Infect Dis. 17: 225-229.

Herrman M., P.E. Vaudaux, D. Pittet, R. Aucktaler, P.D. Lew, and G. Schumacher. 1988. Fibronectin, fibrinogen and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. J Infec Dis 158: 693-701.

Hickman M.E., M.A. Rench, P. Ferrieri, and C.J. Baker. 1999. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. Pediatrics. 104: 203-209.

Ho M.Y., C.T. Wu, Y.T. Ku, F.Y. Huang, and C.C. Peng. 1999. Group B streptococcal infection in neonates: an 11-year review. Acta Paediatr Taiwan. 40: 83-86.

Honig E., J.W. Mouton, and W.I. van der Meijden. 1999. Can group B streptococci cause symptomatic vaginitis? Infect Dis Obstet Gynecol. 7: 206-209.

Hoskins J., W.E. Jr. Alborn, J. Arnold, L.C. Blaszczak, S. Burgett, B.S. DeHoff, S.T. Estrem, L. Fritz, D.J. Fu, W. Fuller, C. Geringer, R. Gilmour, J.S. Glass, H. Khoja, A.R. Kraft, R.E. Lagace, D.J. LeBlanc, L.N. Lee, E.J. Lefkowitz, J. Lu, P. Matsushima, S.M. McAhren, M. McHenney, K. McLeaster, C.W. Mundy, T.I. Nicas, F.H. Norris, M. O'Gara, R.B. Peery, G.T. Robertson, P. Rockey, P.M. Sun, M.E. Winkler, Y. Yang, M. Young-Bellido, G. Zhao, C.A. Zook, R.H. Baltz, S.R. Jaskunas, P.R. Jr. Rosteck, P.L. Skatrud, and J.I. Glass. 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus* pneumoniae strain R6. J Bacteriol. 183: 5709-5717.

Ishihama A. 1993. Protein-protein communication within the transcription apparatus. J Bacteriol. 175: 2483-2489.

Jacobsson K. 2003. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. *Vet. Microbiol*. 96: 103-113

Jakubovics N.S, A.W. Smith, and H.F. Jenkinson. 2000. Expression of the virulence-related Sca (Mn2+) permease in *Streptococcus gordonii* is regulated by a diphtheria toxin metallorepressor-like protein ScaR. Mol Microbiol. 38:140-153.

Jarva H., T.S. Jokiranta, R. Wurzner, and S. Meri. 2003. Complement resistance mechanisms of streptococci. Mol Immunol. 40: 95-107.

Jarva H., J. Hellwage, T.S. Jokiranta, M.J. Lehtinen, P.F. Zipfel, and S. Meri. 2004. The group B streptococcal beta and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion. J Immunol. 172: 3111-3118.

Jerlstrom P.G., G.S. Chhatwal, and K.N. Timmis. 1991. The IgA-binding beta antigen of the C protein complex of group B streptococci: sequence determination of its gene and detection of two binding regions. Mol Microbiol. 5: 843-849.

Jiang S.M., M.J. Cieslewicz, and D.L. Kasper. 2005. Regulation of virulence by a two-component system in group B *Streptococcus*. J Bacteriol. 187: 1105-1113.

Joh D., E.R. Wann, B. Kreikemeyer, P. Speziale, and M. Hook. 1999. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. Matrix Biol. 18: 211-223.

Johri A.K., J. Padilla, G. Malin, and L.C. Paoletti. 2003. Oxygen regulates invasiveness and virulence of group B *Streptococcus*. Infect Immun. 71: 6707-6711.

Josefsson E., K.W. McCrea, D.N. Eidhin, D. O'Connell, J. Cox, M. Höök, and T.J. Foster. 1998. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. Microbiol. 144: 3387-3395.

Juul S.E., M.G. Kinsella, W.E. Truog, R.L. Gibson, and G.J. Redding. 1996. Lung hyaluronan decreases during group B streptococcal pneumonia in neonatal piglets. Am J Respir Crit Care Med. 153: 1567-1570.

Kapur V., S. Topouzis, M.W. Jajesky, L.L. Li, M.R. Hamrick, R.J. Patti, and J.M. Musser. 1993. A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. Microb Pathog. 15: 327–346.

Kapur V., J.T. Maffei, R.S. Greer, L.L. Li, G.J. Adams, and J.M. Musser. 1994. Vaccination with streptococcal extracellular cysteine protease (interleukin-1 beta convertase) protects mice against challenge with heterologous group A streptococci. Microb Pathog. 16: 443–450.

Kayser F.H. 1998. Medizinische Mikrobiologie. 9. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Kawamura Y., Y. Itho, N. Mishima, K. Ohkusu, H. Kasai, and T. Ezaki. 2005. High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficilis*: *S. difficilis* Eldar *et al* 1995 is

a later synonym of *S. agalactiae* Lehmann and Neumann 1896 (approved lists 1980). Int J Syst Evol Microbiol. 55: 961-965.

Kling D.E., C. Gravekamp, L.C. Madoff, and J.L. Michel. 1997. Characterization of two distinct opsonic and protective epitopes within the alpha C protein of the group B *Streptococcus*. Infect Immun. 65: 1462-1467.

Kogan G., D. Uhrin, J.-R. Brisson, L.C. Paoletti, A.E. Blodgett, D.L. Kasper, and H.J. Jennings. 1996. Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. J Biol Chem. 271: 8786-8790.

Kreikemeyer B., S. Beckert, A. Braun-Kiewnick, and A. Podbielski. 2002. Group A streptococcal RofA-type global regulators exhibit a strain-specific genomic presence and regulation pattern. Microbiology. 148: 1501-1511.

Kreikemeyer B., K.S. McIver, and A. Podbielski. 2003. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. Trends Microbiol. 11: 224-232.

Kreikemeyer B., M, Klenk, and A. Podbielski. 2004. The intracellular status of *Streptococcus pyogenes*: role of extracellular matrix-binding proteins and their regulation. Int J Med Microbiol. 294: 177-188.

Krug A., V.F. Wendisch, and M. Bott. 2005. Identification of AcnR, a TetR-type repressor of the aconitase gene *acn* in *Corynebacterium glutamicum*. J Biol Chem. 280: 585-595.

Lachenauer C.S., D.L. Kasper, J. Shimada, Y. Ichiman, H. Ohtsuka, M. Kaku, L.C. Paoletti, P. Ferrieri, and L.C. Madoff. 1999. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. J Infect Dis. 179: 1030-1033.

Lamy M.C., M. Zouine, J. Fert, M.Vergassola, E. Couve, E. Pellegrini, P. Glaser, F. Kunst, T. Msadek, P. Trieu-Cuot, and C. Poyart. 2004. CovS/CovR of group B *Streptococcus*: a two-component global regulatory system involved in virulence. Mol Microbiol. 54: 1250-1268.

Lancefield R.C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J Exp Med. 57: 571-595.

Lancefield R.C. 1934. A serological differentiation of specific types of bovine haemolytic streptococci (group B). J Exp Med. 59: 441.

La Penta D., P. Framson, V. Nizet , and C. Rubens. 1997. Epithelial cell invasion by group B streptococci is important to virulence. Adv Exp Med Biol. 418**:** 631-634.

Lauer P., C.D. Rinaudo, M. Soriani, I. Margarit, D. Maione, R. Rosini, A.R. Taddei, M. Mora, R. Rappuoli, G. Grandi, and J.L. Telford. 2005. Genome analysis reveals pili in group B *Streptococcus*. Science. 309:105.

Lee N.Y., J.J. Yan, J.J. Wu, H.C. Lee, K.H. Liu, and W.C. Ko. 2005. Group B streptococcal soft tissue infections in non-pregnant adults. Clin Microbiol Infect.11:577-579.

Levin J.C., M.R.Wessels. 1998. Identification of *csrR/csrS*, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A *Streptococcus*. Mol Microbiol. 30: 209-219.

Li J., D.L. Kasper, F.M. Ausubel, B. Rosner, and J.L. Michel. 1997. Inactivation of the alpha C protein antigen gene, *bca*, by a novel shuttle/suicide vector results in attenuation of virulence and immunity in group B *Streptococcus*. Proc Natl Acad Sci. 94: 13251-13256.

Li S., and M.J. Jedrzejas. 2001. Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase. J Biol Chem. 276: 41407-41416.

Lim D.V., W.J. Morales, A.F. Walsh, and D. Kazanis. 1986. Reduction of morbidity and mortality rates for neonatal group B streptococcal disease through early diagnosis and chemoprophylaxis. J Clin Microbio. 23: 489-492.

Lindahl G., M. Stalhammar-Carlemalm, and T. Areschoug. 2005. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin Microbiol Rev. 18: 102-127.

Liu Y., B. Ames, E. Gorovits, B.D. Prater, P. Syribeys, J.H. Vernachio, and J.M. Patti. 2004. SdrX, a serine-aspartate repeat protein expressed by *Staphylococcus capitis* with collagen VI binding activity. Infect Immun. 72:6237-6244.

Lopez Sastre J.B., B. Fernandez Colomer, G.D. Coto Cotallo, and A. Ramos Aparicio. 2005. Trends in the epidemiology of neonatal sepsis of vertical transmission in the era of group B streptococcal prevention. Acta Paediatr. 94: 451-457.

Lucht J.M, P. Dersch, B. Kempf, and J. Bremer. 1994. Interactions fo the nucleoid-associated DNA-binding Protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. J Biol Chem. 269: 6578-6586.

Lüttiken R. 1983. Die Familie der *Streptococcaceae*. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Brandis H. und Otte H.J., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/ New York: 290-302.

Lyon W.R., C.M. Gibson, and M.G. Caparon. 1998. A role for trigger factor and an Rgg-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine proteinase of *Streptococcus pyogenes*. EMBO J. 17: 6263-6275.

Madigan M.T. 2000. Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag.

Maeland J.A., L. Bevanger, and R. Lyng. 2004. Antigenic determinants of alpha-like proteins of *Streptococcus agalactiae*. Clin Diagn Lab Immunol. 11: 1035-1039.

Maguin E., H. Prevost, S. Ehrlich, and A. Gruss. 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. J Bacteriol. 178: 931-935.

Maniatis A.N., J. Palerms, M. Kantzanou, N.A. Maniatis, and C. Christodoulou. 1996. *Streptococcus agalactiae* a vaginal pathogen ? J Med Microbiol. 44: 199-202.

Mardh P.A., and L. Westrom. 1976. Adherence of bacterial to vaginal epithelial cells. Infect Immun. 13: 661-666.

Markham R.B., A. Nicholson-Weller, G. Schiffman, and D.L. Kasper. 1982. The presence of sialic acid on two related bacterial polysaccharides determines the site of the primary immune response and the effect of complement depletion on the response in mice. J Immunol. 128: 2731-2733.

Marques M.B., D.L. Kasper, M.K. Pangburn, and M.R. Wessels. 1992. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. Infect Immun. 60: 3986-3993.

McCrea K.W., O. Hartford, S. Davis, D.N. Eidhin, G. Lina, P. Speziale, T.J. Foster, and M. Höök. 2000. The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermid*is. Microbiol. 146: 1535-1546.

McDevitt D., P. Francois, P. Vaudaux, and T.J. Foster. 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 11: 237-248.

Mikamo H., A.K. Johri, L.C. Paoletti, L.C. Madoff, and A.B. Onderdonk. 2004. Adherence to, invasion by, and cytokine production in response to serotype VIII group B streptococci. Infect Immun. 72: 4716-4722.

Miyazaki S., O. Leon, and C. Panos. 1988. Adherence of *Streptococcus agalactiae* to synchronously growing human cell monolayers without lipoteichoic acid involvement. Infect Immun. 56: 505-512.

Miller J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York.

Molinari G., M. Rohde, S.R. Talay, G.S. Chhatwal, S. Beckert, and A. Podbielski. 2001. The role played by the group A streptococcal negative regulator Nra on bacterial interactions with epithelial cells. Mol Microbiol. 40: 99-114.

Morag A.S., C.J. Saveson, and S.T. Lovett. 1999. Expansion of DNA repeats in *Escherichia coli*: Effects of recombination and replication functions. J Mol Biol. 289: 21-27.

Mosesson M.W., K.R. Siebenlist, and D.A. Meh. 2001. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. Ann N Y Acad Sci. 936: 11-30.

Mülhardt C. 2002. Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. Spektrum Verlag. Heidelberg. 3. Auflage

Navarre W.W., and O. Schneewind. 1994. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. Mol Microbiol. 14: 115-121.

Nealon T.J., and S.j. Mattingly. 1984. Role of cellular lipteichoic acids in mediating adherence of serotype III strains of group B streptococci to human embryonic, fetal, and adult epithelial cells. Infect Immun. 43: 523-530.

Neely M.N, W.R. Lyon, D.L. Runft, and M. Caparon. 2003. Role of RopB in growth phase expression of the SpeB cysteine protease of *Streptococcus pyogenes*. J Bacteriol. 185: 5166-5174.

Neurath M., X. Ma, and S. Petterson. 1997. DNA / Protein – Interaktion. Labor im Focus. Spektrum Verlag. Heidelberg.

Ni Eidhin D., S. Perkins, P. Francois, P. Vaudaux, M. Hook, and T.J. Foster. 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 30: 245-257.

Nizet V., R.L. Gibson, E.Y. Chi, P.E. Framson, M. Hulse, and C.E. Rubens. 1996. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. Infect Immun. 64: 3818-3826.

Nizet V., K.S. Kim, M. Stins, M. Jonas, E.Y. Chi. D. Nguyen, and C.C. Rubens. 1997. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. Infect Immun. 65: 5074-5081.

Nocard D., and A. Mollereau. 1887. Sur une mammile contagieuse des raches laitieres.. Amn Inst. Pasteur Paris 1: 109-126.

Nyberg P., M. Rasmussen, U. Von Pawel-Rammingen, and L. Bjorck. 2004. SpeB modulates fibronectin-dependent internalization of *Streptococcus pyogenes* by efficient proteolysis of cell-wall-anchored protein F1. Microbiology. 150: 1559-69.

O'Brien L.M, E.J. Walsh , R.C. Massey, S.J. Peacock, and T.J. Foster. 2002. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. Cell Microbiol. 4: 759-770.

Ohara-Nemoto Y., M. Sasaki, M. Kaneko, T. Nemoto, and M. Ota. 1994. Cysteine protease activity of streptococcal pyrogenic exotoxin B. Can J Microbiol. 40: 930–936.

Okada N., M. Watarai, V. Ozeri, E. Hanski, M. Caparon, and C. Sasakawa. 1997. A matrix form of fibronectin mediates enhanced binding of *Streptococcus pyogenes* to host tissue. J Biol Chem. 272: 26978-26984.

Okada N., I. Tatsuno, E. Hanski, M. Caparon, and C. Sasakawa. 1998. *Streptococcus pyogenes* protein F promotes invasion of HeLa cells. Microbiology. 144: 3079-3086.

Paoletti L.C., R.A. Ross, and K.D. Johnson. 1996. Cell growth rate regulates expression of group B *Streptococcus* type III capsular polysaccharide. Infect Immun. 64: 1220-1226.

Paoletti L.J., J. Bradford, and Paoletti L.C. 1999. A serotype VIII strain among colonizing group B streptococcal isolates in Boston, Massachusetts. J Clin Microbiol. 37: 3759-3760.

Patti J.M., B.L. Allen, M.J. McGavin, and M. Hook. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol. 48: 585-617.

Pei L., and J.I. Flock. 2001. Lack of *fbe*, the gene for a fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*, reduces its adherence to fibrinogen coated surfaces. Microb Pathog. 31:185-193.

Pietrocola G., A. Schubert, L. Visai, M. Torti, J.R. Fitzgerald, T.J. Foster, D.J. Reinscheid, and P. Speziale. 2005. FbsA, a fibrinogen-binding protein from *Streptococcus agalactiae*, mediates platelet aggregation. Blood . 105: 1052-1059.

Platt M.W., N. Correa, and C. Mold. 1994. Growth of group B streptococci in human serum leads to increased cell surface sialic acid and decreased activation of the alternative complement pathway. Can J Microbiol. 40: 99-105.

Plummer C., H. Wu, S.W. Kerrigan, G. Meade, D. Cox, and C.W. Ian Douglas. 2005. A serin-rich glycoprotein of *Streptococcus sanguis* mediates adhesion to platelets via GPIb. Br J Haematol. 129: 101-109.

Podbielski A., M. Woischnik, B.A. Leonard, and K.H. Schmidt. 1999. Characterization of *nra*, a global negative regulator gene in group A streptococci. Mol Microbiol. 31: 1051-1064.

Pomerantsev A.P., O.M. Pomerantseva, and S.H. Leppla. 2004. A spontaneous translational fusion of *Bacillus cereus* PlcR and PapR activates transcription of PlcR-dependent genes in *Bacillus anthracis* via binding with a specific palindromic sequence. Infect Immun. 72: 5814-5823.

Pospiech A., and B. Neumann. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. Trends Genet. 11: 217-218.

Poyart C., M.C. Lamy, C. Boumaila, F. Fiedler, and P. Trieu-Cuot. 2001. Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system. J Bacteriol. 183: 6324-6334.

Poyart C., E. Pellegrini, O. Gaillot, C. Boumaila, M. Baptista, and P. Trieu-Cuot. 2001. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. Infect Immun. 69: 5098-5106.

Pritchard D.G., and B. Lin. 1993. Group B streptococcal neuraminidase is actually a hyaluronidase. Infect Immun. 61: 3234-3239.

Qi F., P. Chen, and P.W. Caufield. 1999. Functional analyses of the promoters in the lantibiotic mutacin II biosynthetic locus in *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol. 65: 652-658.

Rawlinson E.L., I.F. Nes, and M. Skaugen. 2002. LasX, a transcriptional regulator of the lactocin S biosynthetic genes in *Lactobacillus sakei* L45, acts both as an activator and a repressor. Biochimie 84: 559-567.

Rawlinson E.L., I.F. Nes, and M. Skaugen. 2005. Identification of the DNA-binding site of the Rgg-like regulator LasX within the lactocin S promotor region. Microbiology. 151: 813-823.

Ricci M.L., R. Manganelli, C. Berneri, G. Orefici, and G. Pozzi. 1994. Electrotransformation of *Streptococcus agalactiae* with plasmid DNA. FEMS Microbiol Lett. 119: 47-52.

Ringdahl U., H.G. Svensson, H. Kotarsky, M. Gustafsson, and M. Weineisen. 2000. A role for the fibrinogen-binding regions of streptococcal M proteins in phagocytosis resistance. Mol Microbiol. 37: 1318-1326.

Ripka S. 2003. Identifizierung verschiedener Virulenzfaktoren aus *Streptococcus agalactiae*. Diplomarbeit an der Universität Ulm.

Ross R.A., L.C. Madoff, and L.C. Paoletti. 1999. Regulation of cell component production by growth rate in the group B *Streptococcus*. J Bacteriol. 181: 5389-5394.

Rubens C.E., H.V. Raff, J.C. Jackson, E.Y. Chi, J.T. Bielitzki, and S.L. Hillier. 1991. Pathophysiology and histopathology of group B streptococcal sepsis in *Macaca nemestrina* primates induced after intraamniotic inoculation: evidence for bacterial cellular invasion. J Infect Dis. 164: 320-330.

Rubens C.E., S. Smith, M. Hulse, E.Y. Chi, and G. van Belle. 1992 Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. Infect Immun. 60: 5157-5163.

Russell-Jones G.J., and E.C. Gotschlich. 1984. Identification of protein antigens of group B streptococci, with special reference to the Ibc antigens. J Exp Med. 160: 1476-1484.

Russell-Jones G.J., E.C. Gotschlich, and M.S. Blake. 1984. A surface receptor specific for human IgA on group B streptococci possessing the Ibc protein antigen. J Exp Med. 60: 1467-1475.

Saiki R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.H. Scharf, R. Higuchi, and K.B. Mulli. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239: 487-491.

Sajjan U.S., F.A. Sylvester, and J.F. Forstner. 2000. Cable-pilated *Burkholderia cepacia* binds to cytokeratin 13 of epithelial cells. Infect Immun. 68: 1787-1795.

Sajjan U.S., C. Ackerley, and J.F. Forstner. 2002. Interaction of *cblA*/adhesin-positive *Burkholderia cepacia* with squamous epithelium. Cell Microbiol. 4: 73-86.

Salyers A.A., and D.D. Whitt. 2002. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach.

Sambrook J., E.F. Fritsch, and J. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.

Samen U., B. Gottschalk, B.J. Eikmanns, and D.J. Reinscheid. 2004. Relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*. J Bacteriol. 186: 1398-1408.

Sanders J.W., K. Leenhouts, J. Burghoorn, J.R. Brands, G. Venema, and J. Kok. 1998. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. Mol Microbiol. 27: 299-310.

Schaller B. 2005. Charakterisierung FbsB-ähnlicher Proteine aus *Streptococcus agalactiae*. Diplomarbeit an der Universität Ulm.

Schlegel H.G. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag; Stuttgart.

Schneewind O., A. Fowler, and K.F. Faull. 1995. Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. Science 268: 103-106.

Schubert A., K. Zakikhany, M. Schreiner, R. Frank, B. Spellerberg, B.J. Eikmanns, and D.J. Reinscheid. 2002. A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. Mol Microbiol. 46: 557-569.

Schubert A, K. Zakikhany, G. Pietrocola, A. Meinke, P. Speziale, B.J. Eikmanns, and D.J. Reinscheid. 2004. The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. Infect Immun. 72: 6197-6205.

Schubert A. 2005. Identifizierung des *fbsA*-Gens aus *S. agalactiae* und Untersuchungen zur Bedeutung von FbsA für die Virulenz der Bakterien. Dissertation an der Universität Ulm.

Schuchat A. 1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. Clin Microbiol Rev. 11: 497-513.

Schuchat A. 1999. Group B *Streptococcus*. Lancet 353: 51-56.

Shet A, and P. Ferrieri. 2004. Neonatal & maternal group B streptococcal infections: a comprehensive review. Indian J Med Res. 120: 141-150.

Skaugen M., C.I. Abildgaard, and I.F. Nes. 1997. Organization and expression of a gene cluster involved in the biosynthesis of the lantibiotic lactocin S. Mol Gen Genet. 253: 674-686.

Skaugen M., E.L. Andersen, V.H. Christie, and I.F. Nes. 2002. Identification, characterization, and expression of a second, bicistronic, operon involved in the production of lactocin S in *Lactobacillus sakei* L45. Appl Environ Microbiol. 68: 720-727.

Sloan A.R., and Pistole T.G. 1992. A quantitative method for measuring the adherence of group B streptococci to murine peritoneal exudate macrophages. J Immunol Methods. 154: 217-223.

Sojar H.T., A. Sharma, and R.J. Genco. 2002. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae bind to cytokeratin of epithelial cells. Infect Immun. 70: 96-101.

Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. 98: 503.

Spellerberg B., E. Rozdzinski, S. Martin, J. Weber-Heynemann, N. Schnitzler, R. Lütticken, and A. Podbielski. 1999. Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. Infect Immun. 67: 871-878.

Spellerberg B., B. Pohl, G. Haase, S. Martin, J. Weber-Heynemann, and R. Lütticken. 1999. Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by ISS1 transposition. J Bacteriol. 181: 3212-3219.

Spellerberg B., E. Rozdzinski, S. Martin, J. Weber-Heynemann, and R. Lütticken. 2002. Rgf encodes a novel two-component signal transduction system of *Streptococcus agalactiae*. Infect Immun 70: 2434-2440.

Staines N., J. Brostoff, and K. James. 1999. Immunologisches Grundwissen. 3. Auflage. Spektrum-Verlag. Heidelberg.

Stalhammar-Carlemalm M., L. Stenberg, and G. Lindahl. 1993. Protein Rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. J Exp Med. 177: 1593-1603.

Sulavik M.C., G. Tardif, and D.B. Clewell. 1992. Identification of a gene, *rgg*, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the Spp phenotype of *Streptococcus gordonii* Challis. J Bacteriol. 174: 3577-3586.

Sulavik M.C., and D.B. Clewell. 1996. Rgg is a positive transcriptional regulator of the *Streptococcus gordonii gtfG* gene. J Bacteriol. 178: 5826-5830.

Takahashi S., Y. Nagano, N. Nagano, O. Hayashi, F. Taguchi, and Y. Okuwaki. 1995. Role of C5a-ase in group B streptococcal resistance to opsonophagocytic killing. Infect Immun. 63: 4764-4769.

Takahashi S., E.E. Adderson, Y. Nagano, N. Nagano, M.R. Briesacher, and J.F. Bohnsack. 1998. Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III group B streptococci. J Infect Dis. 177: 1116-1119.

Takahashi S., Y. Aoyagi, E.E. Adderson, Y. Okuwaki, and J.F. Bohnsack. 1999. Capsular sialic acid limits C5a production on type III group B streptococci. Infect Immun. 67: 1866-1870.

Takahashi Y., K. Konishi, J.O. Cisar, and M. Yoshikawa. 2002. Identification and characterization of *hsa*, the gene encoding the sialic acid-binding adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1. Infect Immun. 70: 1209-1218.

Takahashi Y., A. Yajima, J.O. Cisar, and K. Konishi. 2004. Functional analysis of the *Streptococcus gordonii* DL1 sialic acid-binding adhesin and its essential role in bacterial binding to platelets. Infect Immun. 72: 3876-3882.

Takamatsu D., B.A. Bensing, and P.M. Sullam. 2004. Four proteins encoded in the *gspB-secY2A2* operon of *Streptococcus gordonii* mediate the intracellular glycosylation of the platelet-binding protein GspB. J Bacteriol.186: 7100-7111.

Talay S.R., A. Zock, M. Rohde, G. Molinari, M. Oggioni, G. Pozzi, C.A. Guzman, and G.S. Chhatwal. 2000. Co-operative binding of human fibronectin to Sfbl protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. Cell Microbiol. 2: 521-535.

Tamura G.S., J.M. Kuypers, S. Smith, H. Raff, and C.E. Rubens. 1994. Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. Infect Immun. 62: 2450-2458.

Tamura G.S., and C.E. Rubens. 1995. Group B streptococci adhere to a variant of fibronectin attached to a solid phase. Mol Microbiol. 15: 581-589.

Tamura G.S., M. Herndon, J Przekwas, C.E. Rubens, P Ferrieri, and S.L. Hillier. 2000. Analysis of restriction fragment length polymorphisms of the insertion sequence IS1381 in group B Streptococci. J Infect Dis. 181: 364-368.

Tamura G.S., and A. Nittayajarn. 2000. Group B streptococci and other Gram-positive cocci bind to cytokeratin 8. Infect Immun. 68: 2129-2134.

Teixeira C.F., N.L Azevedo, T.M. Carvalho, J. Fuentes, and P.E. Nagao. 2001. Cytochemical study of *Streptococcus agalactiae* and macrophage interaction. Microsc Res Tech. 54: 254-259.

Tenenbaum T., C. Bloier, R. Adam, D.J. Reinscheid, and H. Schroten. 2005. Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae*. Infect Immun. 73: 4404-4409.

Teti G., F. Tomasello, M.S. Chiofalo, G. Orefici, and P. Mastroeni. 1987. Adherence of group B streptococci to adult and neonatal epithelial cells mediated by lipoteichoic acid. Infect Immun. 55: 3057-3064.

Tettelin H., V. Masignani, M.J. Cieslewicz, J.A. Eisen, S. Peterson, M.R. Wessels, I.T. Paulsen, K.E. Nelson, I. Margarit, T.D. Read, L.C. Madoff, A.M. Wolf, M.J. Beanan, L.M. Brinkac, S.C. Daugherty, R.T. DeBoy, A.S. Durkin, J.F. Kolonay, R. Madupu, M.R. Lewis, D. Radune, N.B. Fedorova, D. Scanlan, H. Khouri, S. Mulligan, H.A. Carty, R.T. Cline, S.E. Van Aken, J. Gill, M. Scarselli, M. Mora, E.T. Iacobini, C. Brettoni, G. Galli, M. Mariani, F. Vegni, D. Maione, D. Rinaudo, R. Rappuoli, J.L. Telford, D.L. Kasper, G. Grandi, and C.M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. Proc Natl Acad Sci. 99: 12391-12396.

Trijbels-Smeulders M., L.J. Gerards, P. de Jong, R.A. van Lingen, A.H. Adriaanse, G.A. de Jonge, and L.A. Kollee. Epidemiology of neonatal group B streptococcal disease in The Netherlands 1997-98. Paediatr Perinat Epidemiol. 16: 334-341.

Tung H., B. Guss, U. Hellman, L. Persson, K. Rubin, and C. Ryden. 2000. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. Biochem J. 345: 611-619.

Tyrrell G.J., A. Kennedy, S.E. Shokoples, and R.K. Sherburne. 2002. Binding and invasion of HeLa and MRC-5 cells by *Streptococcus agalactiae*. Microbiology. 148: 3921-3931.

Uh Y., I.H. Jang, G.Y. Hwang, K.J. Yoon, and W. Song. 2001. Emerging erythromycin resistance among group B streptococci in Korea. Eur J Clin Microbiol Infec Dis. 20: 52-54.

Uh Y., I.H. Jang, G.Y. Hwang, K.M. Lee, K.J. Yoon, and H.Y. Kim. 2004. Serotypes and genotypes of erythromycin-resistant group B streptococci in Korea. J Clin Microbiol. 42: 3306-3308.

Uh Y., H.Y. Kim, I.H. Jang, G.Y. Hwang, and K.J. Yoon. 2005. Correlation of serotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus agalactiae*. Yonsei Med J. 46: 480-483.

Vahling C.M., and K.S. McIver. 2005. Identification of residues responsible for the defective virulence gene regulator Mga produced by a natural mutant of *Streptococcus pyogenes*. J Bacteriol. 187: 5955-5966.

Valentin-Weigand P., P. Benkel, M. Rohde, and G.S. Chhatwal. 1996. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. Infect Immun. 64: 2467-2473.

Valentin-Weigand P., H. Jungnitz, A. Zock, M. Rhode, and G.S. Chhatwal. 1997. Characterisation of group B streptococcal invasion in HEp-2 epithelial cells. FEMS Microbiol Lett. 147: 69-74.

Vandamme P., L.A. Devriese, B. Pot, K. Kersters, and P. Melin. 1997. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic group B, type Ib *Streptococcus*. Int J Syst Bacteriol. 47: 81-85.

Velaphi S., J.D. Siegel, G.D. Wendel Jr, N. Cushion, W.M. Eid, and P.J. Sanchez. 2003. Early-onset group B streptococcal infection after a combined maternal and neonatal group B streptococcal chemoprophylaxis strategy. Pediatrics. 111: 541-547.

Vickerman M.M, P.E. Minick, and N.M. Mather. 2001. Characterization of the *Streptococcus gordonii* chromosomal region immediately downstream of the glucosyltransferase gene. Microbiology. 147: 3061-3070.

Vickerman M.M., and P.E. Minick. 2002. Genetic analysis of the *rgg-gtfG* junctional region and its role in *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase activity. Infect Immun. 70: 1703-1714.

Vickerman M.M, M. Wang, and L.J. Baker. 2003. An amino acid change near the carboxyl terminus of the *Streptococcus gordonii* regulatory protein Rgg affects its abilities to bind DNA and influence expression of the glucosyltransferase gene *gtfG*. Microbiology. 149: 399-406.

Von Hunolstein C., L. Parisi, S. Recchia, G. Alfarone, L. Nicolini, C. Volpe, R. Wagner, J. Motlova, and G. Orefici. 1999. Virulence properties of type VII *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) and immunochemical analysis of capsular type polysaccharide. J Med Microbiol. 48: 983-990.

Wästfelt M., M. Stahlhammar-Carlemalm, A.-M. Delisse, T. Cabezon, and G. Lindahl. 1996. Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure. J Biol Chem. 271: 18892-18897.

Wagner R. 2000. Transcription regulation in prokaryotes. Oxford University Press.

Walsh E.J., L.M. O´Brian, X. Liang, M. Hook, and T.J. Foster. 2004. Clumping factor B, a fibrinogen-binding MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) adhesin of *Staphylococcus aureus*, also binds to the tail region of type I cytokeratin 10. J Biol Chem. 279: 50691-50699.

Wei L., V. Pandiripally, E. Gregory, M. Clymer, and D. Cue. 2005. Impact of the SpeB protease on binding of the complement regulatory proteins factor H and factor H-like protein 1 by *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun.73: 2040-2050.

Weisner A.M, A.P. Johnson, T.L Lamagni, E. Arnold, M Warner, P.T. Heath, and A. Efstratiou. 2004. Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. Clin Infect Dis. 38: 1203-1208.

Wessels M.R. 1997. Biology of streptococcal capsular polysaccharides. Soc Appl Bacterial Symp Ser. 26: 20S-31S.

Wilkinson H.W., R.R. Facklam, and E.C. Wortham. 1973. Distribution by serological type of group B *Streptococcus* isolated from a variety of clinical material over a five-year period. Infect Immun. 8: 228-235.

Winram S.B., M. Jonas, E. Chi, and C.E. Rubens. 1998. Characterization of group B streptococcal invasion of human chorion and amnion epithelial cells in vitro. Infect Immun. 66: 4932-4941.

Wu H., K.P. Mintz, M. Ladha, and M. Fives-Taylor. 1998. Isolation and characterization of Fap1, a fimbriae associated adhesin of *Streptococcus parasanguis* FW213. Mol Microbiol 28: 487-500.

Wu H., and M. Fives-Taylor. 1999. Identification of dipeptide repeats and a cell wall sorting signal in the fimbriae-associated adhesin, Fap1, of *Streptococcus parasanguis*. Mol Microbiol 34: 1070-1081.

Yajima A., Y. Takahashi, and K. Konishi. 2005. Identification of platelet receptors for the *Streptococcus gordonii* DL1 sialic acid-binding adhesin. Microbiol Immunol. 49: 795-800.

Yamamoto Y., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Lamberet, A. Gruss, and P. Gaudu. 2005. Respiration metabolism of group B *Streptococcus* is activated by environmental haem and quinine and contributes to virulence. Mol Microbiol. 56: 525-534.

Zakikhany K. 2002. Molekularbiologische Analyse des *fbsA*-Gens von *Streptococcus agalactiae* und Untersuchungen zu dessen Bedeutung für die Virulenz der Bakterien. Diplomarbeit an der Universität Ulm.

Zhang Y., Y. Lei, A. Nobbs, A. Khammanivong, and M.C. Herzberg. 2005. Inactivation of *Streptococcus gordonii* SspAB alters expression of multiple adhesin genes. Infect Immun. 73: 3351-3357.

Zawaneh S.M., M.A. Elia, H. Baer, A.C. Cruz, and W.N. Spellacy. 1979. Factors influencing adherence of group B streptococci to human vaginal epithelial cells. Infect Immun. 26: 441-447.

VIII. Anhang

1. Material und Chemikalien

1.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind nachfolgend alphabetisch aufgelistet:

Aceton	Merck AG; Darmstadt
Acrylamidmix	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
(38,66 % Acrylamid, 1,33 % Bisacrylamid)	
Agarose	Gibco Life Technologies, Inc.; Eggenstein
Ammoniumsulfat	Merck AG; Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck AG; Darmstadt
Ampicillin	Merck AG; Darmstadt
Anti - DIG AP (Fab - Fragmente)	Boehringer Mannheim GmbH; Mannheim
Anti-HisTag HRP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-Maus IgG HRP	Dianova; Hamburg
Bacto - Agar	Difco Laboratories; Detroit, USA
Bacto - Hefeextrakt	Difco Laboratories; Detroit, USA
Bacto - Peptosepepton No3	Difco Laboratories; Detroit, USA
Bacto - Trypton	Difco Laboratories; Detroit, USA
Blocking - Reagenz	Boehringer Mannheim GmbH; Mannheim
Bovine Serum Albumin (BSA)	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Bradford-Reagenz	BIO-RAD Laboratories GmbH; München
Bromphenolblau	Merck AG; Darmstadt
Calciumchlorid - Dihydrat	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Chloroform	Merck AG; Darmstadt
Coomassie Brillant Blue	Serva Feinbiochemika; Heidelberg
CSPD® - Lösung	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
(Chemilumineszenz-Substrat)	

Desoxynukleotidtriphosphat - Mix (dNTP-Mix; je 2 mM)	MBI Fermentas GmbH; St. Leon – Rot
Digoxigenin - 11 - dUTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck AG; Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Car Roth GmbH, Karlsruhe
Eisessig	Merck AG; Darmstadt
Eisennitrat - Nonahydrat	Fluka - Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Eisensulfat - Heptahydrat	Merck AG; Darmstadt
Erythromycin	Sigma - Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Ethanol abs., unvergällt	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Ethanol abs., vergällt	Merck Eurolab GmbH
Ethidiumbromid	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka - Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Fibrinogen	Sigma - Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Fibronektin	Sigma - Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Ficoll TM-400	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
Fluoreszeinisothiocyanat	Sigma - Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Foetal Calf Serum (FCS)	Biochrom KG; Berlin
Formaldehyd	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Formamid	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Glucose	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Glycerin (99 %, wasserfrei)	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Glycin	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Größenstandards	
- λ-DNA für λ(*Bst*EII) - Marker	Promega; Heidelberg
- 1 kb-DNA-Ladder	MBI Fermentas GmbH; St. Leon - Rot
Heringssperma - DNA	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Isoamylalkohol (IAA)	Merck AG; Darmstadt
Isopropanol	Merck AG; Darmstadt

Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat	Merck AG; Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck AG; Darmstadt
di - Kaliumhydrogenphosphat	Merck AG; Darmstadt
Kanamycin	Merck AG; Darmstadt
Magnesiumchlorid x 6 H_2O	Merck AG; Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H_2O	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Mangansulfat	Serva Feinbiochemika; Heidelberg
MEM	Gibco Life Technologies, Inc., Eggenstein
ß-Mercaptoethanol	Serva Feinbiochemika; Heidelberg
Methanol	Merck AG; Darmstadt
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Natriumacetat	Merck AG; Darmstadt
Natriumbicarbonat	Gibco Life Technologies, Inc.; Eggenstein
Natriumcarbonat	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Natriumchlorid	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Natriumcitrat - Dihydrat	Merck AG; Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck AG; Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck AG; Darmstadt
di - Natriumhydrogenphosphat	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
di - Natriumhydrogenphosphat - Dihydrat	Merck AG; Darmstadt
Natriumhydroxidplätzchen	Merck AG; Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco Life Technologies, Inc.; Eggenstein
Natriumthiosulfat x 5 H_2O	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Ni-NTA-Agarose	Qiagen GmbH, Hilden
Non - Essential - Aminoacids (NEAA)	Gibco Life Technologies, Inc.; Eggenstein
Oligonukleotid - Primer	MWG Biotech GmbH; Ebersberg
Phenol / saures Phenol	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Phenolrot	Merck AG; Darmstadt

RPMI	Gibco Life Technologies, Inc., Eggenstein
Salzsäure (32 % und 37 %)	Merck AG; Darmstadt
Schafblut, defibriniert (SR0051D)	Oxoid; Wesel
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Stärke (löslich, reinst)	Merck AG; Darmstadt
TEMED	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
TMB	Sigma - Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Todd Hewitt Broth (THB)	Oxoid; Wesel
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma - Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Tris - Base	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Trypsin/ EDTA	Gibco Life Technologies, Inc.; Eggenstein
Tween 20	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Tween 80	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen

1.2. Geräte und Materialien

Alle in dieser Arbeit benutzten Geräte und Materialien sind nachfolgend alphabetisch geordnet aufgeführt:

Agarose - Gelelektrophorese - Kammer (Horizon^{TM} 11.14 und Modell H5)	Gibco Life Technologies, Inc; Eggenstein
Autoklav	H + P Labortechnik GmbH
Autoklav	ZIRBUS
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2, Zellkultur)	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
Cellophan-Papier	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Column, 2,5 ml, 10 µl Porengröße	MoBiTek, Göttingen
Cytofluor II fluorescence reader	PerSeptive Biosys., Inc.; Framingham, USA
Dialysefilter	Millipore GmbH; Eschborn

Dialyseschlauch (Viskings®-dialysis tubing 20/32) (MembraCell®-dialysis tubing MWCO 3500, Diameter: 22 mm)	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Einmalspritzen, 20 ml	Ersta, Røgby
Elektrophoresis Power Supply EPS 300	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
Elektroporationsgerät Gene - Pulser II	Bio – Rad Laboratories; Hercules, USA
Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems; Wetzlar
Fotodokumentationsanlage	MWG Biotech GmbH; Ebersberg
FrenchPress	SLM instruments, Inc.; New York, USA
Glasperlen (0,2 mm)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Heizblock (Thermostat 5320, Thermomixer compact)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg
Hybridisierungsofen Biometra OV2	Biometra GmbH; Göttingen
Hyperfilm ECL (18 x 24 cm)	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
Inkubationsschüttler:	
- Certomat MO	B. Braun Biotech International
- G 24 environmental incubator shaker	New Brunswick Scientific Inc.; USA
Kühlschrank	Liebherr; Ochsenhausen
Küvetten	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
- Black Quarz Pathlength 10 mm, 50µl	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
- Einmalküvetten	Ratiolab GmbH; Dreieich-Bucheck
- Elektroporationsküvetten	EQUIBIO
- Quarzglasküvetten	SUPRASIL
LI-COR 4000L	MWG Biotech AG, Ebersberg
Lightcyler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microcon 100-Mikrokonzentratoren	Amicon GmbH Millipore; Eschborn

Mikroskop	Olympus; Japan
Mikrowellengerät OPTIQUICK	Moulinex
Mixer 5432	Eppendorf AG; Hamburg
Mullbinde	Apotheke
Nylonmembran (positiv geladen)	Boehringer, Appligene oncor
PCR - Mastercycler 5330	Eppendorf AG; Hamburg
pH - Meter (WTW pH 521)	Wissenschaftl.-Techn.Werkstätten Weilheim
Photometer Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
Ribolyser	Hybaid GmbH; Heidelberg
Rühr - und Heizplatte (IKAMAG RCT)	IKA® - Labortechnik; Staufen
Schüttel - Wasserbad (Modell G76)	New Brunswick Scientific Co, Inc; Edison
Southern Blot Apparatur	
- `Vacu Gene XL - Blotter´	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
- `Vacu Gene pump´	Amersham Pharmacia GmbH; Freiburg
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schüll
Sterilwerkbank (Lamin Air® HA 2448 GS)	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
Tiefkühlschrank	
- -20°C	Liebherr; Ochsenhausen
- -70°C	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
Ultraschallgerät (Branson Sonifier 450)	Heinemann; Schwäbisch Gmünd
Ultraviolett - Crosslinker	Amersham Life Science
UV - Schirm	Bachhofer; Reutlingen
Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH und Co; Wertheim
Vortexer (Heidolph REAX 2000)	Heidolph; Kelheim
Waagen	
- Sartorius BP8100	Sartorius AG; Göttingen

- Mettler AE163	Mettler Toledo
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG; Uetze
24-Well-Platten	Labor Schubert und Weiss GmbH, München
96-Well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Whatmanpapier	Whatman Int. Ltd. Maidstone; England
Zellkulturflaschen (Falcon®)	Becton Dickinson Labware Europe; Le Pont de Chaix, France
Zellkulturflaschen	Labor Schubert und Weiss GmbH; München
Zentrifugen	
- Biofuge A (Tischzentrifuge)	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
- Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG; Hamburg
- HERMLE ZK 401	Eppendorf AG; Hamburg
- Varifuge 3.OR	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach

2. Abkürzungen

2.1. Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

2.2. Sonstige Abkürzungen

A	Adenin
abs.	absolut, 100%
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
A. dest.	destilliertes Wasser
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp^+	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ºC	Grad Celsius
ca.	circa
CIAP	´Calf Intestinal Alkaline Phosphatase`
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
ddNTP	Didesoxynukleosid - 5` - triphosphat
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid - 5` - triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ery	Erythromycin
Ery^+	Erythromycinresistenz
et al.	´et alii`(und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	Foetal Calf Serum
G	Guanin

g	Gramm
GAS	Gruppe A Streptokokken
GBS	Gruppe B Streptokokken
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H_2O	Wasser
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
k	kilo - (1×10^3)
Kan	Kanamycin
Kan^+	Kanamycinresistenz
kb	Kilo - Basenpaar
kDa	Kilodalton
λ	Bacteriophage λ
l	Liter
mA	Milliampere
mbar	Millibar
M	Molar (mol/l)
MCS	Multiple Cloning Site
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
mind.	mindestens
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mU	Milliunit
N	Normal (Anzahl Mole Äquivalentteilchen pro Liter)
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid

NEAAs	Non essential Aminoacids
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
N-Terminus	Amino-Terminus
Ω	Ohm
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
ori	origin, Replikationsursprung
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PBST	Phosphat bepufferte Saline mit Tween
PCR	´Polymerase Chain Reaction`
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RBS	Ribosomen - Bindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S. agalactiae	*Streptococcus agalactiae*
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde(n)
SSC	Standard - Saline - Citrat
Sol	Solution
T	Thymin
t	Zeit
TAE	Tris - Acetat - EDTA
Taq	*Thermus aquaticus*
TCA	Trichloracetat
TE	Tris - EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl-ethyl-diamin
THB	Todd Hewitt Broth
THY	THB mit Hefe
TY	Anzuchtmedium für *E. coli* aus Trypton, Hefe und NaCl
Tris	Tris - (hydroxymethyl-) aminomethan
U	Enzymeinheit (1U = Enzymmenge, die 1µmol Substrat pro min umsetzt)

u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
ÜN - Kultur	über Nacht - Kultur
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
W	Watt
(w/v)	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

3. DNA- und Proteinsequenzen

3.1. DNA-Sequenzen

In den nachfolgenden Sequenzen sind bestimmte Sequenzbereiche folgendermaßen markiert:

RBS	Potentielle Ribosomenbindestelle
→	5´- 3´- Richtung des verwendeten Primers
⌐→	Beginn eines offenen Leserahmens
←⌐	Ende eines offenen Leserahmens

rovS-Genregion aus *S. agalactiae* 6313

```
accaacgataattaggatatccatgattaatgtgaacaacaaagctttgttaattttttt     60

catgactatctcctttctgattttctattttgtacttgtattatataatggatttaaagg     120

gtcttttaaattgttgtgaaagtgggaaaaatggaaaaagaattaggaaaaacactaaga     180
                  RBS
agattacgtaaaggaaaaaaagttagtatttcttctttagcagatgagcacctatccaag     240

tcacaaatctcaaggtttgagagaggagagtcagaaattacttgtagtcgtttgcttaat     300
```

```
attttagacaaactcaacatcactattgatgaatttgtgtcgattcattctaaggcgcac     360

actcatttttttatccttttaaatcgagtaagaaaatattgtgctgaaaaaaatgtaact     420

aaattagtggctctcttagaggatcataaccataaagactatgaaaagattatgattaag     480

gctcttatttttttcaattgatcaatcaatagagcctaatcaagaagaattagcacgctta     540

acagactatctttttacggtggagcagtggggatattatgaaattattctcttaggaaat     600

tgctcacgtctcattaattacaatactttatttttattgaccaaagaaatggttaattcg     660

tttgcttattcagaacaaaataaaaccaataaaatcctagttacacaattagcaattaat     720

tgtctaatcatcagcattgatcactcttactttgagcatagccactacttaattgataag     780

gttagatcattgttacaggatgaagttaatttctatgaaaaaactgttttcttatatgta     840

actggatactatcatttaaaacttggtgatacttcttcaggaaaagaagatatgaggaaa     900

gctttacagattttaaatatttaggtgaagattcattttacaatacttataatgaacat     960

tattgtcaaaaagtacttggcaataataaagaatgctaatgagtgcaagtttatgagtaa    1020

tttttaaagctttgtctcaaaatgataataagaaaggaaaatagaaatcgaatggtcag    1080

gtgacatcaagaacgtttggaaattattgctctaagcaatgactattgattttagacta    1140

tatatttat                                                       1149
```

hsh-Genregion aus *S. agalactiae* Nem316

```
ggtttatatctgtataaaaatgatgtatctacgtgcttaacggtatcattatttttgtgt     60

ttaactaagatagatttctaatcacttaattttactgttatgtttttaaaccaaaacaaa     120

atataaaaaatatttatatatggaggaaacatgtcccaaaagactttggcaagcagtta     180
                      RBS
acagttgtagatactaagagtagagtcaagatgcataaatcaggaaaaaactgggtaaga     240

acagtaatgtcgcattttaatctatttaaagcgattaaagggagagcaactgttgaagca     300

gatgtgtgtattcaagatgttgaaaaagaagaccgactatcttcaggaaatttgacctat     360

ctcaaaggaatactagctgccggagctctggtaggtggagcgagtttaaccagtcgtgtt     420
```

tatgcagatgagactccagttgttcaagaacaatcaagttctgtaccaacactggcagaa 480

caaacggaagtgactgttaaaacaactactgttcaaaatcatcaagatgggacagtatcg 540

aaaaacattattgattctaatagtgtatctatgtcagagtcagcctcaacaagtactagt 600

gaatctgtaagtatgtctatgtcagggtcaactttaacaagtgtaagtgaatctgtaagt 660

acatctgctttaacaagtgcttcagaatcgataagcacgtcagcctcagaaagtgtttca 720

aaatctacaagtattagtgaggtttcaaatattcttgaaactcaagcttctttaactgat 780

aaaggaagagagtcgttttcggcaaaccagatagtaacagaaagtagcttagttactgat 840

gctggtaaaaatgcttcagtatctagcctaattgaaattacaaaaccaaaatcggagtta 900

cagacttccaaaatgtcaaatgagtcgcttataactccagagaaatcccaagtaatgatt 960

gcaagcgataaaactgggaatgagagtctaactccgacaattagattaaaatcagttatt 1020

cagccaaggagtatgaacttgatgactttgagttcggagatggacttgataccactagaa 1080

gaagtgtctgatactgaaatgttaggtaaagatgtatcaagcgagttgcagaaagttaat 1140

attgcgttaaaagataacactcttagtgagcctggaacagttaaattagatagttcagaa 1200

aaccttgttttgaactttgccttttcaatcgcttctgttaacgagggagatgtctttact 1260

gtaaagctttctgataaccttgacacacaagggattggtactattctaaaagttcaagat 1320

ataatggatgaaacggggcagttattagcgactgggtcatatagtcctttaacacataat 1380

attacatacacctggacaaggtatgcttctacgttgaataatattaaagctagagtcaat 1440

atgccagtttggcctgaccagagaataatttctaaaacaacttcagataagcagtgcttt 1500

actgcaacattgaacaatcaagttgcttcaattgaggaacgtgttcagtataatagtcct 1560

tcagtgacagaacatactaatgttaagacaaatgtaagatctcggatcatgaagcttgat 1620

gatgaaagacagacagaaacttatattactcaaattaatcctgaaggtaaggaaatgtat 1680

ttcgcatcaggacttgggaatctatatactattatcggttcagatggaacatcaggttca 1740

ccagttaatttattaaatgcggaagtaaagattctaaaaactaattcaaaaaatcttaca 1800

gatagtatggatcaaaattatgattcgcctgagtttgaagatgtgacttcccagtatagt 1860

tatactaacgatggttctaaaattaccatagattggaaaacaaattctatttcttccact 1920

acatcttatgttgttttggtcaaaatacctaaacaaagtggtgtattgtattcaactgtt 1980

tctgatataaatcaaacatatggttctaaatattcttatgggcatacgaatataagtggt 2040

gactcagatgcgaatgccgaaattaaacttttatcagaaagtgcttctacgagtgcgtcg 2100

acgtcagcaagtaccagcgcttccatgagtgcctcgacatcagcaagtaccagcgcttcc 2160

atgagtgcctcgacatcagcaagtaccagcgcttccatgagtgcgtcgacgtcagccagc 2220

accagcgcttcaaccagcacctcaacgagtgcctcgacatcagccagcacaagtgcttca 2280

acaagtgcaagtatgagtgcttcaacaagtgcaagtacgagtgcatccacgtcagcaagt 2340

actagcgcttccacaagtgccagcaccagcgcctcaacgagtgcctcaacgtcagccagc 2400

actagcgcctcaacgtcagccagcaccagcgcctcaaccagtgcttcaaccagtgcttcc 2460

acatcagccagcactagcgcctcaatgagtgcgtcgatgtcagccagcacaagtgcttca 2520

atgagtgcctcgacgtcagccagcactagcgcctcaaccagtgcttcaaccagtgcttca 2580

accagtgcttccacctcagcaagtatgagcgcctcaacaagtgcaagtactagcgcttca 2640

acaagtgcaagtatgagcgcctcaaccagtgcaagtactagtgcttcaacaagtgccagt 2700

accagtgcctcgacgtcaacaagtactagcgcttccacgtcagcaagtaccagtgcatcc 2760

acatcagcaagtatgagcgcatccacgtcagccagcaccagcccctcaaccagtgcttca 2820

accagtgcttcaaccagtgcttcaaccagtgcttccacatcagccagcactagcgcctca 2880

atgagtgcatccacgtcagcaagtactagcgcctcaatgtcagccagtactagcgcctca 2940

accagtgccagtaccagtgcttccacctcagcaagtatgagcgcctcaacaagtgcaagt 3000

actagcgcttccacaagtgcaagtatgagcgcctcaaccagtgcaagtactagtgcttca 3060

accagtgccagtaccagtgcctcgacgtcaacaagtactagcgcttccacgtcagcaagt 3120

accagtgcatccacatcagcaagtatgagcgcatccacgtcagcaagtaccagtgcatcc 3180

acgtcagcaagtatgagcgcctccacaagtgcaagtatcagtgcatccacgtcagcaagt 3240

atgagcgcttccacaagtgcaagtaccagtgcatcgacgtcagccagtactagcgcctca 3300

atgagtgcatcgacgtcagccagcaccagtgcttccacaagtgcaagtactagcgcctca 3360

atgagtgcatcgacatcagcaagtaccagcgcttccacaagtgcaagtacgagtgcttcc 3420

acatcagcaagtactagcgcctcaacatcggcaagtacaagttcttccacaagtgcaagt 3480

accagtgcatcgacatcagccagcactagcgcctcaatgagtgcctcgacgtcagccagc 3540

acaagtgcttccatgagtgcgtcgacgtcagccagcactagcgcctcaacgagtgcgtca 3600

atgtcagccagcacaagttcttcaacaagtgcctcgatgtcagccagcactagcgcttca 3660

atgagtgcctcgacgtcagctagcactagcgcctcaacgagtgcgtcaatgtcagccagc 3720

acaagttcttcaacaagtgcctcgatgtcagccagcactagcgcttcaatgagtgcgtcg 3780

acgtcagccagcaccagcgcttcaacgagtgcgtcaatgtcagccagcactagcgcttca 3840

atgagtgccacgacgtcagccagcaccagcgtctcaacgagtgcatcgacatcagcaagt 3900

accagcgcttccacaagttcttcaagctcagtgacttctaattcatcaaaagagaaggtg 3960

tattctgccttaccttctacgggtgaccaagattattctgtaactgctactgccttaggt 4020

ttaggtttaatgactggtgcaacccttttgggacgaaaaaaatctaaaaaagataaagac 4080

taaacctactttgaattcttaaagtactaaatgacatggtaaaaggcatatctcttaata 4140

tttttagagagatatgccttttttgttgtagaagtttgtaaaaagccttgtaaatctatat 4200

ttatcaagtgacaagcaatgtttttctgctaaa 4233

3.2. Proteinsequenzen

In den nachfolgenden Sequenzen sind bestimmte Sequenzbereiche folgendermaßen markiert:

(N)	**LPXTG Zellwandanker-Motiv**	(N)	**Signalpeptid-Sequenz**
↓	**Cleavage-Site**	(N)	**Helix-turn-Helix-Motiv**
N	**Transmembran-Domäne**		

Abgeleitete RovS-Proteinsequenz aus pAT*rovS*

MEKELGK**TLRRLRKGKKVSISSLADEHLSKSQISRFERGESEITCSRLLNILDKLNITIDEFV**S
IHSKAHTHFFILLNRVRKYCAEKNVTKLVALLEDHNHKDYEKIMIKALIFSIDQSIEPNQEELA
RLTDYLFTVEQWGYYEIILLGNCSRLINYNTLFLLTKEMVNSFAYSEQNKTNKILVTQLAINCL
IISIDHSYFEHSHYLIDKVRSLLQDEVNFYEKTVFLYVTGYYHLKLGDTSSGKEDMRKALQIFK
YLGEDSFYNTYNEHYCQKVLGNNKEC

Abgeleitete Hsh-Proteinsequenz aus pAT*hsh*

MSQKTFGKQLTVVDTKSRVKMHKSGKNWVRTVMSHFNLFKAIKGRATVEADVCIQDVEKEDRLS
SGNLTYLKGILAAGALVGGASLTSRVYAD↓ETPVVQEQSSSVPTLAEQTEVTVKTTTVQNHQDGT
VSKNIIDSNSVSMSESASTSTSESVSMSMSGSTLTSVSESVSTSALTSASESISTSASESVSKS
TSISEVSNILETQASLTDKGRESFSANQIVTESSLVTDAGKNASVSSLIEITKPKSELQTSKMS
NESLITPEKSQVMIASDKTGNESLTPTIRLKSVIQPRSMNLMTLSSEMDLIPLEEVSDTEMLGK
DVSSELQKVNIALKDNTLSEPGTVKLDSSENLVLNFAFSIASVNEGDVFTVKLSDNLDTQGIGT
ILKVQDIMDETGQLLATGSYSPLTHNITYTWTRYASTLNNIKARVNMPVWPDQRIISKTTSDKQ
CFTATLNNQVASIEERVQYNSPSVTEHTNVKTNVRSRIMKLDDERQTETYITQINPEGKEMYFA
SGLGNLYTIIGSDGTSGSPVNLLNAEVKILKTNSKNLTDSMDQNYDSPEFEDVTSQYSYTNDGS
KITIDWKTNSISSTTSYVVLVKIPKQSGVLYSTVSDINQTYGSKYSYGHTNISGDSDANAEIKL
LSESASTSASTSASTSASMSASTSASTSASMSASTSASTSASMSASTSASTSASTSTSTSASTS
ASTSASTSASMSASTSASTSASTSASTSASTSASTSASTSASTSASTSASTSASTSASTSASTS
ASTSASTSASMSASMSASTSASMSASTSASTSASTSASTSASTSASTSASMSASTSASTSASTS
ASMSASTSASTSASTSASTSASTSTSTSASTSASTSASTSASMSASTSASTSPSTSASTSASTS
ASTSASTSASTSASMSASTSASTSASMSASTSASTSASTSASTSASMSASTSASTSASTSASMS
ASTSASTSASTSASTSASTSTSTSASTSASTSASTSASMSASTSASTSASTSASMSASTSASIS
ASTSASMSASTSASTSASTSASTSASMSASTSASTSASTSASTSASMSASTSASTSASTSASTS
ASTSASTSASTSASTSSSTSASTSASTSASTSASMSASTSASTSASMSASTSASTSASTSASMS
ASTSSSTSASMSASTSASMSASTSASTSASTSASMSASTSSSTSASMSASTSASMSASTSASTS
ASTSASMSASTSASMSATTSASTSVSTSASTSASTSASTSSSSSVTSNSSKEKVYSA**LPSTG**DQ
DYSVTAT**ALGLGLMT**GATLLGRKKSKKDKD

Abgeleitete Hsh-Fusionsproteinsequenzen aus den pET28*hsh*-Derivaten

Proteinsequenz Hsh-N

MVGKQLTVVDTKSRVKMHKSGKNWVRTVMSHFNLFKAIKGRATVEADVCIQDVEKEDRLSSGNL
TYLKGILAAGALVGGASLTSRVYADETPVVQEQSSSVPTLAEQTEVTVKTTTVQNHQDGTVSKN
IIDSNSVSMSESASTSTSESVSMSMSGSTLTSVSESVSTSALTSASESISTSASESVSKSTSIS
EVSNILETQASLTDKGRESFSANQIVTESSLVTDAGKNASVSSLIEITKPKSELQTSKMSNESL
ITPEKSQVMIASDKTGNESLTPTIRLKSVIQPRSMNLMTLSSEMDLIPLEEVSDTEMLGKDVSS
ELQKVNIALKDNTLSEPGTVKLDSSENLVLNFAFSIASVNEGDVFTVKLSDNLDTQGIGTILKV
QDIMDETGQLLATGSYSPLTHNITYTWTRYASTLNNIKARVNMPVWPDQRIISKTTSDKQCFTA
TLNNQVASIEERVQYNSPSVTEHTNVKTNVRSRIMKLDDERQTETYITQINPEGKEMYFASGLG
NLYTIIGSDGTSGSPVNLLNAEVKILKTNSKNLTDSMDQNYDSPEFEDVTSQYSYTNDGSKITI
DWKTNSISSTTSYVVLVKIPKQSGVLYSTVSDINQTYGSKYSYGHTNISGDSDANAEIKLLSED
PNSSSVDKLAAALEHHHHHH

Proteinsequenz Hsh-N1

MVGKQLTVVDTKSRVKMHKSGKNWVRTVMSHFNLFKAIKGRATVEADVCIQDVEKEDRLSSGNL
TYLKGILAAGALVGGASLTSRVYADETPVVQEQSSSVPTLAEQTEVTVKTTTVQNHQDGTVSKN
IIDSNSVSMSESASTSTSESVSMSMSGSTLTSVSESVSTSALTSASESISTSASESVSKSTSIS
EVSNILETQASLTDKGRESFSANQIVTESSLVTDAGKNASVSSLIEITKPKSELQTSKMSNESL
ITPEKSQVMIASDKTGNESLTPTIRLKSVIQPRSMNLMTLSSEMDLIPLEEVSDTEMLGKDVSS
ELQLEHHHHH

Proteinsequenz Hsh-N2

MDETGQLLATGSYSPLTHNITYTWTRYASTLNNIKARVNMPVWPDQRIISKTTSDKQCFTATLN
NQVASIEERVQYNSPSVTEHTNVKTNVRSRIMKLDDERQTETYITQINPEGKEMYFASGLGNLY
TIIGSDGTSGSPVNLLNAEVKILKTNSKNLTDSMDQNYDSPEFEDVTSQYSYTNDGSKITIDWK
TNSISSTTSYVVLVKIPKQSGVLYSTVSDINQTYGSKYSYGHTNISGDSDANAEIKLLSLEHHH
HHH

Proteinsequenz Hsh-N2-N

MDETGQLLATGSYSPLTHNITYTWTRYASTLNNIKARVNMPVWPDQRIISKTTSDKQCFTATLN
NQVASIEERVQYNSPSVTEHTNVKTNVRSRLEHHHHHH

Proteinsequenz Hsh-N2-C

MKLDDERQTETYITQINPEGKEMYFASGLGNLYTIIGSDGTSGSPVNLLNAEVKILKTNSKNLT
DSMDQNYDSPEFEDVTSQYSYTNDGSKITIDWKTNSISSTTSYVVLVKIPKQSGVLYSTVSDIN
QTYGSKYSYGHTNISGDSDANAEIKLLSEDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH

Publikationsliste & wissenschaftliche Beiträge

Publikationsliste

Samen U, Gottschalk B, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ.

Relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*. J. Bacteriol. 186(5), 1398-408. 2004

Samen U, Schubert A., Eikmanns BJ, Reinscheid DJ.

The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human host proteins and the bacterial adhesion to human cells. (In Vorbereitung)

Wissenschaftliche Beiträge auf nationalen Tagungen

Kurz- und Hauptvorträge

Samen U, Schubert A, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ.

Einfluß des Regulators RovS auf Virulenzmechanismen von *Streptococcus agalactiae*.

Tagung der Fachgruppe „Mikrobielle Pathogenität“, Bad Urach 2004

Posterpräsentationen

Samen U, Gottschalk B, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ.

The peptide uptake systems in *Streptococcus agalactiae* differ from other streptococcal species and are involved in the regulation of virulence factors.

Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Dresden 2003

Samen U, Gottschalk B, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ.

Significance of peptide permeases for the physiology and the virulence of *Streptococcus agalactiae*.

Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Berlin 2003

Samen U, Gottschalk B, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ

The relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*.

Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Braunschweig 2004

Samen U, Schubert A, Reinscheid DJ, Eikmanns BJ.

The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human host proteins and the bacterial adhesion to human cells.

25th Symposium on mechanisms of gene regulation, Blaubeuren 2005

Samen U, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ.

The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human host proteins and the bacterial adhesion to human cells.

Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) & Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Göttingen 2005

Lebenslauf



PERSÖNLICHE DATEN

Name	Ulrike Maria Samen
Geburtsdatum	07. April 1979
Geburtsort	Augsburg
Familienstand	ledig, keine Kinder
Anschrift	Hammerstrasse 20
	89077 Ulm

HOCHSCHULSTUDIUM & SCHULAUSBILDUNG

12/2005	Voraussichtliches Ende des Promotionsverfahrens.
06/2003 bis 12/2005	**Arbeiten zur vorliegenden Dissertation:** Abt. Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm, Unter Anleitung von Prof. Dr. Dieter J. Reinscheid. “Charakterisierung des Regulators RovS und Identifizierung potentieller Virulenzfaktoren aus *Streptococcus agalactiae*.“
05/2003	Abschluß mit Diplom.
06/2002 bis 04/2003	**Experimentelle Diplomarbeit:** Abt. Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm, Unter Anleitung von Prof. Dr. Dieter J. Reinscheid. “Die Bedeutung von Peptidpermeasen für die Physiologie und Virulenz von *Streptococcus agalactiae*.“
10/2000 bis 06/2002	**Hauptstudium Biologie** an der Universität Ulm. Hauptfach: Mikrobiologie. Nebenfächer: Genetik, Pflanzenphysiologie und Informatik.
10/1998 bis 09/2000	**Grundstudium Biologie** an der Universität Ulm. Abschluß mit Vordiplom.

09/1989 bis 05/1998	Besuch des Maria-Theresia-Gymnasiums, 86160 Augsburg. Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife.
09/1985 bis 07/1989	Besuch der Grundschule, 86459 Gessertshausen.

BERUFSERFAHRUNG

03/2004 bis 12/2005	Wissenschaftliche Angestelle: Abt. Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm.

STUDIUMBEZOGENE TÄTIGKEITEN

03/2004 bis 06/2004	Betreuung der Ausstellung “Faszination Biotechnologie“, IHK Ulm.
05/2002 bis 07/2002	Wissenschaftliche Hilfskraft, Abt. Molekulare Botanik, Universität Ulm.
08/2001 bis 09/2001	Forschungspraktium, Abt. Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm.
05/2001 bis 07/2001	Wissenschaftliche Hilfskraft, Abt. Molekulare Botanik, Universität Ulm.
10/2000 bis 12/2000	Forschungspraktikum, Abt. Molekulare Botanik, Universität Ulm.
07/2000 bis 11/2002	Studentisches Mitglied des Prüfungsausschusses Biologie.
04/1999 bis 02/2002	Mitglied der Fachschaft Biologie.

Danksagungen

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Dieter. J. Reinscheid für die interessante Themenstellung und die Unterstützung während meiner Arbeit bedanken. Trotz einigen hundert Kilometern zwischen Rheinbach und Ulm, konnte ich mich stets auf eine sehr gute Betreuung stützen. Auch in wissenschaftlichen Krisen gab es immer aufbauende und hilfreiche Worte aus der Ferne.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns bedanken, der mir die Arbeit in dem ihm unterstehenden Bereich der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie ermöglichte und als Vorortbetreuer immer ein offenes Ohr für wissenschaftliche Fragen hatte. Zudem möchte ich mich hier auch für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Prof. Dr. Peter Dürre möchte ich für die Anregungen und guten Ideen zu meiner Arbeit danken.

Ein besonderer Dank geht an meine ehemaligen Laborkollegen Heike Gutekunst und Axel Schubert, die mir schon während meiner Diplomarbeit eine große Unterstützung waren. Bedanken möchte ich mich auch bei Beate Schaller, Philipp Heinz, Anke Lübeck, Annette Arndt, Gerd Seibold, Anja Eichner, Niklas Nold und Frédéric Borges, für die tolle Laborstimmung, die netten Kaffee- und Mittagspausen und die vielen gemeinsamen Abenden ausserhalb der Uni. Ein ganz spezieller Dank geht an Annette Cramer, mit der ich viele Tage im Isotopenlabor verbracht habe. Auch wenn wir nicht immer erfolgreich waren, hat mir die Zusammenarbeit viel Spaß gemacht. Ein ganz grosses Dankeschön geht an Stephanie Würfl, die mir die beste Freundin ist, die ich mir nur wünschen kann. Vielen Dank auch an Julia Würfl für die gemeinsamen Kaffeepausen und vielen sportlichen Stunden im “P15“.

Auch möchte ich mich bei allen weiteren Mitgliedern der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie für die gute Stimmung und die gemeinsamen Unternehmungen bedanken. Ganz besonders bei Brigitte Ehrler, der guten Seele der Abteilung, die für nicht wissenschaftliche Probleme immer ein offenes Ohr hatte.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Mutter, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und mir mein Studium und diese Doktorarbeit erst ermöglicht hat. Natürlich danke ich auch meinem Opa und dem lieben Peter, die immer mit großem Interesse meine Arbeit verfolgt haben.

Zuletzt gilt mein größter Dank meinem Freund Markus, der mir stets zu Seite stand und mich durch alle Gemütslagen, inklusive Computer- und Druckerprobleme, begleitet hat.

Unterstützung universitärer und nicht-universitärer Einrichtungen

Universität Ulm, Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Hygiene unter Leitung von Prof. Dr. R. Marre:
Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der sterilen Zellkultur, Nutzung des Cytoflour, Nutzung des Fluoreszenzmikroskops

Universität Ulm, Abteilung Virologie unter Leitung von Prof. Dr. T. Mertens:
Nutzung des Lightcycler

Universität Ulm, Sektion Elektronenmikroskopie unter Leitung von Prof. Dr. P. Walther:
Nutzung des Fluoreszenzmikroskops

Laboratory of Genomics of Microbial Pathogens, Institut Pasteur, Paris; Dr. P. Glaser und Dr. M. Zouine:
Durchführung der DNA-Chip-Experimente

Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich; Dr. Steffen Schaffer
Durchführung des MALDI-TOF-Analysen

Firma Intercell, Wien, Österreich; Andreas Meinke
Durchführung von FACS-Analysen