

ulm university universität
uulm

Charakterisierung von Virulenzregulatoren und Virulenzfaktoren aus *Streptococcus agalactiae*

Dissertation

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

vorgelegt von

Beate Doris Schaller

aus Bobingen

Ulm, 2007

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns angefertigt.

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus- Dieter Spindler

Erstgutachter: Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Dürre

Drittgutachter: Prof. Dr. Dieter J. Reinscheid

Tag der Promotion:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie die wörtlich und inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Dabei habe ich die Satzung der Universität Ulm zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung beachtet.

Ulm, im Dezember 2007

Beate Schaller

Der Sinn des Reisens besteht darin,

die Vorstellungen mit der Wirklichkeit auszugleichen,

und anstatt zu denken,

wie die Dinge sein könnten,

sie so zu sehen, wie sie sind.

(Samuel Johnson, engl. Schriftsteller)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung **1**

II. Material und Methoden **9**

1. Kits, Enzyme, Oligonukleotide und Antikörper **9**

1.1. Kits **9**

1.2. Enzyme **9**

1.3. Oligonukleotide **10**

1.4. Antikörper **14**

2. Plasmide **14**

3. Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien **16**

4. Stammhaltung, Kultivierungsbedingungen und Nährmedien **18**

4.1. Kultivierung von *E. coli* **18**

4.2. Kultivierung von *S. agalactiae* **19**

4.3. Kultivierung von eukaryotischen Zellen **20**

5. Isolierung von DNA **21**

5.1. Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken **21**

5.2. Isolierung von Plasmid- DNA aus *E. coli* **22**

6. Aufreinigung von DNA **25**

7. Agarosegelelektrophorese **26**

8. Sequenzierung von DNA **27**

9. Arbeiten mit RNA **28**

9.1. Isolierung von RNA aus Streptokokken **28**

9.2. DNase I- Verdau der RNA **29**

9.3. Herstellung von RNA- Agarosegelen **30**

10. Polymerasekettenreaktion (PCR) **31**

10.1. Standard- PCR **31**

10.2. Reverse Transkription **33**

10.3. Quantitative Real-time PCR **33**

11. Southern Blot- Analyse **35**

11.1. Southern Blot- Transfer **35**

11.2. Southern- Hybridisierung **36**

11.3. Detektion der Sonde über Chemilumineszenz **37**

12. Rekombination von DNA **38**

12.1. Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen **38**

12.2. Dephosphorylierung mit CIAP **38**

12.3. Ligation und Dialyse **39**

13. Transformation durch Elektroporation **39**

13.1. Herstellung kompetenter *E. coli*- Zellen **39**

13.2. Herstellung kompetenter *S. agalactiae*- Zellen **40**

13.3. Elektroporation von DNA in *E. coli* **40**

13.4. Elektroporation von DNA in *S. agalactiae* **41**

14. Proteinchemische Arbeiten **41**

14.1. Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli* und deren Aufreinigung **41**

14.1.1. Herstellung von Maltose- binde Protein gekoppelten Fusionsproteinen **41**

14.1.2. Herstellung von HisTag- Fusionsproteinen **42**

14.2. Proteinbestimmung nach Bradford **44**

14.3. Auftrennung von Proteinen über diskontinuierliche SDS- PAGE **45**

14.4. Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen mittels Coomassie- Färbung **47**

15. Western Blot- Analyse **47**

15.1. Semidry Elektroblot **47**

15.2. Western Blot- Analyse **48**

16. Bestimmung von Protein- DNA- Interaktionen mittels EMSA **50**

17. Herstellung definierter Deletionsmutanten in *S. agalactiae* **51**

17.1. Cross- over PCR **51**

17.2. Herstellung definierter Deletionsmutanten **51**

18. Adhärenz und Invasion **53**

18.1 Vorbereitung der eukaryotischen Zellen für Adhärenz- und Invasionsversuche **53**

18.2. Vorbereitung der Bakterienstämme für Adhärenz- und Invasionsversuche **54**

18.3. Adhärenztest **54**

18.4. Invasionstest **55**

18.5. Auswertung **56**

19. Bindung von FITC- markierten Bakterien an immobilisiertes Fibrinogen 56

20. Expressionsanalysen mittels β- Galactosidase- Reportergenfusion 58

21. Immunogoldmarkierung von *S. agalactiae* 59

III. Ergebnisse 61

1. Charakterisierung des putativen Regulators Rgg3 aus *S. agalactiae* 61

1.1. Die *rgg3*- codierende Region in *Streptococcus agalactiae* **61**

1.2. Die Bedeutung von *rgg3* für die Virulenz von *Streptococcus agalactiae* 6313 **62**

1.3. Wachstumsphasen abhängige Expression des *rgg3*- Gens **72**

1.4. Die Bedeutung von Rgg3 für die Expression von *fbsA* **74**

1.5. Die Bedeutung von Rgg3 für die Expression bekannter und putativer Virulenzgene **77**

1.6. Detektion von FbsA auf der Oberfläche von *S. agalactiae* 6313 **80**

1.7. Herstellung eines Rgg3- Fusionsproteins **82**

2. Charakterisierung des putativen Regulators RogB3 aus *S. agalactiae* 84

2.1. Die *rogB3*- codierende Region in *Streptococcus agalactiae* **84**

2.2. Die Bedeutung von *rogB3* für die Virulenz von *Streptococcus agalactiae* 6313 **85**

3. Funktionelle Charakterisierung des RogB2- Proteins 91

3.1. Herstellung eines RogB2- Fusionsproteins **91**

3.2. Untersuchung der DNA- Binderegion von RogB2 mittels EMSA **93**

4. Bedeutung des *fbsB4*- Gens für die Virulenz von *Streptococcus agalactiae* Gi7 97

IV. Diskussion 103

V. Zusammenfassung 118

VI. Summary 120

VII. Literaturverzeichnis 122

VIII. Anhang 145

I. Einleitung

Streptokokken zählen zusammen mit den Laktokokken zu der Familie der *Streptococcaceae* (Garrity et al, 2001; Madigan, Martinko & Parker, 2001; NCBI Taxonomy Browser). Dabei gehören zu der Gattung *Streptococcus* kokkoide Gram- positive, nicht- bewegliche, nicht-sporulierende Bakterien, welche unterschiedliche Habitate besiedeln (Salyers & Whitt, 2002; Madigan, Martinko & Parker, 2001). Die Energiekonservierung der Streptokokken erfolgt anaerob über die homofermentative Milchsäuregärung (Kayser et al, 1998; Madigan, Martinko & Parker, 2001; Schlegel, 2006), allerdings ist das Wachstum in Anwesenheit von Sauerstoff möglich, so dass Streptokokken als aerotolerant eingeordnet werden. Da Streptokokken keine vollständige Atmungskette besitzen wurde bisher davon ausgegangen, dass sie nicht in der Lage sind Sauerstoff zu nutzen (Glaser et al, 2002; Tettelin et al, 2002). Neueste Studien zeigen jedoch, dass *S. agalactiae* in Anwesenheit von exogenem Häm und Menachinon eine funktionsfähige Atmungskette ausbildet, die den Bakterien ein Sauerstoff basiertes Wachstum ermöglicht (Yamamoto et al, 2006). Die hohen Nährstoffansprüche der Streptokokken erfordern eine Kultivierung auf Komplexmedium.

Die Klassifikation der Streptokokken erfolgt auf Grund ihres Hämolyseverhaltens bei Wachstum auf Blut- Agarplatten. Dabei werden innerhalb der Streptokokken drei Hämolyseformen unterschieden: Die α-Hämolyse, bei der eine unvollständige Lyse der Erythrozyten und eine Oxidation des im Hämoglobin enthaltenen Eisens zu einem grünen Hämolysehof führt, die β-Hämolyse oder vollständige Hämolyse und die γ-Hämolyse oder nicht- vorhandene Hämolyse (Brown, 1919 und 1939; Baron et al, 1996; Salyers & Whitt, 2002). *Streptococcus agalactiae* zeigt β-Hämolyse aufgrund der Aktivität des porenbildenden β-Hämolysins (Marchlewicz et al, 1980 und 1981; Tapsall et al, 1991; Nizet et al, 1996; Gibson et al, 1999).

Innerhalb der β-hämolysierenden Streptokokken etablierte Rebecca Lancefield eine weitere Möglichkeit der Differenzierung aufgrund von Polysaccharid- Antigenen in der Zellwand (Lancefield, 1933). Auf der Basis der Einteilung nach Lancefield konnten mittlerweile die serologischen Gruppen A-T etabliert werden (Facklan, 2002). *Streptococcus agalactiae* zählt zur serologischen Gruppe B (GBS = Gruppe B Streptokokken), innerhalb welcher eine weitere Unterteilung in die Serotypen Ia, Ib und II - VIII aufgrund von Polysaccharidantigenen in der Kapsel erfolgt (Baron et al, 1996, Kogan et al, 1996, Perch et al, 1979; Wessels, 1997; von

Hunolstein et al, 1999; Shet & Ferrieri, 2004). Weitere serologische Differenzierungsmöglichkeiten ergeben sich durch die Oberflächenproteine Cα, Cβ und Rib (Johnson et al, 1984; Ferrieri et al, 1988; Stalhammar-Carlemalm 1999; Lindahl et al, 2005). Auch Analysen auf DNA- und RNA- Ebene erlauben eine Unterteilung von *S. agalactiae* in unterschiedliche Gruppen (Blumberg et al, 1992; Helmig et al, 1993; Adderson et al, 2000; Tamura et al, 2000).

Streptococcus agalactiae wurde als Erreger der Mastitis im Jahre 1887 von Nocard und Mollereau entdeckt (Jones, 1918). Im Jahre 1938 konnte *S. agalactiae* erstmals als Erreger von Erkrankungen beim Menschen beschrieben und als Ursache des Kindbettfiebers entdeckt werden (Colebrook & Purdie, 1937; Fry, 1938, Rantz, 1942; Severin & Wiley, 1976). Seither gilt *S. agalactiae* als Hauptverursacher von Neugeborenen- Infektionen, in denen er Sepsen, Meningitiden und Pneumonien hervorruft (Rogers 1970; Berggvist et al, 1971; Barton et al, 1973; Franciosi et al, 1973; Hahn, 1991; Kim et al, 1995; Kayser, 1998; Schuchat et al, 1998; Spellerberg 2000; Doran et al, 2003; Doran & Nizet, 2004; Shet & Ferrieri, 2004; Hanley, 2006). Dabei werden die zwei Krankheitsverlaufsformen `Early- onset Disease´ und `Late- onset Disease´ unterschieden. Während die `Early- onset Desease´ innerhalb eines Zeitraumes von sieben Tagen nach der Geburt auftritt und über vertikale Übertragung von der Mutter auf das Kind erfolgt, spricht man bei Infektionen, die innerhalb der ersten 3 Monate auftreten und über horizontale Übertragung durch andere Personen oder die Mutter erfolgen von `Late- onset Disease´ (Doran & Nizet, 2004; Shet & Ferrieri, 2004; Apgar et al, 2005). Zunehmend gewinnt *S. agalactiae* auch Bedeutung bei der Infektion von älteren oder immunsupprimierten Erwachsenen, wie Diabetikern, Krebserkrankten und HIV-Patienten (Verghese et al, 1982; Munoz et al, 1997; Farley et al, 1995 und 2001; Jackson et al, 1995; Guerin et al, 2000; Civljak et al, 2001; Nolla et al, 2003; Edwards et al, 2005; Edwards & Baker, 2005; Huang et al, 2006; Holyoak et al, 2007). Die verursachten Krankheitsbilder bei Erwachsenen umfassen Meningitiden, Pneumonien, Endokarditiden, Arthriden und Wundinfektionen. Während die Sterberate bei Neugeborenen bei ca. 10- 15 % liegt (Baker % Edwards, 1995; Apgar et al, 2005), erliegen 33 % der Erwachsenen aufgrund einer geschwächten Immunabwehr einer *S. agalactiae*- Infektion (Jackson et al, 1995; Munoz et al, 1997).

Durch ein breit angelegtes Screening- Verfahren mit Antibiotika- Therapie konnte die Inzidenz für eine *S. agalactiae*- Erkrankung in den USA auf 0,35 Fälle pro 1000 Lebendgeburten gesenkt werden (Centers of Desease Control and Prevention, 2007). In Deutschland treten 0,47 GBS- Erkrankungen bei 1000 Lebendgeburten auf (Fluegge et al, 2006). Die Übertragung erfolgt dabei vor allem vertikal, in dem der Säugling während der Geburt kontaminierte Amnionflüssigkeit verschluckt bzw. durch direkten Kontakt des Säuglings mit den Bakterien bei Durchtritt durch den Geburtskanal (Hickman et al, 1999; Spellerberg, 2000; Doran & Nizet, 2004; Liu et al, 2004; Shet & Ferrieri, 2004; Apgar et al, 2005). Besonders hoch ist das Risiko einer Infektion bei Frühgeburten, Neugeborenen mit geringem Geburtsgewicht und lang andauernden Geburten (Apgar et al, 2005).
In den USA sind ca. 30 % und in Deutschland nach einer neuen Studie 16 % der schwangeren und nicht- schwangeren Frauen mit *Streptococcus agalactiae* besiedelt (Manning et al, 2004; Brimil et al, 2006). Dabei konnte der Serotyp III mit einer Prevalenz von 28 % bestimmt werden, darauf folgend Serotyp II mit 21 %, Serotyp Ia mit 17 % und Serotyp V mit 16 %. In 85 % der von Neugeborenen isolierten *S. agalactiae*- Stämme konnten die Serotypen Ia, III und V isoliert werden (Baker et al, 1974; Dillon et al, 1987).

Obwohl *S. agalactiae* als Hauptursache von Neugeborenen- Infektionen gilt und medizinisch eine immer bedeutendere Rolle spielt, sind dessen Pathogenitätsmechanismen bisher nur unzureichend charakterisiert.
Den ersten Schritt einer Streptokokken- Infektion bildet die Kolonisierung und Adhärenz der Bakterien an humane Zellen. Dabei verfügt *S. agalactiae* über die Fähigkeit an Epithelzellen des gastrointestinalen und des respiratorischen Traktes sowie an die Plazentamembran und das Endothelium der Blut- Hirn- Schranke zu adhärieren (Zewaneh et al, 1979; Broughton et al, 1983; Galask et al, 1984; Jelinkova et al, 1986; Teti et al, 1987; Wibawan et al, 1992; Kallman et al, 1993; Jackson et al, 1994; Tamura et al, 1994; Spellerberg, 2000; Doran & Nizet, 2004; Tenenbaum et al, 2005; Soriani et al, 2006). Die Beteiligung bakterieller Oberflächenstrukturen an der Adhärenz an Wirtsgewebe ist schon vielfach diskutiert worden. So konnte für die Lipoteichonsäuren der bakteriellen Zellwand eine Vermittlung der Adhärenz nachgewiesen werden (Nealon et al, 1984 und 1985; Teti et al, 1987; Goldschmidt et al, 1984; Hasty et al, 1992; Doran et al, 2005). Auch Pili- Strukturen auf der Oberfläche der Bakterien sind bei der Adhärenz an eukaryotische Zellen involviert (Dramsy et al, 2006;

Maisey et al, 2007). In früheren Untersuchungen konnte durch Proteasebehandlung der Bakterien die Adhärenz signifikant reduziert werden, was die Vermutung nahe legte, dass Proteine die Adhärenz vermitteln (Tamura et al, 1994; Miyazaki et al, 1988; Bulgakova et al, 1986). Die Identifizierung von sog. Adhäsinen, welche an Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Fibrinogen, Fibronektin, Keratin, Kollagen, Laminin und Vitronektin binden (Mamo et al, 1987; Spellerberg et al, 2000; Beckman et al, 2002; Tamura et al, 2002, Herbert et al, 2004; Lindahl et al, 2005) spielt eine zentrale Rolle in der Aufklärung der Adhärenz. In *S. agalactiae* ist eine Vielzahl dieser Adhäsine charakterisiert worden. So konnte FbsA als Hauptfibrinogenrezeptor identifiziert und dessen Vermittlung der Adhärenz von *S. agalactiae* an epitheliale Lungenepithelzellen bestimmt werden (Schubert et al, 2002 und 2004; Tenenbaum et al, 2005). Neben der Bedeutung für die Adhärenz führt die FbsA-vermittelte Bindung an Fibrinogen zusätzlich zu einem Schutz der Bakterien vor Opsonophagozytose (Schubert et al, 2004). Des Weiteren konnte für das Laminin- bindende Protein Lmb eine Beteiligung an der Adhärenz an Gehirnendothelzellen gezeigt werden (Spellerberg et al, 1999, Franken et al, 2001, Tenenbaum et al, 2007). Erst kürzlich konnte das Keratin-4- bindende Protein Srr1 und dessen Einfluss auf die Adhärenz der Bakterien an Epithelzellen charakterisiert werden (Samen et al, 2007). Als weiteres Adhäsin konnte BibA beschrieben werden, dessen Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix bisher allerdings nicht nachgewiesen wurde (Santi et al, 2007).

Im Weiteren Verlauf einer *S. agalactiae*- Infektion kommt es zum Eindringen der Bakterien in das Gewebe und die Blutbahn, wobei Zellbarrieren und Membranen überwunden werden müssen. Die Fähigkeit von *S. agalactiae* epitheliale Zellen zu invadieren und in diesen zu überleben wurde schon mehrfach belegt (Rubens et a, 1992; Gibson et al, 1993; Valentin-Weigand et al, 1995 und 1997; Nizet et al, 1997; Winram et al, 1998; Bolduc et al, 2002; Cheng et al, 2002; Tyrell et al, 2002; Adderson et al, 2003; Johri et al, 2003; Gutekunst et al, 2004; Baron et al, 2005; Doran et al, 2005; Tenenbaum et al, 2005 und 2007; Burnham et al, 2007; Maisey et al, 2007). Dabei spielen die Invasion vermittelnde Proteine, sog. Invasine eine bedeutende Rolle. So konnte die C5a- Peptidase als Invasin identifiziert werden (Cheng et al, 2002). Auch das Fibrinogen- bindende Protein FbsB zeigt eine Beteiligung bei der Invasion (Gutekunst et al, 2004). Für den Hauptfibrinogenrezeptor FbsA konnte ebenfalls ein Einfluss auf die Invasion gezeigt werden (Schubert et al, 2004; Tenenbaum et al, 2005). Des Weiteren wird die Rolle des Laminin- bindenden Proteins Lmb bei der Internalisierung der

Bakterien in humane Gehirnendothelzellen diskutiert (Tenenbaum et al, 2007). Auch eine Vermittlung der Invasion durch Pili und Lipoteichonsäuren konnte bereits gezeigt werden (Doran et al, 2003; Maisey et al, 2007). Neben der Invasion in eukaryotische Zellen konnte auch ein parazellulärer Durchtritt von *S. agalactiae* durch die zervikale Epithelzellbarriere nachgewiesen werden (Soriani et al, 2006). Dabei konnte eine Kolokalisation der Bakterien mit den `tight junctions´ der Zellen elektronenmikroskopisch detektiert werden.
Viele der an der Adhärenz und Invasion beteiligten Oberflächenproteine sind Zellwand-assoziiert und besitzen ein Zellwandankermotiv. Für die Verankerung von Proteinen in der Zellwand sind Sortasen zuständig, welche einen wichtigen Virulenzfaktor von *S. agalactiae* darstellen. Dabei sind abhängig von dem jeweiligen Erkennungssignal unterschiedliche Sortasen beschrieben (Dramsi et al, 2005). Während die Sortase A in *S. agalactiae* für die Verankerung von Proteinen mit dem Zellwandankermotiv LPXTG verantwortlich ist (Lalioui et al, 2005), konnte für die Sortase C eine Beteiligung an der Verankerung von Pili auf der Oberfläche gezeigt werden (Dramsi et al, 2006).

Neben den Adhäsinen und Invasinen zählt die Ausbildung einer Kapsel als wichtiger Virulenzfaktor von *S. agalactiae* (Spellerberg, 2000). Dabei spielt der Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes durch Inaktivierung des Komplementsystems eine entscheidende Rolle (Marques et al, 1992). In vielen Fällen bildet Sialinsäure den Abschluss einer Kapsel-Polysaccharidkette und führt zu einer erhöhten Virulenz im Tiermodell und zum Schutz vor Phagozytose (Wessels et al, 1989 und 1992).
Des Weiteren wird die Pathogenität von *S. agalactiae* durch Sekretion verschiedener Proteine und Enzyme bestimmt. Hierzu zählen das Poren- formende Hämolysin CylE, welches auf molekularer Ebene mit Genen der Pigmentsynthese der Bakterien verbunden ist (Nizet et al, 1996; Spellerberg et al, 1999; Pritzlaff et al, 2001). Während CylE an der Induktion der Apoptose von Makrophagen (Ulett et al, 2003) und an der bakteriellen Invasion von Lungenepithelzellen (Doran et al, 2002 und 2003) beteiligt ist, entsteht durch parallele Sekretion von CylE und Ausbildung des Pigments ein Schutz vor Phagozytose (Tapsall et al, 1986; Liu et al, 2004). Auch das sezernierte Protein Hyaluronidase gilt als wichtiger Virulenzfaktor. Dieses Enzym kann die in den Gewebezwischenräumen vorkommende Hyaluronsäure spalten (Pritchard et al, 1994; Baker et al, 1997 und 2000). Vermutlich spielt es so eine Rolle bei der Ausbreitung der Bakterien in das Wirtsgewebe (Spellerberg, 2000;

Doran & Nizet, 2004; Liu & Nizet; 2004). Zum Schutz vor dem Immunsystem und zum Überleben von *S. agalactiae* in Makrophagen trägt das Enzym Superoxiddismutase bei (Poyart et al, 2001). Dabei führt die Bildung der Superoxiddismutase zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativen Stress, wie er im Phagolysosom der Makrophagen zu finden ist (Poyart et al, 2001). Neben den bereits genannten Virulenzfaktoren führt auch der CAMP-Faktor (Podbielski et al, 1994) durch Interaktion mit dem Fc- Teil von Immunglobulinen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Immunsystem (Jürgens et al, 1987). Zusätzlich trägt der CAMP- Faktor durch seine cytotoxische Aktivität zu der Virulenz der Bakterien bei (Skalka & Smola, 1981; Lang & Palmer, 2003).

Streptococcus agalactiae verfügt über die Möglichkeit unterschiedliche Nischen des Wirtes zu kolonisieren und sich an wechselnde Bedingungen seiner Umgebung anzupassen. So verändert sich die Virulenz der Bakterien in Abhängigkeit von z.B. der Anwesenheit von Sauerstoff (Johri et al, 2003). Um diese Adaptation bewerkstelligen zu können, bedarf es eines regulatorischen Netzwerkes, welches eingehende Signale erkennt und auf diese reagiert. In verschiedenen pathogenen Bakterien, wie *Streptococcus pyogenes* oder *Streptococcus pneumoniae* konnten regulatorische Mechanismen identifiziert werden (DiRita und Mekalanos, 1989; DiRita et al, 2000, Gutekunst et al, 2003; Kreikemeyer et al, 2003; Paterson et al, 2006; Ribardo et al, 2006; Samen et al, 2006; Churchward et al, 2007; Matson et al, 2007). Auch in *S. agalactiae* sind bereits mehrere regulatorische Systeme beschrieben worden. So wurde das Zwei- Komponenten- System CovR/CovS in *S. agalactiae* identifiziert (Lamy et al, 2004), welches Einfluss auf die hämolytische Aktivität der Bakterien und deren Adhärenz an Epithelzellen hat (Lamy et al, 2004). Auf Expressionsebene wurde eine große Anzahl an CovR- regulierten Genen ermittelt, welche u. a. Virulenzgene beinhalten. Neben CovR/CovS ist Rgf als ein weiteres Zwei- Komponenten- System charakterisiert worden (Spellerberg et al, 2002). Rgf ist beteiligt an der Regulation der Fibrinogenbindung der Bakterien und beeinflusst die Expression der C5a- Peptidase (Spellerberg et al, 2002). Die Rolle von sog. `stand- alone´ Regulatoren in *S. agalactiae* ist schon mehrfach diskutiert worden. So wurde in Anlehnung an den `Multiple sugar metabolism regulator (MsmR)´ aus *Streptococcus mutans* der Regulator MsmR in *S. agalactiae* charakterisiert (Heinz, Diplomarbeit 2006), welcher Einfluss auf die Adhärenz der Bakterien an HEp2-Rachenepithelzellen und auf die Expression der Gene für den Kapselregulator CpsA und der

Pilistrukturen hat. In verschiedenen Gram- positiven Bakterien spielen Regulatoren der Rgg-Familie eine zentrale Bedeutung (Sulavic et al, 1992; Chaussee et al, 1999 und 2001-2002; Neely et al, 2003; Kreikemeyer et al, 2003), indem sie die Expression von Virulenzgenen kontrollieren und somit Einfluss auf die Pathogenität der Bakterien nehmen. In *S. agalactiae* konnte der Regulator RovS als Mitglied der Rgg- Familie charakterisiert werden (Samen et al, 2006). Hierbei zeigt RovS Einfluss auf die Adhärenz der Bakterien an humane Epithelzellen und kontrolliert auf transkriptioneller Ebene die Gene *fbsA*, *sodA*, und *cylE*. Neben den Rgg-Proteinen spielt die Familie der RofA- ähnlichen Regulatoren (RALP) ebenfalls eine große Rolle in pathogenen Erregern. So konnte für die beiden RALP- Regulatoren Nra und RofA aus *Streptococcus pyogenes* eine Beteiligung bei der Wirt- Pathogen- Wechselwirkung und bei der Expression der Virulenzgene *prtF*, *speB*, *sag* und *mga* nachgewiesen werden (Fogg et al, 1994, Fogg & Chaperon 1997; Podbielski et al, 1999; Beckert et al, 2001; Molinari et al; 2001). In *S. agalactiae* hat Heike Gutekunst (2003) die Bedeutung des RofA- ähnlichen Regulators RogB analysiert. Dabei wurde RogB als positiver Regulator der Adhärenz und der Fibrinogenbindung identifiziert.

Wie aus den hier dargestellten Studien zu entnehmen ist, tragen verschiedene regulatorische Mechanismen zur Pathogenität von *S. agalactiae* bei, wobei deren Zusammenspiel in einem regulatorischen Netzwerk bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Ziel der folgenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des Rgg- ähnlichen Regulators Rgg3 hinsichtlich seines Einflusses auf die Virulenz von *Streptococcus agalactiae*. Hierzu wurde zunächst das *rgg3*- Gen im *S. agalactiae*- Stamm 6313 deletiert und durch Einbringen eines Plasmid codierten *rgg3*- Gens eine Komplementationsmutante hergestellt. Anschließend wurden diese Stämme auf ihr Adhärenz- und Invasionsverhalten gegenüber eukaryotischen Epithelzellen und ihre Fibrinogen- Bindungsfähigkeit untersucht. Des Weiteren wurden Expressionsanalysen mittels quantitativer Real- time PCR durchgeführt und die Exposition des Oberflächenproteins FbsA mit spezifischen Antikörpern mittels Immunogold- Markierung auf den jeweiligen Stämmen elektronenmikroskopisch nachgewiesen.

Ebenfalls war der Einfluss von RogB3, einem RofA- ähnlichen Regulator, auf die Virulenz von *S. agalactiae* von Interesse. Hierzu wurde zunächst das *rogB3*- Gen deletiert und diese

Deletion durch Einbringen eines Plasmid codierten *rogB3*- Gens komplementiert. Mit diesen Stämmen wurde der Einfluss von RogB3 auf die Adhärenz an eukaryotische Lungenepithelzellen und die Fibrinogen- Bindung der Bakterien analysiert. Zusätzlich wurde der Einfluss von RogB3 auf die Expression des *fbsA*- Gens mittels quantitativer Real- time PCR untersucht.

Von einem weiteren Vertreter der RALP- Familie, RogB2, war zu Beginn dieser Arbeit bereits ein Einfluss auf die Virulenz postuliert worden (Eichner, 2005; Samen, 2005). Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis der direkten Interaktion des RogB2- Proteins mit DNA- Bereichen regulierter Gene und die Charakterisierung des Mechanismus der Einflussnahme auf die Expression von Virulenzgenen.

Neben regulatorischen Fragestellungen sind Oberflächenproteine wie z. B. das FbsB- Protein, welches an der Invasion und Adhäsion der Bakterien an eukaryotische Zellen beteiligt ist (Gutekunst et al, 2004; Schaller 2005) von großer Bedeutung für die Virulenz von *S. agalactiae*. FbsB konnte bisher in vier verschiedenen Varianten in unterschiedlichen *S. agalactiae*- Stämmen nachgewiesen werden. Die einzelnen Varianten unterschieden sich in Größe und Länge des N-terminalen Endes des Proteins. Zwei der vier Varianten sind bisher bezüglich ihres Einflusses auf die Virulenz von *S. agalactiae* beschrieben worden. Die funktionelle Charakterisierung einer weiteren Variante, das FbsB4- Protein aus *S. agalactiae* Gi7, war daher von großem Interesse. Hierfür wurde das *fbsB4*- Gen in *S. agalactiae* Gi7 deletiert und durch Einbringen eines Plasmid codierten *fbsB4*- Gens komplementiert. Anschließend erfolgten mit den konstruierten Stämmen Untersuchungen bezüglich des Einflusses auf die Adhärenz und Invasion an bzw. in eukaryotische Lungenepithelzellen sowie die Analyse der Fibrinogenbindung.

Zusammenfassend war das Ziel dieser Arbeit Virulenzfaktoren sowie die Mechanismen der Virulenzregulation in *S. agalactiae* näher zu charakterisieren und somit einen Beitrag zum näheren Verständnis der Pathogenität der Bakterien zu leisten.

II. Material und Methoden

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien, Geräte und Materialien sind dem Anhang zu entnehmen.

1. Kits, Enzyme, Oligonukleotide und Antikörper

1.1. Kits

GfX^{TM}Micro Plasmid Prep Kit	GE Healthcare; München
RNeasy Mini- Preparation Kit	Qiagen; Hilden
RevertAid^{TM} H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
LightCycler DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
NucleoSpin^{TM} Extract	Machery und Nagel GmbH, Düren
ECL- Kit	GE Healthcare, München

1.2. Enzyme

Die in der Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind im Folgenden dargestellt:

*Bam*HI	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
*Kpn*I	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
*Pst*I	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
*Hin*dIII	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot

Zusätzlich wurden die in folgender Tabelle dargestellten Enzyme eingesetzt:

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
DNase I (RNase- frei)	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
DNase I (RNase- frei)	Roche Diagnostics; Mannheim
DNase I (RNase- frei, `on column digestion´)	Qiagen; Hilden
Lysozym	Roche Diagnostics; Mannheim

Mutanolysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Proteinase K	Roche Diagnostics; Mannheim
RNase A (DNase-frei)	Roche Diagnostics; Mannheim
T4- DNA- Ligase (1U/µl)	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Taq- DNA- Polymerase	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Taq- DNA- Polymerase	Invitrogen; Karlsruhe

1.3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für PCR, Sequenzierungen, Klonierungen und quantitative Real-time PCR wurden von der Firma MWG Biotech GmbH, Martinsried und Biomers.net GmbH, Ulm bezogen. Oligonukleotide wurden mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,6) auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt und bei –20 °C gelagert. Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid- Primer aufgelistet. Unterstrichene Sequenzen bezeichnen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, kursiv geschriebene Basen bezeichnen überlappende Sequenzen, die für eine Cross- over PCR benötigt wurden.

Oligonukleotid- Primer zur Herstellung definierter *rgg3*- Deletionsmutanten

rgg3_del1 (*Bam*HI): 5‘- CCGCGGATCCGGTATGGGATATGTAGGTGC -3‘

rgg3_del2: 5‘- *CCCATCCACTAAACTTAAACA*CCTTTGTCCTCTCTCAAC -3‘

rgg3_del3: 5‘- *TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG*GTATTTGCTGATCTTGC -3‘

rgg3_del4 (*Kpn*I): 5‘- CGGGGTACCGCAGTCATCTCTGGCTG -3‘

Oligonukleotid- Primer zum Nachweis definierter *rgg3*- Deletionsmutanten

rgg3_del1K (*Bam*HI): 5‘- CCGCGGATCCGGTTCAGTAGCCGATATTGTTTTCC -3‘

rgg3_del2K: 5‘- GACCATTTTGGCCGACTGACC -3‘

Oligonukleotid- Primer zur Herstellung einer *rgg3*- Komplementationsmutante

rgg3_komp1 (*Bam*HI): 5‘- CCGCGGATCCGGATGCTTTTTGTTGC -3‘

rgg3_komp2 (*Pst*I): 5‘- GCAATACTGCAGCCTATTTTCAATCCTAGAG -3‘

Oligonukleotid- Primer zur Herstellung eines Rgg3- Maltosebindeprotein Fusionsproteins

mbp_rgg3_N1 (*Bam*HI): 5‘- CGCGGATCCTTGCTATTTGATTTTCTCGAA- 3‘

mbp_rgg3_C1 (*Pst*I): 5‘- TGCACTGCAGTCAAAGTATTTTATGTTTC -3‘

Oligonukleotid- Primer für die quantitative Real-time PCR

GyrA5: 5‘- GACGTTCAGGTATTCCAC -3‘

GyrA6: 5‘- TCAAACTGAGGTACGACG -3‘

FbsAluc1: 5‘- CCGCGGATCCGTAGGTCAACTTATAGG -3‘

FbsALuc2: 5‘- CCGCGGATCCATTATACTTAATTTTCATTGCG -3‘

SrtA_LC1: 5‘- GCTAATTATTGTTGGGTTGG -3‘

SrtA_LC2: 5‘- TGTTCTGGTGTTACCTTTGA -3‘

CpsA1: 5‘- GGTGATAGTCAAGCTATGG -3‘

CpsA2: 5‘- TCTATCGTTATCGCCTCC -3‘

CovR_LC1: 5‘- ATTTAGCTCGCTTCGTCTC -3‘

CovR_LC2: 5‘- AGCAACTCTTCTCGTGTCAT -3‘

CylE_LC1: 5‘- GAGGAGACAGAAATTAGGAC -3‘

CylE_LC2: 5‘- TCTTGTCCAAAGGTTGGC -3‘

Hyl1: 5‘- CCTATTATCCAACGTACCG -3‘

Hyl2: 5‘- GAACCTGTAACTGATAACGG -3‘

Sod1: 5‘- CATCATGATAAGCACCATGC -3‘

Sod2: 5‘- TGGAGTATCTTGATTGGCCAG -3‘

Camp1: 5‘- TGAGGCTATTACTAGCGTGG -3‘

Camp2: 5‘- AAGTCGACAGCATCACACG -3‘

Gbs1919_LC1: 5‘- CGAAAGCAGTCATTCCATTG -3‘

Gbs1919_LC2: 5‘- TAGCAGAAAGTATGCACC -3‘

Gbs1263_for: 5‘- CTCCTATCGTACTATCCTTCC -3‘

Gbs1263_rev: 5‘- GATAGGTAGTTAGAAGCTCTC -3‘

Gbs0850_for: 5‘- GCTTCTGTAGGCTTCAGG -3‘

Gbs0850_rev: 5‘- CCGTATTGAATCTTAGTTCCTC -3‘

Lmb1: 5‘- ATGGAAGTCACACAAGGC -3‘

Lmb2: 5‘- ATAGCAGCAACTGAGCCG -3‘

Gbs2116_LC1: 5‘- CAAATCAACAAACATTTGGA -3‘

Gbs2116_LC2: 5‘- ATTGCACCTAGACACATTCC -3‘

Gbs2118_LC1: 5‘- GAAAGCCATGTTTTACCAAA -3‘

Gbs2118_LC2: 5‘- AGCTTTTCAATACGATGCTC -3‘

BibA_LC1: 5‘- AGCGTTTGCTGTATGTAGTG -3‘

BibA_LC2: 5‘- ATTTTGAGCCATTTGCTTAG -3‘

Alp3/R28_LC1: 5‘- TGGTGCAGCTTCTGTACTAA -3‘

Alp3/R28_LC2: 5‘- GACTCCCATCACTCCACTTA -3‘

Gbs1143_LC1: 5‘- CACTAGCAGGTGCATTTACA -3‘

Gbs1143_LC2: 5‘- CACTAGCAGGTGCATTTACA-3‘

Gbs1288_LC1: 5‘- GTTGGAGTAGCTTCAGTTGC -3‘

Gbs1288_LC2: 5‘- TGCTTTCTACAGGATGACCT -3‘

Gbs1356_LC1: 5‘- CTCATCAATCAGGAGAAAGG -3‘

Gbs1356_LC2: 5‘- CCACTTCTTTTCAGCTTCAT -3‘

Gbs1420_LC1: 5‘- AATGGTCACAAGTCCTGTTT -3‘

Gbs1420_LC2: 5‘- TCTCTTGATTATTGCTTCCTG -3‘

Gbs1539_LC1: 5‘- ATTCATCAATCGGTTATGCT -3‘

Gbs1539_LC2: 5‘- AGAATAATCCCTCCCGTAGA -3‘

Gbs1540_LC1: 5‘- GACGGTTTTAACGTTAGCTG -3‘

Gbs1540_LC2: 5‘- TAAAAACGGCTGATTGGTAT -3‘

Gbs1929_LC1: 5‘- AGTGGTTTAGCTGTTCAAGC -3‘

Gbs1929_LC2: 5‘- CATGGCTTGGTACATAGGAT -3‘

Gbs2008_LC1: 5‘- ACAAAACAGCGTTTTTCAAT -3‘

Gbs2008_LC2: 5‘- TTGCTACAACAGTTCCCTCT -3‘

Samluc3: 5‘- GAGCGGGGTACCTTCGGCACAATAGGAGTTG -3‘

Samluc4: 5‘- GCAGCGGATCCCTTAACTTGCCAAGTCTGG -3‘

Scp1: 5‘- AACAGTAGCAGATGACGC -3‘

Scp2: 5‘- AGCTAGTGCAGCATTACC -3‘

Hsh_N: 5‘- GTGCTTTGCCATGGTTGGCAAGCAGTTAACAG -3‘

Hsh_LC2: 5‘- ACACTTTCTGAGGCTGACG -3‘

Gbs0428 _LC1: 5‘- ATTGCTAGTGGAAGCATTGT -3‘

Gbs0428_LC2: 5‘- TCAACACCATTATCTGACCA -3‘

Gbs0451_LC1: 5‘- GCAGAGGAGCAAGAATTAAA -3‘

Gbs0451_LC2: 5‘- CTTTTGGGCTATCTAAACGA -3‘

Gbs0632_LC1: 5‘- GAAACCCAAGATACCAATCA -3‘

Gbs0632_LC2: 5‘- GAGATCATTGACCCCTGTAA -3‘

Gbs0456_LC1: 5‘- AAACATCTTAAAACGCTTGC -3‘

Gbs0456_LC2: 5‘- GCTGCATGACTTGGTAAAAC -3‘

Oligonukleotid- Primer zur Herstellung definierter *rogB3*- Deletionsmutanten

rogB3_del1 (*Bam*HI): 5‘- CCGCGGATCCCGTGTTATCGGCAAAAAGG -3‘

rogB3_del2: 5‘- *CCCATCCACTAAACTTAAACA*CCATCATCAAGTAAGGCGG -3‘

rogB3_del3: 5‘- *TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG*GCAGTACCATGAACTAC -3‘

rogB3_del4 (*Hin*dIII): 5‘- TGGCACAAGCTTCCATGTGAAACTGGGGTAGC -3‘

Oligonukleotid- Primer zum Nachweis definierter *rogB3*- Deletionsmutanten

rogB3_del1K (*Bam*HI): 5‘- CCGCGGATCCGGCCCAGAATTTTTAGAGTACC -3‘

rogB3_del2K: 5‘- CCATGTGAAACTGGGGTAGC -3‘

Oligonukleotid- Primer zur Herstellung einer *rogB3*- Komplementationsmutante

rogB3_komp1(*Bam*HI): 5‘- CCGCGGATCCGGATGTGAAAGGGAATTTTC -3‘

rogB3_komp2 (*Pst*I): 5‘- GCAATACTGCAGCGAAATTCTAGATTACTGTC -3‘

Oligonukleotid- Primer zur Herstellung von Sonden für EMSAs

cpsA1: 5‘- GGTGATAGTCAAGCTATGG -3‘

cpsA2: 5‘- TCTATCGTTATCGCCTCC -3‘

srr1_BS1: 5‘- GTTAACTGCTTGCCAAAA -3‘

srr1_BS2: 5‘- GAGGGGGTATCATAACATAA -3‘

gbs1478_BS1: 5‘- GTATTTGCGACAAACAAAA -3‘

gbs1478_BS2: 5‘- GGGTAGTAATCATAGCATAAAGT -3‘

gbs1478_BS3: 5‘- TATTGATATCATAATAAGTGA -3‘

gbs1478_BS4: 5‘- AATTTCTTATTATAAGGTATG -3‘

fbp_rep1 (*Eco*RI): 5‘- CCGGAATCCAACTATTGCTCCCCTGC -3‘

fbp_rep3 (*Eco*RI): 5‘- CCGGAATCCTTGAATATGCTACCATCA -3‘

fbp_rep4 (*Eco*RI): 5‘- CCGGAATCCTTTATAATATTAAAGG -3‘

fbp_rep5 (*Eco*RI): 5‘- CGGGAATCCCAACTAAATAATAAATTATCTTGAC -3‘

fbp_rev6 (*Eco*RI): 5‘- GCCGGATCCTTTCCTGATTTCCAAGTTC -3‘

Oligonukleotid- Primer zum Nachweis definierter *fbsB4*- Deletionsmutanten

sfbX_lacI (*Eco*RI): 5‘- CCGGAATTCCTGGTTAAGTATAGGAAATACTGC -3‘

sapC_pstI2b: 5‘- CCGCGGATCCGTTCAATGGGTATAATCTC-3‘

Oligonukleotid- Primer zur Herstellung einer *fbsB4*- Komplementationsmutante

fbsB_komp1a (*Bam*HI): 5‘- CCGCGGATCCCTGGTTAAGTATAGGAAATACTGC -3‘

fbsB_komp2 (*Pst*I): 5‘- GCAATACTGCAGTCGCCTTGATAGCAGTGTC -3‘

1.4. Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Antikörper in der angegebenen Verdünnung verwendet:

Kaninchen- Anti- MBP Antiserum	(1: 10000)	New England Biolabs, Frankfurt
Ziege- Anti- Kaninchen Antikörper/HRP	(1: 1000)	Dako Cytomation; Glostrup (DK)
Anti- Digoxigenin- AP, Fab- Fragment	(1:10000)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Maus- Anti- His6 Antikörper	(1:250)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Esel- Anti- Maus Fab- Fragment/HRP	(1:10000)	Dianova GmbH, Hamburg
Maus- Anti- FbsA Antikörper	(1:1000)	Schubert et al, 2004
Ziege- Anti- Maus Antikörper/Gold	(1:1000)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2. Plasmide

Die in der Arbeit verwendeten Plasmide sind in **Tabelle 1** zusammengefasst:

Tabelle 1: Plasmide und Plasmidkonstrukte

Bezeichnung	**Größe [Bp]**	**Eigenschaften**	**Referenz/Herkunft**
pG$^+$host6	6778	Amp^R, Em^R, *ori* pWV01 ts, *ori* pBR322	Maguin et al, 1992
pGΔ*rgg3*	7242	pGhost6 mit *rgg3*- flankierenden Bereichen zur Deletion des *rgg3*- Gens	diese Arbeit
pGΔ*rogB3*	7312	pGhost6 mit *rogB3*- flankierenden Bereichen zur Deletion des *rogB3*- Gens	diese Arbeit
pGΔ*fbsA*	7450	pGhost6 mit *fbsA*- flankierenden Bereichen zur Deletion des *fbsA*- Gens	Schubert et al, 2004
pGΔ*fbsB*	7804	pG$^+$host6 mit *fbsB*- flankierenden Bereichen zur Deletion des *fbsB*- Gens	Gutekunst et al, 2004

Fortsetzung **Tabelle 1**

Bezeichnung	**Größe [Bp]**	**Eigenschaften**	**Referenz/Herkunft**
pET28a(+)	5369	*ori* pBR322, f1 *ori*, Km^R, *lacI* T7-Promotor	Novagen
pMal	6644	Amp^R, *malE*, *lacZα*, *lacI*, P_{tac}, *ori* pBR322 *ori* M13	New England Biolabs
pMal*rgg3*	7295	pMal mit *rgg3*- Strukturgen zur Herstellung Rgg3- Fusionsproteins	diese Arbeit
pET*rogB2*	6863	pET28a(+) mit *rogB2*- Strukturgen zur Herstellung des RogB-Fusionsproteins	Eichner, 2005
pOri	5955	Em^R, *ori* ColE1, P23, *repD*, *repE*	Que et al, 2000
pOri*rgg3*	6681	pOri mit *rgg3*- Strukturgen zur Komplementation eines *rgg3*- Defekts in *S. agalactiae*	diese Arbeit
pOri*rogB3*	7595	pOri mit *rogB3*- Strukturgen zur Komplementation eines *rogB3*- Defekts in *S. agalactiae*	diese Arbeit
pOri*fbsB4*	8834	pOri mit *fbsB4*- Strukturgen zur Komplementation eines *fbsB4*- Defekts in *S. agalactiae*	diese Arbeit
pTCV-lac	12000	*ori* pACYC184, *ori* pAMß1, Em^R, Km^R, *lacZ*	Poyart et al, 1997
pTCV-Rep1	12753	pTCV-lac mit der intergenen Region zwischen dem *cls*- und dem *fbsA*- Gen	Schubert, 2005

3. Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme und eukaryotischen Zelllinien sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 2: Bakterienstämme und eukaryotische Zellen

***E. coli*- Stämme**

Stamm	Genotyp	Referenzen/ Herkunft
DH5α	*rec*A1, *end*A1, *hsd*R17 (r^-, m^+), *sup*E44, *gyr*A96, *thi*-1, *deo*R, F^-, λ^-, ϕ80d*lac*ZαM15, Δ(*lac*ZY-*arg*F)U196, *pho*A	Hanahan, 1983
ER2566	F^-;λ^-,*fhuA2[lon]ompT*; *lacZ*::*T*,*geneI gal sulA11* Δ*(mcrC-mrr) 114::IS10*,R*(mcr73::mini*Tn*10)2*, R*/zbg-210::*Tn*10)1*, (Tet^S), *EndA1 [dcm]*	New England BioLabs
ER2566 pET*rogB2*	*E. coli* ER2566 mit dem Plasmid pET28*rogB2* Zur Herstellung des RogB2- Fusionsproteins	Eichner, 2005
TG1	Δ(*lac-pro*) *supE thi hsdD5* F´*traD36 proAB lacI lacZ*Δ*M15*,	DSMZ; DSM 6056

***S. agalactiae*- Stämme**

Stamm	Eigenschaften	Referenzen/ Herkunft
6313	klinisches Isolat eines infizierten Neugeborenen; Serotyp III	Valentin-Weigand, 1996
6313 Δ*rgg3*	*rgg3*- Deletionsmutante von *S. agalactiae* 6313	diese Arbeit
6313 Δ*rogB3*	*rogB3*- Deletionsmutante von *S. agalactiae* 6313	diese Arbeit
6313 Δ*fbsA*	*fbsA*- Deletionsmutante von *S. agalactiae* 6313	Schubert et al, 2004
6313 Δ*rgg3*Δ*fbsA*	*rgg3/fbsA*- Doppeldeletions-mutante von *S. agalactiae* 6313	diese Arbeit
Gi7	Mastitisisolat; Serotyp IV	Uniklinik Gießen
Gi7 Δ*fbsB4*	*fbsB4*- Deletionsmutante von *S. agalactiae* Gi7	diese Arbeit

Eukaryotische Zelllinien

Zellart	**Eigenschaften**	**Referenzen/ 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 Kultivierung der verwendeten *E. coli*- Stämme erfolgte in LB- (Luria- Bertani-) Komplexmedium (Sambrook et al; 1989) bzw. in 2 x TY- Komplexmedium:

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

Zur Selektion rekombinanter *E. coli*- Kolonien mittels Antibiotika, wurden sterilfiltrierte Stammlösungen dem autoklavierten Medium zugegeben.
In dieser Arbeit wurden für *E. coli* folgende Antibiotika in der jeweils angegebenen Konzentration verwendet:

Kanamycin	50 µg/ml
Ampicillin	100 µg/ml
Erythromycin	300 µg/ml

Für die Herstellung von LB- Agarplatten wurde dem Medium 16 g/l Bacto- Agar vor dem Autoklavieren zugegeben. Die Inkubation von *E. coli* auf Agarplatten erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. *E. coli*- Flüssigkulturen wurden bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler bei 130 rpm inkubiert. Sowohl Vorkulturen, als auch Kulturen für Miniplasmidpräparationen wurden in 5 ml Flüssigmedium in Reagenzgläsern angeimpft und im Inkubationsschüttler inkubiert. Für Midiplasmidpräparationen wurden 100 ml 2 x TY-Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet. Zur Herstellung von kompetenten Zellen wurden 250 ml LB-Medium in 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet.
E. coli wurde auf Agarplatten bei 4 °C bis zu 4 Wochen aufbewahrt. Zur längerfristigen Lagerung der Stämme wurden Glycerinkulturen (30 % (v/v) Glycerin) hergestellt und bei -70 °C gelagert.

4.2. Kultivierung von *S. agalactiae*

Alle in dieser Arbeit verwendeten *S. agalactiae*- Stämme wurden auf THY- (Todd- Hewitt-Broth (Oxoid) mit zugesetztem Hefeextrakt) Komplexmedium gezüchtet. Zur Charakterisierung des Hämolyseverhaltens wurden die verwendeten *S. agalactiae*- Stämme zusätzlich auf Blut- Agarplatten inkubiert. Hierfür wurde Columbia- Agar- Medium nach dem Autoklavieren auf ca. 45 °C abgekühlt und mit 50 ml/l Schafsblut (Oxoid) versetzt.

THY- Medium		**Columbia- Agar- Medium**	
Todd- Hewitt- Broth	36,4 g/l	Columbia- Agar Base	19,5 g/l
Hefeextrakt	10 g/l		

Für die Herstellung von THY- Agarplatten wurde dem Medium 16 g/l Bacto- Agar vor dem Autoklavieren zugegeben. Zur Selektion rekombinanter *S. agalactiae*- Kolonien mittels Antibiotika, wurden sterilfiltrierte Stammlösungen dem autoklavierten Medium zugegeben.
In dieser Arbeit wurden für *S. agalactiae* folgende Antibiotika in der jeweils angegebenen Konzentration verwendet:

Erythromycin in THY- Medium	5 µg/ml
Erythromycin in Blut- Agarplatten	1 µg/ml
Kanamycin	500- 2000 µg/ml

Die Inkubation von *S. agalactiae* auf Agarplatten erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Die Kultivierung von Stämmen mit episomal replizierendem, temperatursensitivem Plasmid erfolgte bei 30 °C und Stämme mit chromosomal integriertem Plasmid wurden bei 39 °C inkubiert. In Flüssigmedium erfolgte die Inkubation stehend oder unter leichtem Schütteln im Schüttelinkubator.
Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *S. agalactiae*- Stämme wurden für maximal eine Woche auf Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt. Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen (50 % (v/v) Glycerin) angelegt und bei –70 °C gelagert.

4.3. Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Für die Kultivierung der eukaryotischen Lungenepithelzelllinie A549 wurde folgendes Medium verwendet:

RPMI- Medium (+ 10 % (v/v) FCS)

RPMI (Gibco)	500 ml
L-Glutamat (200 mM; Gibco)	5 ml
Natriumpyruvat (100 mM; Gibco)	5 ml
Non Essential Amino Acids (NEAAs; 100 x, Gibco)	5 ml
fötales Kälberserum (FCS; Biochrom)	50 ml

Für die Kultivierung der eukaryotischen Rachenepithelzelllinie HEp2 wurde folgendes Medium verwendet:

MEM- Medium (+ 10 % (v/v) FCS)

Minimal Essential Medium (Gibco)	500 ml
L-Glutamat (200 mM; Gibco)	5 ml
Natriumpyruvat (100 mM; Gibco)	5 ml
Non Essential Amino Acids (NEAAs; 100 x, Gibco)	5 ml
fötales Kälberserum (FCS; Biochrom)	50 ml

Die Herstellung der Zellkultur- Medien erfolgte stets unter der Sterilwerkbank. Alle Komponenten wurden vor Zugabe zum Medium sterilfiltriert. FCS wurde zur Inaktivierung des Komplementsystems vor Zugabe zum Medium für 30 min bei 56 °C inkubiert. Das fertige Medium wurde bei 4 °C aufbewahrt und nicht länger als 4 Wochen verwendet. Vor Zugabe zu den eukaryotischen Zellen wurde das Medium stets auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

Für beide Zelllinien wurde folgender 10 x konzentrierte Phosphat- Puffer verwendet, welcher vor der Verwendung 1: 10 verdünnt und autoklaviert wurde:

10 x Zellkultur- PBS

2 g KCl

2 g KH_2PO_4

80 g NaCl

21,6 g Na_2HPO_4 x 7 H_2O

ad 1000 ml A. bidest

pH 7,4

Um konstantes Wachstum und somit immer gleiche, optimale Kulturbedingungen gewährleisten zu können, wurden die eukaryotischen A549 und HEp2 Zellen alle 3-4 Tage 1:8 verdünnt umgesetzt. Hierzu wurde zunächst das alte Medium abgezogen und die Zellen mit 10 ml 1 x PBS gewaschen, um restliches Medium zu entfernen. Anschließend wurden 5 ml Trypsin/EDTA (Gibco) zugegeben und die Zellen zum Ablösen von der Kulturflasche für 5-10 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 10 ml frischem Medium von der Kulturflasche abgewaschen und in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Dort wurden die Zellen in insgesamt 20 ml Medium für 5 min bei Raumtemperatur und 1200 rpm sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 8 ml Medium resuspendiert. 1 ml hiervon wurde zum Animpfen von 29 ml frischem Medium in einer neuen Kulturflasche verwendet. A549 und HEp2 Zellen wurden stets bei 37 °C in einer 5 %igen CO_2– Atmosphäre inkubiert.

5. Isolierung von DNA

5.1. Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken

Die Präparation chromosomaler DNA aus Streptokokken (Pospiech & Neumann, 1995) und die verwendeten Puffer sind nachfolgend dargestellt:

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			

Zunächst wurde eine 5 ml Übernachtkultur von *S. agalactiae* bei RT für 5 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in 1 ml TE- Puffer suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei RT für 5 min bei 8000 rpm erfolgte die Aufnahme des Pellets in 300 µl TES-Puffer. Durch Zugabe von 100 µl Lysozym (5 mg/ml in TES-Puffer) und 10 µl Mutanolysin (1 mg/ml in TES-Puffer) wurde durch Inkubation bei 37 °C für 2 h im Heizblock die Zellwand verdaut. Die Lyse der Zellen erfolgte anschließend durch Zugabe von 22 µl 10 % (w/v) SDS. Freigesetzte Proteine wurden durch Zusatz von 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) und einer Inkubation für 2-3 h bei 56 °C im Heizblock abgebaut. Unverdaute Proteine wurden unter Zugabe von 100 µl gesättigter NaCl- Lösung (6 M) und leichtem Schwenken der Probe gefällt und zusammen mit Zelltrümmern bei RT für 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues 1 ml Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt und einer zweimaligen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- Extraktion unterzogen. Hierbei wurden weitere Proteine aus dem Ansatz entfernt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen abs. Ethanol wurde die chromosomale DNA gefällt und konnte durch Abzentrifugieren bei 4 °C für 10 min bei 13000 rpm pelletiert werden. Anschließend wurde die DNA mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und das getrocknete Pellet in 100 µl 10 mM Tris/HCl (pH 7,6) gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4 °C.

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

Zur Isolierung von Plasmid- DNA aus *E. coli* wurde das von Birnhoim (1983) beschriebene Verfahren in modifizierter Form angewendet. Die hierfür benötigten Lösungen sind im Folgenden aufgeführt:

Sol A

Glucose	50 mM
Tris/HCl	25 mM
EDTA	10 mM
pH 8,0	

SolC

Kaliumacetat	3 M
Eisessig	11,5 % (v/v)
pH	5,2

Sol B (immer frisch ansetzen)

NaOH	0,2 N
SDS	1 % (w/v)

Mini- Plasmidpräparation

Es wurden 1,5 ml einer 5 ml ÜN- Kultur (in 2 x TY- Medium) bei RT für 2 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet vollständig in 100 µl Sol A gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden dem Ansatz 200 µl Sol B zugegeben. Nach zweimaligem kurzem Schütteln erfolgte die Inkubation für 5 min auf Eis. Ziel dieser alkalischen Lyse ist es Zellwandproteine und Phospholipide zu lösen, sowie Proteine und DNA zu denaturieren. Durch Zugabe von 150 µl Sol C, leichtem Schwenken der Probe und anschließender Inkubation für 5 min auf Eis erfolgte die Fällung chromosomaler DNA. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 10 min und 4 °C wurde der Plasmid- DNA enthaltende Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und einer einmaligen Phenolextraktion unterzogen. Anschließend wurde die Plasmid- DNA unter Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat gefällt und bei RT für 10 min bei 13000 rpm pelletiert. Um noch vorhandenes Salz zu entfernen wurde die Plasmid-DNA mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,6 aufgenommen und bei -20 °C gelagert.
Die schnell durchzuführende Methode ermöglichte in dieser Arbeit die Kontrolle rekombinanter *E. coli*- Klone nach erfolgter Transformation. Die erhaltene Menge und Reinheit der Plasmid- DNA waren ausreichend für Kontrollrestriktionsverdaue und weitere Transformationen.

Midi- Plasmidpräparation

Die rekombinanten *E. coli*- Zellen wurden in 100 ml 2 x TY-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen über Nacht kultiviert. Da *E. coli* in diesem Medium eine hohe optische Dichte erreicht, kann mit dieser Methode eine große Menge an Plasmid- DNA aus dem Ansatz isoliert werden.
Zunächst wurden 50 ml der *E. coli* ÜN- Kultur in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Sol A suspendiert. Durch Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und Inkubation für 10 min bei RT wurde die Zellwand verdaut. Zur vollständigen Lyse der Zellen und zur Denaturierung der Proteine wurden dem Ansatz 10 ml Sol B zugesetzt und dieser

nach kurzem Schwenken für 10 min auf Eis inkubiert. Zur Neutralisation des Ansatzes wurden 7,5 ml Sol C zugegeben und die Probe für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 30 min bei 4000 rpm, wodurch Zelltrümmer, Proteine und chromosomale DNA pelletiert wurden. Der erhaltene Überstand wurde über eine Mullbinde in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid- DNA unter Zugabe von 12 ml Isopropanol und einer Inkubation für 2 min unter leichtem Schwenken bei RT gefällt. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm wurde die Plasmid-DNA sedimentiert. Das getrocknete Pellet wurde in 2 ml A. dest. aufgenommen. Um vorhandene RNA zu entfernen wurde der Ansatz mit 2 ml 5 M LiCl (in 50 mM Tris/HCl; pH 8,0) versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm pelletiert. Die im Überstand vorliegende DNA wurde mit 2,5 Volumen abs. Ethanol für 2 h bei -20 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 4 °C und 5000 rpm wurde das Pellet getrocknet, anschließend in 400 µl TE- Puffer pH 7,6 aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Um noch vorhandene RNA möglichst vollständig zu entfernen wurden 5 µl RNase A (10 mg/ml) zugesetzt und der Ansatz für 30 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Zur Entfernung von Proteinen wurde eine zweimalige Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- Extraktion durchgeführt. Zur Konzentrierung der Plasmid- DNA wurde diese unter Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 2,5 Volumen abs. Ethanol für 2 h bei -20 °C gefällt. Die Plasmid- DNA wurde für 30 min bei 4 °C und 13000 rpm sedimentiert und das Pellet anschließend mit 1 Volumen 70 % Ethanol (v/v) gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und in 100 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,6 aufgenommen. Die Lagerung der Plasmid- DNA erfolgte bei -20 °C.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Methode handelt sich um eine leicht modifizierte Form der alkalischen Lyse nach Sambrook et al (1989). Die Plasmide werden dabei aus einem größeren Volumen isoliert und liegen am Ende in großer Reinheit und Menge vor. Geeignet sind die auf diese Weise gewonnenen Plasmide vor allem für präparative Restriktionsverdaue mit anschließender Ligation, sowie für die Transformation in *S. agalactiae*.

6. Aufreinigung von DNA

Um Proteine aus einem Ansatz zu entfernen und damit DNA mit großer Reinheit zu erhalten, erfolgt die Aufreinigung über eine Phenol- Chloroform- Extraktion. Dabei denaturiert und inaktiviert Phenol Proteine, so dass diese in der Interphase bzw. Phenolphase ausfallen. Durch anschließende Behandlung mit Isoamylalkohol wird das in der wässrigen Phase verbliebene Phenol vollständig entfernt. Die Ethanolfällung führt zur Ausfällung und somit zur Konzentrierung der DNA.

Zunächst wurde die wässrige Phase, welche DNA enthält mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und das Gemisch für 2 min geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz für 5 min bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die DNA beinhaltet, wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte je nach Bedarf eine erneute Phenolextraktion. Der Vorgang wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Zur Entfernung von Phenolresten wurde der wässrigen, DNA-enthaltenden Phase ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt, der Ansatz für 2 min geschüttelt und anschließend für 5 min bei maximaler Umdrehungszahl abzentrifugiert. Bei Bedarf wurde der Ansatz einer erneuten Chloroform/Isoamylalkohol-Behandlung unterzogen.
Nach erfolgter Phenolextraktion wurden dem Ansatz 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 2,5 Volumen abs. Ethanol zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei -20 °C Nach Zentrifugation wurde das Pellet mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und in 10 mM Tris/HCl pH 7,6 gelöst. Die Ausbeute der DNA konnte photometrisch oder mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt werden.

7. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese stellt eine einfache und relativ schnell durchzuführende Methode zur Auftrennung von DNA in einem elektrischen Feld dar. Agarose ist ein Polysaccharid aus glycosidisch miteinander verbundenen D-Galactose- und 2,6-Anhydrogalactose- Molekülen und bildet nach Polymerisierung die ungeladene Gelmatrix für die Wanderung der DNA- Moleküle. Dabei wandert die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladene DNA zur Anode. Je nach Konzentration der Agarose bilden sich unterschiedlich große Poren aus, so dass je nach Größe der zu trennenden DNA- Moleküle Gele unterschiedlicher Agarosekonzentration eingesetzt werden. Neben der Konzentration der Agarose beeinträchtigen weitere Parameter wie Konformation der DNA, Größe der DNA und angelegte Spannung das Laufverhalten der DNA- Moleküle.

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer zur Herstellung von Agarosegelen sind im Folgenden beschrieben:

50 x TAE- Puffer

EDTA	50 mM
Tris/HCl	2 M
Natriumacetat	500 mM
pH 8,0	

Ladepuffer

0,25 % (w/v) Bromphenolblau in
40 % (v/v) Glycerin

In der vorliegenden Arbeit wurde die Agarose in einer Konzentration von 0,8 % (w/v) bzw. 2 % (w/v) eingesetzt. Die Agarosegelelektrophorese diente zur Größenbestimmung, Mengenbestimmung und Auftrennung verdauter DNA. Die benötigte Agarosemenge wurde in 1 x TAE- Puffer eingewogen und anschließend zum Lösen in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde die Lösung in die Gelgießvorrichtung gegossen und

erstarrte dort nach dem Abkühlen auf RT. Das fertige Gel wurde mit 1 x TAE-Puffer bedeckt und die Proben 1:5 mit Ladepuffer versetzt aufgetragen.

Als Größenstandard diente eine 1 kb- DNA- Leiter (Fermentas). Der Gellauf erfolgte zunächst bei 70 V. Nach dem Einlaufen der Proben in das Gel wurde die Voltzahl auf 90 V erhöht. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel für 5-20 min in einer Ethidiumbromid- Lösung (1 µg/ml) gefärbt. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde anschließend durch Waschen des Gels mit Wasser entfernt.

Bei einer UV-Wellenlänge von λ = 312 nm konnten die Banden aufgrund der Einlagerung von Ethidiumbromid in den DNA- Doppelstrang sichtbar gemacht, mittels einer Photo-dokumentationsanlage fotografiert und digital gespeichert werden.

8. Sequenzierung von DNA

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Sequenziermethode basiert auf dem nach Sanger (1977) entwickeltem Prinzip des Kettenabbruchs bei der DNA- Synthese. Hierbei werden der DNA- Polymerase für die Synthese eines Komplementärstranges neben dNTP´s (Desoxynukleotide) auch ddNTP´s (Didesoxynukleotide) angeboten, deren Riboserest am 3´-Ende keine OH- Gruppe besitzen, was zum Abbruch der DNA- Synthese führt. Dadurch entstehen statistisch verteilt Komplementärstränge unterschiedlicher Länge, die nach Größenseparation in einem Polyacrylamidgel unterschiedliches Laufverhalten aufweisen. Durch unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der vier verschiedenen ddNTPs kann anschließend auf die Sequenz der DNA rückgeschlossen werden.

Für Sequenzierungen von Plasmiden wurde 1 µg gereinigte Plasmid- DNA eingesetzt. Zur Sequenzierung von PCR- Produkten wurden 20 ng pro 100 Bp des PCR- Produktes verwendet. Die benötigte Menge der zu sequenzierenden DNA wurde getrocknet zu der Firma MWG Biotech GmbH geschickt, welche die Sequenzierungen durchführte. Die für die Sequenzierung benötigten Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl beigelegt.

9. Arbeiten mit RNA

Die Isolierung von RNA ermöglicht die Beantwortung vieler Fragen bezüglich der Expression von Genen oder der Beschaffenheit von Transkripten. Allerdings ist das Arbeiten mit RNA auf Grund des ubiquitären Vorhandenseins von RNasen und der damit verbundenen Instabilität der RNA mit großer Sorgfalt durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund nur mit Handschuhen gearbeitet und benötigte Geräte und Materialien mit RNase-Exitus (Invitrogen) behandelt. Die verwendeten Lösungen und leeren Gefäße wurden vor Gebrauch stets zweimal autoklaviert.

9.1. Isolierung von RNA aus Streptokokken

Die Isolierung von Gesamt- RNA aus Streptokokken erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen. Hierfür wurden 60 ml THY- Medium in einem Erlenmeyerkolben ohne Schikanen mit 600 µl einer ÜN- Kultur angeimpft und bis zum Erreichen der gewünschten optischen Dichte kultiviert. Anschließend erfolgte eine rasche Abkühlung der Kulturen mit - 70 °C kaltem Ethanol und die Pelletierung der Kultur für 5 min bei 3500 rpm und 4 °C. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem 10 mM Tris/HCl pH 7,6 suspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 8000 rpm und 4 °C. Das erhaltene Pellet wurde in 100 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,6 aufgenommen und in ein Ribolyser- Gefäß mit 250 mg Glasbeads gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte nach Zugabe von 700 µl RLT- Puffer, in welchem 1 % Mercaptoethanol enthalten war, im Ribolyser (2 x 45 sec bei höchster Stufe). Nach Zentrifugation für 2 min mit 13000 rpm bei RT wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 500 µl Ethanol zupipettiert. In je 700 µl Aliquots wurde der Ansatz auf eine RNeasy- Säule gegeben und für je 15 sec mit 10000 rpm bei RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses erfolgte der Waschschritt mit 700 µl RW1- Puffer. Die Säule wurde anschließend auf ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und 2 x mit 500 µl RPE- Puffer mit 10000 rpm für 15 sec bei RT gewaschen. Zur Beseitigung von Pufferresten wurde die Säule für 2 min bei 10000 rpm bei RT zentrifugiert. Die gebundene RNA wurde abschließend mit einer jeweiligen Inkubation von 1 min mit zweimal 50 µl RNase- freiem Wasser eluiert.

9.2. DNase I- Verdau der RNA

Um für weitere Analysen eine Kontamination der RNA mit DNA auszuschließen, wurde die isolierte RNA einem zweistufigen DNase I- Verdau unterzogen. Zunächst erfolgte der Verdau mit RNase- freier DNase I (Roche) in der Probe selbst. Hierfür wurde folgender Ansatz verwendet:

RNA	100 µl
Inkubationspuffer (Roche)	20 µl
RNase- Inhibitor (Fermentas)	2 µl
DNase I (Roche)	20 µl
Ad 200 µl RNase- freies Wasser	

Die Inkubation erfolgte für 45 min bei 37 °C. Anschließend folgte der Verdau auf einer RNeasy- Säule mit dem RNase- freien DNase I Set von Qiagen. Hierbei wurde dem oben beschriebenen Verdauansatz 700 µl RLT- Puffer, in welchem 1 % Mercaptoethanol enthalten war, und 500 µl Ethanol zugegeben. Anschließend wurden 2 x je 700 µl des Ansatzes auf die Säule pipettiert und für 15 sec mit 10000 rpm bei RT zentrifugiert. Es folgte ein Waschschritt mit 350 µl RW1- Puffer für 15 sec bei 10000 rpm bei RT. Nach Zugabe des DNase I Inkubationsmixes (10 µl DNase I- Lösung + 70 µl RDD- Puffer) wurde der Ansatz für 45 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 350 µl RW1- Puffer und Zentrifugation für 15 sec bei 10000 rpm wurde der Verdau gestoppt. Nach einmaligem Waschen mit 500 µl RPE- Puffer für 15 sec bei 10000 rpm bei RT, erfolgte ein zweiter Waschschritt für 2 min bei 10000 rpm. Zur Beseitigung von Pufferresten wurde die Säule für 1 min bei 10000 rpm bei RT zentrifugiert. Die gebundene RNA wurde abschließend mit einer jeweiligen Inkubation von 1 min mit 2 x 50 µl Wasser eluiert. Die so erhaltene RNA wurde bei -70 °C gelagert.

9.3. Herstellung von RNA- Agarosegelen

Die für die Herstellung eines denaturierenden RNA- Agarosegels verwendeten Lösungen sind im Folgenden aufgeführt:

5 x MOPS

MOPS	200 mM
Na-Acetat	50 mM
EDTA	10 mM
pH 7	

RNA- Probenpuffer

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

Formamid/Formaldehyd
--> Mehrmalige Passage über Ionenaustauscher bis ein pH > 6 vorliegt

Für das Gel wurde folgender Ansatz verwendet:

20 ml 5 x MOPS
63 ml A. bidest
1,8 g Agarose

Der Ansatz wurde in der Mikrowelle gekocht und nach Abkühlen auf ca. 60 °C 17 ml Formaldehyd zugegeben. Nach dem Gießen des Gels in eine dafür vorgesehene Gelgießvorrichtung erfolgte das Ausdampfen des Gels für 30 min unter dem Abzug. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS verwendet.
Für die Proben wurden 4 µl der RNA mit 2 µl Probenpuffer versetzt und der Ansatz für 10 min bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf das Gel geladen und bei 70 V aufgetrennt. Die Detektion erfolgte auf dem UV- Schirm.

10. Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)

10.1. Standard- PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können DNA- Fragmente in großer Menge spezifisch amplifiziert werden. Die PCR wurde von Kary B. Mullis entwickelt und ist durch Einsatz einer hitzestabilen DNA- Polymerase aus *Thermus aquaticus* von Saiki et al (1988) optimiert worden.

Für die PCR werden synthetische Oligonukleotidprimer gewählt, welche komplementär zu den 3'- Enden der zu amplifizierenden Sequenz sind. Ausgehend von diesen Primern, welche an das denaturierte, einzelsträngige `Template´ binden (`Annealing´) und somit kurze doppelsträngige DNA- Fragmente bilden, kann die DNA- Polymerase den Doppelstrang vervollständigen (Elongation). Durch sich zyklisch wiederholende Denaturierung der Doppelstränge und Anlagern der Primer mit anschließender Elongation erfolgt die Amplifikation der DNA- Fragmente in großer Kopienzahl.

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR- Ansätze sind im Folgenden dargestellt. Dabei wurden verschiedene *Taq*- Polymerasen verwendet:

PCR- Ansatz unter Verwendung der *Taq*- Polymerase der Firma Fermentas GmbH

5 µl 10 x *Taq*- Polymerase- Puffer
2,5 µl $MgCl_2$ (25 mM)
5 µl dNTP´s (je 2 mM)
1 µl chromosomale 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 unter Verwendung einer rekombinant hergestellten *Taq*- Polymerase

5 µl 10 x *Taq*- Polymerase- Puffer

4 µl $MgCl_2$ (25 mM)

5 µl dNTP´s (je 2 mM)

1 µl chromosomale 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 unter Verwendung der *Taq*- Polymerase von Invitrogen

5 µl 10 x *Taq*- Polymerase- Puffer

1,5 µl $MgCl_2$ (50 mM)

5 µl dNTP´s (je 2 mM)

1 µl chromosomale DNA

1 µl Primer 1 (10 pmol)

1 µl Primer 2 (10 pmol)

0,2 µl *Taq*- Polymerase (1 U/µl)

ad 50 µl A. dest

Im Folgenden ist ein Standard- PCR- Programm aufgeführt:

Vorabdenaturierung	94 °C; 4 min
Denaturierung	94 °C; 30 sec
Annealing	50-60 °C; 30 sec
Elongation	72 °C; 60 sec/1000 Bp
Endelongation	72 °C; 4 min
Lagerung	4 °C

Nach beendeter PCR wurden zur Kontrolle je 5 µl des Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt.

10.2. Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkription kann RNA in DNA umgeschrieben werden. Das dafür zuständige Enzym Reverse Transkriptase wurde von Temin, Baltimore und Dulbecco entdeckt (1975) und charakterisiert.
In dieser Arbeit wurde für die Synthese von cDNA der cDNA First Strand Synthesis Kit (Fermentas) verwendet. Hierfür wurde zunächst die Konzentration der DNA- freien RNA photometrisch bestimmt. Für die cDNA- Synthese wurden 5 µg Gesamt- RNA eingesetzt. Nach der Zugabe von 1 µl Random- Hexamer- Primer wurde der Ansatz auf 12 µl mit Nuklease- freiem A. bidest aufgefüllt. Nach vorsichtigem Mischen und kurzer Zentrifugation erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 70 °C, um Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Nach der Überführung auf Eis wurden dem Ansatz 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 1 µl Ribonukleasepuffer (20 U/µl) und 2 µl dNTP- Mix (je 2 mM) zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen und kurzer Zentrifugation wurde der Ansatz für 5 min bei 25 °C inkubiert. Nach dem Hybridisieren der Primer folgte die Zugabe von 1 µl MULV- Reverse Transkriptase (200 U/µl) und eine Inkubation bei 25 °C für 10 min. Für die Elongation wurde der Ansatz für 60 min bei 42 °C inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte für 10 min bei 70 °C und anschließender Inkubation auf Eis. Das Volumen der Probe wurde mit Nuklease-freiem A. bidest auf 100 µl aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

10.3. Quantitative Real-time PCR

Bei der quantitativen Real-time PCR kann der Verlauf einer PCR zeitgleich verfolgt und anhand der Kurven eine Quantifizierung des Ausgangsmaterials durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden die Transkriptmengen einzelner Gene mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR am Light Cycler (Roche) bestimmt. Das Prinzip des Light Cyclers beruht auf der Einlagerung des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR- Green in doppelsträngige DNA. Dadurch kann die exponentielle Amplifikation der DNA mittels PCR gemessen und der Wendepunkte der Kurve, an dem die PCR- Reaktion optimalen Bedingungen ausgesetzt ist, bestimmt werden. Dabei tritt der Wendepunkt umso früher ein, je größer die DNA- Menge zu Beginn der PCR war. Durch Vergleich der Wendepunkte der einzelnen Proben und Abgleich mit einer externen Kalibriergeraden kann auf die Menge des Ausgangsmaterials rückgeschlossen

werden. Die in dieser Arbeit verwendete Kalibriergerade wurde von Ulrike Samen (2005) erstellt.

In dieser Arbeit wurde der LightCycler DNA Master SYBR Green I verwendet. Für einen Light Cycler Lauf wurde folgender Ansatz gewählt:

5,8 µl A. dest.
1,2 µl 25 mM $MgCl_2$
1 µl SYBR- Green- Mix
0,5 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
0,5 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
0,15 µl *Taq*- Polymerase (Fermentas)
2 µl cDNA

Dieser Ansatz wurde in eine vorgekühlte Kapillare pipettiert und in das Light Cycler System gesetzt. Dabei wurde folgendes PCR- Programm durchlaufen:

Vorabdenaturierung	95 °C; 30 sec
Denaturierung	95 °C; 0 sec
Annealing	55 °C; 15 sec
Elongation	72 °C; 30 sec

Im Anschluss an den Lauf erfolgte zusätzlich eine Schmelzpunktanalyse, bei welcher die Temperatur sukzessiv auf 95 °C erhöht wird. Dabei kann die Spezifität der Reaktion ermittelt werden, da für jedes PCR- Produkt ein charakteristischer Zeitpunkt der Einzelstrangtrennung auftritt. Mit Hilfe dieser Analyse kann das Vorhandensein von Nebenprodukten in einer Reaktion ausgeschlossen werden.

11. Southern Blot- Analyse

Mit der Methode der Southern Blot- Analyse (Southern, 1975) kann DNA auf eine Membran transferiert werden und mittels spezifischen Sonden detektiert werden.

11.1. Southern Blot- Transfer

Für den Transfer werden folgende Lösungen verwendet:

Depurinierungslösung:		**Denaturierungslösung**	
HCl	0,25 M	NaOH	0,5 M
		NaCl	1,5 M

Neutralisierungslösung		**Transferlösung (20 x SSC)**	
Tris/HCl	1 M	NaCl	3 M
NaCl	2 M	Trinatrium-Citrat	0,3 M
pH 5,0		pH 7,0	

Zunächst wurde die chromosomale DNA mittels Restriktionsenzymen partiell verdaut. Dabei wurden Restriktionsenzyme verwendet, die möglichst gleichmäßig im Chromosom, aber nicht im zu detektierenden Bereich schneiden. Die DNA wurde über einen Zeitraum von 6-8 h bei 37 °C verdaut und anschließend in einem 0,8 %igen Agarosegel über Nacht bei 24 V aufgetrennt. Nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) wurde an dieses ein Lineal angelegt und unter UV- Licht eine Aufnahme erstellt.
Der Transfer der DNA erfolgte in der nach Herstellerangaben aufgebauten Apparatur, welche auf der Grundlage vakuumunterstützter Diffusion bei einem angelegten Unterdruck von 50 mbar die DNA- Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran überträgt.
Zunächst erfolgte die Überschichtung des Gels für 20 min mit Depurinierungslösung, wobei die Flüssigkeit alle 5-10 min ausgetauscht wurde. Zweck der Depurinierungslösung ist es, Einzelstrangbrüche in der DNA zu erzeugen, um die Effizienz des Transfers der DNA auf die Membran zu erhöhen. Während der Depurinierung erfolgte ein Farbumschlag des Ladepuffers von blau nach gelb. Im Anschluss daran wurde das Gel für 20 min mit

Denaturierungslösung überschichtet, wobei auch hier alle 5-10 min die Flüssigkeit gewechselt wurde. Der Ladepuffer vollzog dabei einen Farbumschlag von gelb nach blau. Schließlich erfolgte die Überschichtung des Gels mit Neutralisationslösung und einer Inkubation für 20 min, ebenfalls mit Flüssigkeitswechsel alle 5-10 min.
Für den Transfer der DNA auf die Nylonmembran wurde das Gel für 1 h mit Transferlösung überschichtet, wobei die Lösung ebenfalls alle 10 min ausgetauscht wurde. Nach dieser Zeit wurde die Membran zwischen zwei Whatman- Papieren getrocknet und die DNA im UV-Crosslinker (120000 µJ, 30 sec) auf der Membran fixiert. Falls nicht unmittelbar im Anschluss an die Fixierung der DNA die Hybridisierung erfolgte, wurde der Filter im Ofen für 2 h bei 80 °C gebacken und zwischen zwei Whatman- Papieren trocken bei RT aufbewahrt.

11.2. Southern- Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde eine spezifische DNA- Sonde benötigt, welche unter Zugabe von Digoxigenin- markiertem dUTP über eine PCR synthetisiert wurde. Die Detektion erfolgte über Alkalische- Phosphatase- gekoppelte Anti- Digoxigenin- Antikörper. Die PCR wurde laut Standard- Protokoll unter Zugabe von 0,5 µl Digoxigenin- markiertem dUTP durchgeführt.
Im Folgenden sind die für die Hybridisierung benötigten Lösungen aufgeführt:

(Prä-) Hybridisierungslösung	**50 x Denhardt**
6 x SSC	1 % (w/v) Ficoll
5 x Denhardt	1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone
0,5 % (w/v) SDS	1 % (w/v) BSA Fraktion V
100 µg/ml Heringsperma- DNA	gelöst in A. bidest bei 37 °C
ad 20 ml A. bidest	

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran erfolgte die Inkubation der Membran mit Prähybridisierungslösung im Hybridisierungsofen für 1 h bei 65 °C.
Nach Zugabe von 5 µl Sonde, die durch Inkubation bei 95 °C und anschließender Abkühlung auf Eis denaturiert worden war, erfolgte über Nacht die Hybridisierung bei 65 °C im Hybridisierungsofen.

11.3. Detektion der Sonde über Chemilumineszenz

Die Detektion der Sonde auf der Membran erfolgte über Anti- Digoxigenin- Antikörper, die mit dem Enzym Alkalische Phosphatase kovalent gekoppelt waren. Alkalische Phosphatase dephosphoryliert das synthetische Substrat CSPD (Roche) unter Freisetzung von Licht der Wellenlänge λ = 477 nm. Die Visualisierung der Enzymreaktion erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms, der durch das emittierte Licht geschwärzt wurde.

Die für die Waschschritte benötigen Lösungen sind im Folgenden aufgeführt:

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) Blockingreagenz 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	

Im Anschluss an die Hybridisierung wurde die Membran zweimal für 15 min bei RT mit Waschlösung I gewaschen. Anschließend erfolgten zwei Waschschritte mit Waschlösung II für 25 min bei 65 °C. Die nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nachdem die Membran für 1-3 min in Waschpuffer inkubiert worden war, erfolgte die Zugabe von 20 ml Puffer II mit einer Inkubationszeit von 30 min. Die Anti- Digoxigenin-Antikörper (Roche) wurden 1:10000 in 20 ml Puffer II verdünnt auf die Membran gegeben und für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für je 15 min mit Waschpuffer wurde die Membran erneut für 5 min in 20 ml Puffer III inkubiert. Das Substrat CSPD (Roche) wurde 1:1000 in Puffer III verdünnt und auf die Membran gegeben. Anschließend wurde der Filter getrocknet und zwischen zwei Kopierfolien gelegt. Zur Detektion wurde sowohl auf der Membran, als auch unter der Membran je ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser zwischen 1-24 h exponiert. Zur Beschleunigung der Enzymreaktion wurde die Filmschatulle bei 37 °C im Brutschrank gelagert.

12. Rekombination von DNA

12.1. Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Restriktionsenzyme vom Typ II eingesetzt, wobei die vom Hersteller empfohlenen Temperaturen und Puffer eingehalten wurden. Bei einem Doppelverdau wurden die entsprechenden Puffer verwendet, in denen für beide Enzyme eine Mindestaktivität von 75 % beschrieben ist.

Der Verdau chromosomaler DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Chromosomale DNA wurde in einer Menge von ca. 1 µg DNA verdaut und für Southern Blot-Analysen eingesetzt. Um einen möglichst vollständigen Verdau zu erhalten, wurde die Reaktion 6-8 h inkubiert.

Analytische Restriktionsanalysen, welche hauptsächlich zur Kontrolle rekombinanter Plasmide erfolgten, wurden ebenfalls in einem Volumen von 20 µl unter Einsatz von ca. 1 µg DNA durchgeführt. Dabei wurde maximal 1/10 Volumen des Gesamtansatzes an Restriktionsenzym zugesetzt, da eine zu große Menge an Glycerin, in welchem die Enzyme gelagert werden, die Restriktion beeinträchtigen kann. Die Inkubation erstreckte sich über 1-3 h, teilweise auch über Nacht. Um die RNA im Ansatz zu verdauen wurden 2 µl einer 1:200 verdünnten RNase- Stammlösung (10 mg/ml) zugeben. Zur Kontrolle wurde der Verdau auf ein Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Für präparative Verdaus, z.B. zur Linearisierung von Plasmid- DNA oder zum Verdau von PCR-Fragmenten, wurden größere Mengen an DNA eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug hierbei 50 µl bei einer DNA- Menge von 8-10 µg. Zur Restriktion wurden zunächst 1,5 µl Enzym zugesetzt und der Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte eine erneute Zugabe von 1,5 µl Enzym und eine weitere Inkubation für 2 h bei 37 °C.

12.2. Dephosphorylierung mit CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)

Die Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) ist in der Lage endständige 5'-Phosphatgruppen von DNA, RNA und Nukleotiden abzuspalten. Die Dephosphorylierung verhindert in Ligationsansätzen die Religation von Vektoren. Somit wird die Wahrscheinlichkeit des Einbaus des Inserts in den Vektor erhöht und die Ligation effizienter.

Nach erfolgter Restriktion eines Vektors wurde dem Ansatz 1 µl CIAP (1 U/µl) zugegeben. Der für die Restriktion verwendete Puffer wurde dabei auch für die Dephosphorylierungs-reaktion der CIAP eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der CIAP durch zweimalige Phenol/Chloroform- Extraktion und Konzentrierung der geschnittenen und dephosphorylierten DNA mittels Ethanolfällung.

12.3. Ligation und Dialyse

In dieser Arbeit wurde mit der T4-Ligase (Fermentas) ligiert. Dieses Enzym ist in der Lage, unter Verbrauch von ATP doppelsträngige DNA durch Ausbildung von Phosphodiester-bindungen zwischen einer freien 3'-OH- und einer freien 5'-Phosphat- Gruppe zu verknüpfen. Zur Ligation des dephosphorylierten Vektors mit dem Insert betrug das Gesamtvolumen 20 µl. Dabei wurde die Vektor- DNA und die Insert- DNA in einem Mengenverhältnis von ungefähr 1:3 eingesetzt. Zusätzlich wurden dem Ansatz 2 µl 10 x Reaktionspuffer und 1 µl T4-Ligase (1 U/µl) zugegeben und bei 16 °C inkubiert.
Zur Entfernung von Elektrolyten wurde der Ansatz am nächsten Tag für 30 min auf einen Mikroporefilter aufgetragen und gegen A. bidest dialysiert. Zur Lagerung kann der Ligationsansatz bei -20 °C eingefroren werden.

13. Transformation durch Elektroporation

13.1. Herstellung kompetenter *E. coli*- Zellen

Um *E. coli* für DNA aufnahmefähig zu machen, müssen die Zellen speziell vorbereitet werden, da keine natürliche Kompetenz dieser Bakterien vorliegt. Dabei liegt dem in dieser Arbeit verwendetem Verfahren zu Grunde, dass die Salzkonzentrationen in der Zellhülle verringert werden.
Hierzu wurden 250 ml LB- Medium im 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit 1 ml einer *E. coli* ÜN- Kultur angeimpft und bei 37 °C auf dem Rotationsschüttler bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD_{600nm} = 0,8 gezüchtet. Bei Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurden die Bakterien für 30 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 15 min bei 4 °C und 5000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet in einem Volumen von 250 ml eiskaltem A. bidest suspendiert. Nach erneuter 15- minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm erfolgte die Aufnahme des Pellets in 125 ml eiskaltem A. bidest. Anschließend wurde ein weiterer Waschschritt mit 25 ml 10 % (v/v) eiskaltem Glycerin durchgeführt. Das Pellet wurde schließlich in 500 µl 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und zur weiteren Verwendung in 50 µl Aliquots bei -70 °C gelagert.

13.2. Herstellung kompetenter *S. agalactiae*- Zellen

Streptococcus agalactiae weist ebenfalls keine natürliche Kompetenz auf und wurde in dieser Arbeit, ähnlich wie für *E. coli* beschrieben, für die Aufnahme von DNA vorbereitet. Hierfür wurden 500 µl einer *S. agalactiae* ÜN- Kultur in 50 ml THY- Medium im Erlenmeyerkolben ohne Schikanen angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600\ nm}$ = 0,4 kultiviert. Die Zellen wurden danach für 15 min bei 4 °C und 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 50 ml 10 % (v/v) Glycerin suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm wurden mehrere Waschschritte mit variierenden Mengen (25 ml, 12,5 ml und 6,25 ml) 10 % (v/v) Glycerin durchgeführt. Der letzte Waschschritt erfolgte durch Aufnahme des Pellets in 1 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin und Überführen in ein Eppendorf- Reaktionsgefäß. Anschließend wurden die Zellen mit 14000 rpm für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Aufnahme des Pellets erfolgte in einem dem Eigenvolumen entsprechenden Volumen an 20 % (v/v) Glycerin. Die Lagerung erfolgt in 25 µl Aliquots bei -70 °C.

13.3. Elektroporation von DNA in *E. coli*

Die Methode wurde erstmal durch Harlander und McKay (1984) beschrieben und in modifizierter Form in dieser Arbeit eingesetzt. Das Prinzip der Methode basiert darauf, dass die Membran der Zellen kurzzeitig durch Anlegen eines elektrischen Pulses hoher Feldstärke poröser und damit aufnahmefähiger für fremde DNA gemacht wird. Die Durchführung erfolgte nach Calvin und Hanawalt (1988).

Hierzu wurden 50 µl kompetente *E. coli*- Zellen auf Eis aufgetaut und in einer sterilen, vorgekühlten 0,2 cm Elektroporationsküvette mit 1-5 µl Plasmid- DNA oder 5-10 µl eines

dialysierten Ligationsansatzes vermengt. Bei einer Spannung von 2500 V, einem Widerstand von 200 Ω, einer Kapazität von 25 µF und einer Zeitkonstanten von 4,5-5 sec erfolgte die Pulsgabe. Nach der Transformation wurden die Bakterien in 300-500 µl LB- Medium aufgenommen und zur Regeneration für 40 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl bzw. 200 µl der transformierten *E. coli*- Zellen auf LB- Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

13.4. Elektroporation von DNA in *S. agalactiae*

Für die Transformation wurden 25 µl kompetente *S. agalactiae* – Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte eine Verdünnung mit 25 µl 10 % (v/v) eiskaltem Glycerin. Die so verdünnten Zellen wurden mit 10 µl Midipräp- Plasmid- DNA in einer vorgekühlten 0,1 cm Elektroporationsküvette vermischt. Die Pulsgabe erfolgte bei 1800 V, 25 µF und 329 Ω. Die transformierten Zellen wurden in 300 µl THY- Medium suspendiert und zur Regeneration für 2 h bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert.
Nach dieser Zeit wurden 100 µl bzw. 200 µl der transformierten Zellen auf THY- Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert.

14. Proteinchemische Arbeiten

14.1. Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli* und deren Aufreinigung

14.1.1. Herstellung von Maltose- binde Protein gekoppelten Fusionsproteinen

In dieser Arbeit wurde das Rgg3- Protein gekoppelt an ein abspaltbares Maltose- bindendes Protein rekombinant hergestellt und über eine Amylose- Säule aufgereinigt. Als Produktionsstamm wurde *E. coli* TG1 verwendet.
Aus einer ÜN- Kultur (4 x 5 ml LB + 0,2 % Glucose + Ampicillin) wurden 4 x 250 ml LB- Medium (+ 0,2 % Glucose + Ampicillin) in 4 x 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen angeimpft, bei 37 °C auf dem Rotationsschüttler kultiviert und bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,8 die Produktion des Fusionsproteins mit 1 mM IPTG induziert. Nach einem Wachstum von 2 Stunden bei 37 °C erfolgte die Zellernte durch Abzentrifugieren der Kultur

bei 5000 rpm für 10 min bei 4 °C. Anschließend wurde das Pellet bei -20 °C über Nacht eingefroren.

Die zur Isolierung und Aufreinigung verwendeten Lösungen sind im Folgenden dargestellt:

Column Puffer

20 ml 1 M Tris- HCl pH7,4

11,7 g NaCl

2 ml 0,5 M EDTA

Ad 1000 ml A. dest.

Elutionspuffer

Column Puffer

+ 10 mM Maltose

Das Pellet wurde auf Eis aufgetaut, in 10 ml Column Puffer suspendiert und mittels 2-3-maligem Durchlauf mit der French Press aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren mit 5000 rpm bei 4 °C für 10 min wurde der Überstand in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 1:4 mit Column Puffer verdünnt. In der Zwischenzeit wurde eine Säule mit 2 ml Amylose- Resin gefüllt und mit 20 ml Column Puffer äquilibriert. Das Maltose- binde Protein bindet an die Amylose und kann durch Verdrängung mit Maltose von der Säule eluiert werden. Nach dem der Zellextrakt auf die Säule geladen wurde erfolgte ein Waschschritt mit 50 ml Column Puffer. Anschließend wurde das Rgg3- Fusionsprotein mit 5 x 1 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert.

14.1.2. Herstellung von HisTag- Fusionsproteinen

Das in dieser Arbeit hergestellte Fusionsprotein RogB2 trägt an seinem C- terminalen Ende einen Hexahistidin- Rest (HisTag), was die Aufreinigung über eine Ni^{2+}-NTA- Säule ermöglicht. Die Synthese der Proteine erfolgte in *E. coli* ER2566, der im Chromosom das Gen für die T7-RNA- Polymerase trägt, welches unter transkriptioneller Kontrolle des LacI-Repressors steht. Unter Zugabe des künstlichen Induktors IPTG wird die Repression des T7-Polymerasegens aufgehoben und entsprechend die T7- RNA- Polymerase gebildet. Die T7-Polymerase erlaubt ihrerseits die Transkription von Genen, die in das Expressionsplasmid pET28 kloniert worden waren.

Die Produktion des HisTag-Fusionsproteins erfolgte in einem Volumen von 6 x 250 ml TY-Medium in 6 x 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Nach einem Wachstum bei 28 °C auf

dem Rotationschüttler wurden die Kulturen nach 3 h mit 1 mM IPTG induziert und über Nacht bei 18 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und das Pellet mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Die pelletierten Zellen wurden bis zur Proteinisolierung bei -20 °C gelagert.

Im Folgenden sind die zur Isolierung und Aufreinigung der Proteine eingesetzten Lösungen aufgeführt:

Waschpuffer

NaH_2PO_4	6 g/l
NaCl	17,5 g/l
Imidazol	1,36 g/l
pH 8,0	

Elutionspuffer

NaH_2PO_4	6 g/l
NaCl	17,5 g/l
Imidazol	3,4 g/l
pH 8,0	

10 x Bindungspuffer

100 mM Tris- HCl pH7,5

10 mM EDTA

50 mM DTT (nach dem Autoklavieren zugeben)

50 % Glycerin

100 mM NaCl

10 mM $MgCl_2$

Der Zellaufschluss erfolgte mittels FrenchPress. Dazu wurden zunächst die pelletierten Zellen in 20 ml Waschpuffer suspendiert und je nach Bedarf 2-3- mal durch die große Zelle der FrenchPress- Apparatur aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer vom cytoplasmatischen Extrakt zu trennen. Anschließend wurde der Überstand in Eppendorf-Gefäße überführt und erneut für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde eine Säule mit 1-2 ml Ni^{2+}-NTA -Agarose gefüllt und mit 30 ml Waschpuffer äquilibriert. Ni^{2+} bildet einen Komplex mit dem Imidazolring des Histidins, wodurch HisTag- tragende Fusionsproteine gebunden werden. Die Proteine können durch Einsatz höherer Konzentrationen an Imidazol wieder von der Säule eluiert werden.

Nach der Zentrifugation wurde der nun klare Überstand auf die Säule gegeben und die Säule im Anschluss 4 x mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der HisTag- Proteine durch Zugabe von 2,5 ml Elutionspuffer.
Zur Beseitigung des Imidazols wurde das HisTag- Fusionsprotein über eine PD10- Säule aufgereinigt. Dabei wird das Imidazol nach dem Prinzip der Gelfiltration von dem Fusionsprotein getrennt. In dieser Arbeit wurde die PD10- Säule zunächst mit 25 ml 1 x Bindungspuffer äquilibriert und anschließend 2,5 ml Eluat geladen. Nach Elution mit 3,5 ml 1 x Bindungspuffer wird die Säule mit 25 ml 1 x Bindungspuffer gewaschen und kann durch Lagerung in 20 % Ethanol erneut verwendet werden. Die Lagerung des RogB2-Fusionsproteins erfolgte bei 4 °C.

14.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die nach M.M. Bradford benannte und 1976 veröffentlichte Methode zur photometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen beruht auf der Verschiebung des Absorptions-maximums des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G250 von 465 nm auf 595 nm in Anwesenheit von Proteinen im sauren Milieu. Dabei werden Protein- Farbstoff- Komplexe ausgebildet, wobei Coomassie Brilliantblau G250 vor allem mit Arginin in Wechselwirkung tritt. Aber auch unspezifische Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und kationischen, sowie hydrophoben Seitenketten treten auf. Durch diese Komplexbildung wird der Farbstoff stabilisiert, so dass dies letztendlich in einem Farbumschlag resultiert. Die Intensität der Farbverschiebung ist dabei abhängig von der Konzentration der vorhandenen Proteine.
Durch Erstellen einer Kalibriergeraden mit BSA- (Bovine Serum Albumin) Lösungen bekannter Konzentration können Proteinkonzentrationen in verschiedenen Proben bestimmt werden.
Im Folgenden ist die Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten Bradford-Reagenz aufgelistet:

5 x Bradford- Reagenz

0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250

4,8 % (v/v) Ethanol (96 %)

8,6 % (v/v) H_3PO_4 (86 %)

Die Kalibriergerade wurde mit einer BSA-Stammlösung (100 µg/ml) im Bereich 0-20 ng/ml erstellt. Hierbei wurden 800 µl geeignete Verdünnungen der BSA- Stammlösung mit 200 µl 5 x Bradford-Reagenz gut gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde anschließend bei 595 nm bestimmt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den unterschiedlichen Proben wurden verschiedene Verdünnungen der Extrakte in einem Gesamtvolumen von 800 µl erstellt und nach Zugabe von 200 µl 5 x Bradford- Reagenz die Ansätze ebenfalls für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde deren Extinktion bei 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration der zu bestimmenden Probe wurde anhand der Kalibriergeraden unter Einberechnung der Verdünnungsfaktoren ermittelt.

14.3. Auftrennung von Proteinen über diskontinuierliche SDS- PAGE

Die Herstellung von Polyacrylamidgelen beruht auf der Vernetzung von Acrylamidmonomeren mit Methylbisacrylamid. Die Porengröße wird dabei durch die Konzentration an Acrylamid beeinflusst.

Die diskontinuierliche SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld unter denaturierenden Bedingungen. Dabei lagert sich das anionische Detergenz SDS (Sodium- Dodecyl- Sulfat) so in die Proteine ein, dass deren Eigenladung überdeckt wird. Die Ladung der einzelnen Proteine ist dabei proportional zu ihrer Masse. Die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld erfolgt in Abhängigkeit von der molaren Masse der Proteine und der Porengröße des Polyacrylamid- Gels zur Anode.

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird ein nach Laemmli eingeführtes SDS- haltiges Tris-HCl/Tris- Glycin- Puffersystem eingesetzt, was sich wie folgt zusammensetzt:

5 x SDS- Probenpuffer

250 mM Tris/ HCl (pH 6,8)

500 mM DTT

10 % (w/v) SDS

50 % (v/v) Glycerin

Spatelspitze Bromphenolblau

10 x SDS-Laufpuffer

250 mM Tris

2,5 M Glycin

1 % (w/v) SDS

Trenngelpuffer	**Sammelgelpuffer**
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	1 M Tris/HCl (pH 6,8)

In dieser Arbeit wurden zur Auftrennung von Proteinen 10 und 12 %ige Trenngele verwendet. Die Zusammensetzung eines solchen Gels ist in **Tabelle 3** aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Gellösungen für die denaturierende SDS-PAGE von Proteinen (Volumina bezogen auf ein Gel)

	Trenngel (10 %)	**Trenngel (12 %)**	**Sammelgel**
A. dest	4,0 ml	3,7 ml	2,1 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	3,3 ml	4 ml	0,5 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	-------
Sammelgelpuffer	-------		0,38 ml
10 % (w/v) SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,03 ml
10 % (w/v) APS	0,1 ml	0,1 ml	0,03 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	0,003 ml

Zunächst wurden die Gelplatten (70 x 60 x 1 mm) mit 100 % Ethanol fettfrei geputzt und laut Anleitung in die Gelgießvorrichtung eingespannt. Anschließend wurde das Trenngel gegossen und für ungefähr 45 min auspolymerisiert. Im Anschluss daran wurde das Sammelgel gegossen und noch im flüssigen Zustand der Kamm eingesetzt. Nach ca. 45 min Polymerisationszeit wurde das Gel mit den Platten in ein Minigelsystem (Peqlab) eingespannt, mit 1 x SDS- Laufpuffer überschichtet und vorsichtig der Kamm gezogen. Anschließend wurden die Proben aufgetragen.

Zur Auftragung von Zellextrakt wurde das abzentrifugierte Zellpellet (13000 rpm, 5 min, RT) aus 1 ml Kultur in 100 µl 1 x SDS- Probenpuffer gelöst und bei 95 °C aufgekocht.

Gereinigte Proteine wurden mit 1/5 Volumen 5 x SDS- Probenpuffer versetzt und ebenfalls bei 95 °C für 5 min gekocht. Der Gellauf erfolgte bei 16 mA.

14.4. Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen mittels Coomassie- Färbung

Mit Hilfe der Coomassie- Färbung ist es möglich, Proteine ab einer Menge von 100-300 ng pro Bande im Polyacrylamidgel nachzuweisen.

Fixierlösung

25 % (v/v) Isopropanol
10 % (v/v) Essigsäure
Ad A. dest.

Coomassie- Färbelösung

0,006 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250
10 % (v/v) Isopropanol
ad A. dest.

Entfärbelösung

10 % (v/v) Eisessig

Nach dem Gellauf wurde das Polyacrylamidgel für 1 h in Fixierlösung gelegt und anschließend mit Coomassie Färbelösung für mindestens 2 h oder über Nacht inkubiert. Zur Entfärbung wurde das Gel in Entfärberlösung transferiert. Zur längeren Lagerung wurden Coomassie- gefärbte Gele zwischen Folie eingeschweißt.

15. Western Blot- Analyse

15.1. Semidry Elektroblot

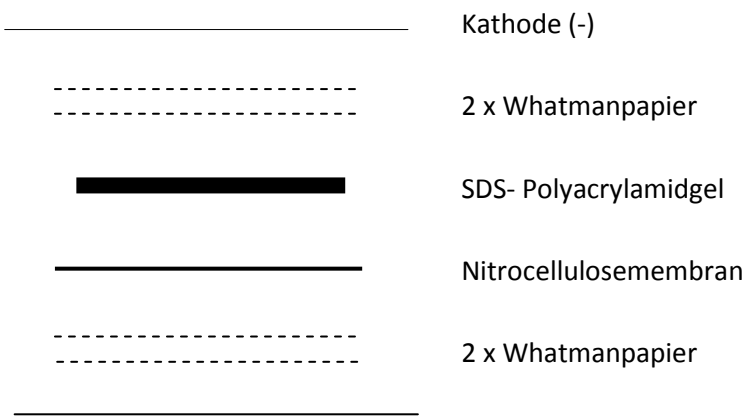
In dieser Arbeit wurde die Methode des Western Blots nach Towbin et al (1979) durchgeführt. Hierbei werden Proteine zunächst über eine SDS- PAGE getrennt und durch Anlegen einer Spannung in einer dafür vorgesehenen Apparatur auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern.

Für den Transfer wurden folgende Lösungen verwendet:

Semidry- Transferpuffer

Tris	5,8 g/l
Glycin	2,9 g/l
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,38 % (w/v)

Nach Auftrennung der Proteine über eine SDS-PAGE erfolgte die Äquilibration des Gel für 10-30 min in Semidry-Transferpuffer Der Elektroblot wurde in der dafür vorgesehenen Apparatur wie folgt aufgebaut:



Dabei war darauf zu achten, dass in Semidry- Transferpuffer getränktes Whatmanpapier, Gel und Membran jeweils möglichst luftblasenfrei aufeinander gelegt wurden, um an jeder Stelle einen gleichmäßigen Stromfluss zu gewährleisten. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm^2 Gel für 1,5 h durchgeführt.

15.2. Western Blot- Analyse

Mit Hilfe der Western Blot- Analyse lassen sich Proteine, welche auf eine Membran transferiert wurden mit spezifischen Antikörpern nachweisen und quantifizieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen sind im Folgenden aufgelistet:

1 x Western Blot- PBS

NaH_2PO_4	1,8 g/l
Na_2HPO_4	12 g/l
NaCl	5,8 g/l

1 x PBST

Tween 20	0,05 % (v/v in 1 x PBS)

Nachweis von Mbp- und HisTag- Fusionsproteinen

Nach dem Elektroblotten wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht in 1 % Blockingreagenz (w/v in 1 x PBS) zum Blocken unspezifischer Bindungen auf der Membran inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran zunächst dreimal mit 1 x Western- PBS gewaschen und anschließend der Erstantikörper (Anti- Mbp- Antiserum; 1:10000 in 1 x Western Blot- PBS oder Anti- Histag- Antikörper; 1:250 in 1 % (w/v) Blockingreagenz) zugegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers (Anti- Kaninchen- IgG, 1:1000 ins 1 x Western Blot- PBS oder Anti- Maus- Fab- Fragment; 1:10000 in 1 % (w/v) Blockingreagenz). Die Inkubation der Antikörper erfolgte jeweils für 1 h. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper folgten mehrere Waschschritte (2 x 5 min mit 1 x PBS; 1 x 5 min mit PBST, 2 x 5 min mit 1 x PBS). Die sich nun anschließende Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte über Chemilumineszenz. Der zweite Antikörper ist mit dem Enzym Meerrettich- Peroxidase (HPR) gekoppelt. Dieses setzt das in dem verwendeten ECL-Kit (GE Healthcare) enthaltene Luminol zu 3-Aminonaphthalat unter Lichtemission um. Die Membran wurde zwischen zwei Kopierfolien gelegt und die Banden durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

16. Bestimmung von Protein- DNA- Interaktionen mittels `Electrophoretic mobility shift assays´ (EMSA)

Die direkte Interaktion von Proteinen mit doppelsträngiger DNA wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten, sog. EMSAs (Electrophoretic mobility shift assays) oder Bandshifts analysiert (Lucht et al, 1994; Neurath, 1997). Hierbei werden Proteine in aufsteigender Konzentration mit DNA- Fragmenten inkubiert, auf ein Agarosegel aufgetragen und die Retardation im Vergleich zu Proben ohne Protein gemessen. Dabei wandern Protein-DNA- Komplexe mit geringerer Geschwindigkeit als freie DNA.

Für die Durchführung der EMSAs wurden folgende Lösungen verwendet:

10 x Bindungspuffer

100 mM Tris- HCl pH7,5

10 mM EDTA

50 mM DTT (nach dem Autoklavieren zugeben)

50 % Glycerin

100 mM NaCl

10 mM $MgCl_2$

Für die Experimente wurden DNA- Sonden mittels PCR aus chromosomaler DNA von *S. agalactiae* amplifiziert und mit dem NucleoSpin™ Kit aufgereinigt. Die Konzentration des zu untersuchenden Proteins wurden mittels Bradford bestimmt und die benötigten Proteinverdünnungen mit 1 x Bindungspuffer hergestellt. Dabei wurde der im Folgenden beschriebene Versuchsansatz gewählt:

2 µl DNA- Sonde

X µl Proteinverdünnung

2 µl 10 x Bindungspuffer

0,5 µl Poly(dI-dC) (2 µg/µl)

ad 20 µl A. dest.

Die Inkubation der Sonde mit dem Protein erfolgte für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Proben auf ein 2 %iges Agarosegel geladen und die Retardation nach Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

17. Herstellung definierter Deletionsmutanten in *S. agalactiae*

17.1. Cross-over PCR

Die angrenzenden Regionen der zu deletierenden Gene wurden mittels zwei Standard- PCR-Ansätzen amplifiziert. Die Primer für die beiden PCR- Ansätze wurden so gewählt, dass die jeweils innen liegenden Primer komplementäre Sequenzen aufweisen, wodurch eine anschließende Cross-over- PCR mit den beiden außen liegenden Primern und den beiden PCR- Produkten als Matrize möglich war. Das somit entstandene Produkt enthielt die flankierenden Sequenzen der zu deletierenden Gene.

Im Folgenden ist der Cross-over- PCR Ansatz aufgelistet:

5 µl 10 x *Taq*- Polymerase- Puffer
2,5 µl $MgCl_2$ (25 mM)
5 µl dNTP´s (je 2 mM)
5 µl PCR- Amplifikat 1 (1:10)
5 µl PCR- Amplifikat 2 (1:10)
1 µl Primer 1 (10 pmol)
1 µl Primer 4 (10 pmol)
1 µl *Taq*- Polymerase (1 U/µl)
ad 50 µl A. dest

Die so erhaltenen Amplifikate wurden mit Restriktionsenzymen verdaut und in den mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pG^+host6 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5α transformiert.

17.2. Herstellung definierter Deletionsmutanten

Das verwendete Plasmid pG^+host6 und die in dieser Arbeit konstruierten Deletionsplasmide pGΔ*rgg3*, pGΔ*rogB3* und pGΔ*fbsB4* enthalten den temperatursensiblen Replikationsursprung pWV01ts, der wie folgt zur Konstruktion von Deletionsmutanten genutzt wurde:
Das Deletionsplasmid wurde zunächst in *S. agalactiae* transformiert und Transformanten bei 30 °C auf Blut- Agarplatten mit Erythromycin für 3 Tage selektioniert.

Von den gewachsenen Klonen wurde 5 ml THY- Flüssigmedium mit Erythromycin angeimpft und die Kultur über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der ÜN- Kultur 1 ml Suspension entnommen und diese dreimal mit 1 ml sterilem THY- Medium gewaschen, um das noch vorhandene Erythromycin zu entfernen. Das Bakterienpellet wurde dann in 200 µl sterilem THY- Medium resuspendiert und zum Animpfen von 5 ml THY- Flüssigmedium verwendet. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 30 °C wurden die Kulturen einem Temperaturshift unterzogen und für weitere 2,5 h bei 39 °C inkubiert. Durch die Erhöhung der Temperatur auf 39 °C kann das temperatursensible Plasmid nicht mehr replizieren. Anschließend wurden je 100 µl einer 1:10 Verdünnung der Bakterienkultur auf Erythromycin- haltigen Platten ausplattiert und bei 39 °C inkubiert. Durch den vorhandenen Antibiotikum- Selektionsdruck konnten lediglich solche Zellen wachsen, welche durch homologe Rekombination das Plasmid ins Chromosom integriert trugen. Von den erhaltenen Kolonien wurden THY- Flüssigkulturen mit Erythromycin angeimpft und diese erneut bei 39 °C inkubiert. Von diesen ÜN- Kulturen wurde je 1 ml bei 13000 rpm und RT abzentrifugiert und dreimal mit 1 ml sterilem THY- Medium gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl sterilem THY- Medium aufgenommen.

Es wurden je 10 µl des resuspendierten Pellets in 6 Röhrchen mit THY- Medium angeimpft und diese bei 30 °C ÜN inkubiert. Anschließend wurden an 10 Tagen jeweils morgens und abends 10 µl der Kultur in 6 neue Röhrchen mit THY überimpft und bei 30 °C inkubiert. Ziel dieser Passage ist es, Klone zu erhalten, in denen das bei 30 °C zur Replikation fähige Plasmid bei fehlendem Selektionsdruck über homologe Rekombination aus dem Chromosom verloren wurde. Da Stämme mit chromosomal vorliegendem Plasmid bei einer Wachstumstemperatur von 30 °C zwei funktionsfähige Replikationsursprünge besitzen, die sich in ihrer Aktivität gegenseitig behindern, weisen solche Stämme, die das Plasmid durch eine zweite Rekombination aus dem Chromosom verloren haben, einen Wachstumsvorteil auf. Im Anschluss an die Passage wurden von den jeweiligen Ansätzen 100 µl der Verdünnungen 10^{-9}, 10^{-8} und 10^{-7} auf THY- Agarplatten ohne Antibiotikum ausplattiert und bei 39 °C inkubiert. Zur Kontrolle des Verlustes des Plasmids, der mit einem Verlust der Antibiotika- Resistenz einhergeht, wurden pro Ansatz 50 Kolonien auf THY- Platten ohne Erythromycin und auf THY- Platten mit Erythromycin übertragen. Diejenigen Kolonien die ihre Antibiotikaresistenz verloren hatten, wurden zur Isolierung von chromosomaler DNA herangezogen und über PCR auf den Verlust des jeweiligen Gens getestet.

18. Adhärenz und Invasion

Die Adhärenz an eukaryotische Zellen stellt ein initiales Ereignis in der Infektionskaskade von pathogenen Bakterien dar. Zur weiteren Ausbreitung in Gewebe und Blutbahn müssen Zellbarrieren überwunden werden. Aus diesem Grund stellen die Adhärenz und Invasion wichtige Parameter für die Virulenz eines Bakteriums dar.
In dieser Arbeit wurde die Adhärenz und Invasion verschiedender *S. agalactiae*- Stämme an und in die eukaryotische Lungenepithelzelllinien A549 und die Rachenepithelzelllinie HEp2 untersucht.

18.1. Vorbereitung der eukaryotischen Zellen für Adhärenz- und Invasionsversuche

Die konfluent gewachsenen eukaryotischen Epithelzellen wurden in 24- Well Platten mit einer Zellzahl von 3 x 10^5-Zellen/Well ausgesät. Zunächst wurden die Zellen in der Kulturflasche einmal mit 10 ml PBS (siehe Abschnitt 4.3.) gewaschen und mit 1,5 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C für 5 min von der Flasche gelöst. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml Zellkulturmedium überführt und bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml Zellkulturmedium aufgenommen und 50 µl davon für die Lebendzellzahlbestimmung entnommen. Hierzu wurden die Zellen mit gleichem Volumen Trypanblau versetzt und mikroskopisch deren Lebendzellzahl in der Neubauer- Zählkammer bestimmt.

Die verwendete Trypanblaulösung setzt sich wie folgt zusammen:

Trypanblaulösung:

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

→ Die Lösung wurde über einen 0,2 µm Sterilfilter sterilfiltriert.

Da sich Trypanblau nur in membrangeschädigte Zellen einlagert, konnte mikroskopisch zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden.

Zur Zellzahlbestimmung wurde aus vier Großquadraten die Lebendzellzahl bestimmt und über den Verdünnungsfaktor der Neubauer- Zählkammer die Zellzahl/ml bestimmt. Die Zellen wurden auf eine Lebendzellzahl von 3 x 10^5 Zellen/ml mit Zellkulturmedium verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden pro Stamm je drei Wells für Adhärenz- bzw. Invasionsversuche in 24-Well- Platten angeimpft und die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

18.2. Vorbereitung der Bakterienstämme für Adhärenz- und Invasionsversuche

Die untersuchten *S. agalactiae*- Stämme wurden ÜN bei 37 °C in 5 ml THY- Medium inkubiert. Anschließend wurden 3 ml dieser ÜN- Kultur bei 8000 rpm und RT für 5 min abzentrifugiert und das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurde das Pellet in 1 ml Zellkulturmedium suspendiert und der Ansatz für 3 x 5 min stark gevortext, um die Kettenformation der Streptokokken zu brechen. Die so behandelten Zellen wurden auf eine optische Dichte $OD_{600\ nm}$ = 0,65 in Zellkulturmedium eingestellt, anschließend 1:10 in Zellkulturmedium verdünnt und 3 x 5 min stark gevortext.
Zur Bestimmung der Ausgangszellzahl an Bakterien wurden je 3 Wells einer 24- Well- Platte, in denen sich ausdifferenzierte eukaryotische Zellen befunden haben, mit 900 µl Medium und 100 µl der 1:10 verdünnten Bakterienkultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte anschließend über 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2. Von diesen Ansätzen wurden anschließend Verdünnungsreihen in LB- Medium erstellt und je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-5} bzw. 10^{-4} auf THY- Agarplatten ohne Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

18.3. Adhärenztest

Zunächst wurde das Medium der über Nacht konfluent gewachsenen Zellen vorsichtig abgezogen und die Zellen in 900 µl neuem Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden pro Well 100 µl der 1:10 verdünnten *S. agalactiae*- Zellen zugegeben und bei 37 °C und 5 % CO_2 für 2 h inkubiert. Nach 2 h Inkubation wurde erneut das Medium vorsichtig abgezogen und jedes Well 3 x mit PBS gewaschen. Damit wird bezweckt, dass alle nicht adhärierten Bakterienzellen aus dem Ansatz gewaschen werden. Im Anschluss daran wurden

20 µl Trypsin/EDTA zugegeben und der Ansatz bei 37 °C für 5-10 min inkubiert. Dabei wurden die eukaryotischen Zellen von den Wells gelöst. Die Lyse der eukaryotischen Zellen erfolgte unter Zugabe von 400 µl A. bidest/Well. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in ein Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gestellt, um weiteres Bakterienwachstum zu verhindern. Die Zellen wurden 3 x 5 sec stark gevortext. Zur Bestimmung der Zahl der adhärierten Bakterien wurden Verdünnungsreihen in LB- Medium angelegt, je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-4} und 10^{-3} auf THY- Agarplatten ohne Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
Dabei wurden unter den angegebenen Bedingungen sowohl die adhärenten als auch die invasiven Zellen erfasst.

18.4. Invasionstest

Zunächst wurde das Medium der ÜN gewachsenen Epithelzellen vorsichtig abgezogen und durch 900 µl neues Zellkulturmedium ersetzt. Anschließend wurden pro Well 100 µl der 1:10 verdünnten Bakterien zugegeben. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 2 h wurde das Medium erneut von den Zellen abgezogen und 1 ml frisches Medium, welches mit 10 U/ml Penicillin und 0,01 mg/ml Streptomycin versetzt worden war, zugegeben. Die Inkubation in Antibiotika- haltigem Medium erfolgte für 2,5 h um extrazellulär und somit nicht invadierte Bakterien abzutöten. Nach dieser Zeit wurde das Medium entfernt und die Wells 2 x mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von 20 µl Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C von den Wells gelöst. Die eukaryotischen Zellen wurden durch Zugabe von 400 µl A. bidest lysiert, der Ansatz anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gestellt. Für die Bestimmung der intrazellulären Zellzahl wurden Verdünnungsstufen in LB- Medium hergestellt und je 100 µl der 10^{-1} und 10^{0} Verdünnung auf THY- Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.
Unter den genannten Bedingungen wurden ausschließlich intrazelluläre Bakterien erfasst.

18.5. Auswertung

Die Zahl der adhärenten bzw. invadierten Bakterien wurde über die CFU (`Colony Forming Units´) pro THY- Agarplatte unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen bestimmt.
Zusätzlich wurden die erhaltenen Werte mit dem Faktor 4,2 multipliziert, um die Verdünnung der Bakterien zu berücksichtigen, die durch das Ablösen und Lysieren der eukaryotischen Zellen erfolgte. Anschließend wurde die Anzahl der adhärenten bzw. invasiven Bakterien auf die Gesamtzahl der im Versuch vorhandenen Bakterien (Lebendzellzahlbestimmung) bezogen. Der Invasionsindex stellt die Anzahl der invasiven Bakterien in Bezug auf die Anzahl adhärenter Zellen dar. Insgesamt wurden Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gebildet.

19. Bindung FITC- markierter Bakterien an immobilisiertes Fibrinogen

Mit Hilfe der Markierung von Bakterien mit FITC- (Fluoresceinisothiocyanat) können Bindungsstudien durchgeführt und am Cytofluor ausgewertet werden. Die in dieser Arbeit für die Bindungsstudien verwendeten Lösungen sind im Folgenden aufgelistet:

PBS

NaH_2PO_4	1,43 g/l
Na_2HPO_4	12,5 g/l
NaCl	5,84 g/l

PBST

Tween 20	0,05 % (v/v in PBS)

Natriumbicarbonatpuffer (100 mM)

0,1 M $NaHCO_3$	34 ml
0,1 M Na_2CO_3	5,5 ml
NaCl	230 mg
pH 9,2	

Fluoresceinisothiocyanat-Lösung (immer frisch ansetzen, dunkel halten)

1 mg/ml FITC in Natriumbicarbonatpuffer

Zunächst wurden pro Well 10 µl Fibrinogen (1 µg/10 µl in PBS) in Terasaki- Platten (96- well Platten) immobilisiert und über Nacht bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Für jeden zu testenden Keim wurden insgesamt 4 Wells mit Fibrinogen beschichtet. Am Folgetag wurden 3 ml einer 5 ml *S. agalactiae*- ÜN- Kultur bei 8000 rpm für 5 min bei RT abzentrifugiert und das Pellet einmal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl FITC- Lösung aufgenommen und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dabei lagert sich das FITC unspezifisch in bakterielle Oberflächenstrukturen ein. Nach 20 min wurden die Bakterien bei 8000 rpm für 5 min abzentrifugiert und zur Entfernung von nicht gebundenem FITC solange mit je 1 ml 1 x PBS gewaschen bis der Überstand keine Gelbfärbung mehr aufwies. Das gewaschene Pellet wurde in 1 ml 1 x PBS resuspendiert und stark gevortext. Im Anschluss daran wurden die Bakterien auf eine $OD_{600\ nm}$ von 1 in 1 x PBS eingestellt.

Vor der Inkubation mit den Bakterien wurden die Terasaki- Platten zum Entfernen nicht gebundener Proteine mit 10 ml 1 x PBS gespült. Anschließend erfolgte zum Blocken freier Bindungsstellen die Zugabe von 10 µl 10 % BSA (w/v in PBS) pro Vertiefung und die Inkubation der Platte für 2 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Brutschrank.

Die Terasaki- Platte wurde anschließend zum Entfernen von ungebundenem BSA mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Danach wurden 10 µl der Bakteriensuspension pro Well zugegeben und die Platte in der feuchten Kammer bei 37 °C für 1 h inkubiert. Für die Bestimmung des 100 %- Wertes, der die Fluoreszenzmarkierung der in den Versuch eingesetzten Bakterien wiedergibt, wurden 500 µl der eingestellten Bakteriensuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß ebenfalls für 1 h in der feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde nach der Inkubation dreimal mit 10 ml 1 x PBST gewaschen und nach jedem Waschschritt kräftig ausgeklopft. Zur Bestimmung des 100 %- Wertes wurden die Bakterien in die Vertiefungen einer Terasaki- Platte pipettiert. Mittels eines Fluoreszenz-Messgeräts (Cytofluor, PerSeptive Biosystems) wurde die Menge der an immobilisiertes Fibrinogen gebundenen Bakterien sowie die Menge der in den Versuch eingesetzten Bakterien bestimmt. Der prozentuale Anteil der an die immobilisierten Proteine gebundenen Bakterien ermittelte sich aus dem Quotienten der an Fibrinogen gebundenen Bakterien und der in den Versuch eingesetzten Bakterien, multipliziert mit dem Faktor 100.

20. Expressionsanalysen mittels β- Galactosidase- Reportergenfusion

Durch das Enzym β- Galactosidase erfolgt die Spaltung des künstlichen, farblosen Substrats oNPG (o- Nitrophenyl- β- D- Galactosid) in Galactose und o-Nitrophenol, welches als gelber Farbstoff (A_{max} = 420 nm) photometrisch bestimmt werden kann. Durch genetische Verknüpfung der zu untersuchenden Promoterregion und des β- Galactosidase- Gens, kann die Aktivität des Promoters anhand der β- Galactosidase- Aktivität bestimmt werden.

Zur Bestimmung der β- Galactosidase- Aktivität wurden 60 ml THY- Medium im Erlenmeyerkolben ohne Schikanen mit 600 µl einer ÜN- Kultur der zu untersuchenden *S. agalactiae*- Stämme angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Im Abstand von 30 min wurde die O.D. $_{600\ nm}$ gemessen und 500 µl Probe zur Bestimmung β- Galactosidase- Aktivität in flüssigen Stickstoff überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte anschließend bei – 20 °C.

Die für die Bestimmung der β- Galactosidase- Aktivität benötigten Lösungen sind im Folgenden aufgelistet:

Z- Puffer

$Na_2H_2PO_4$	60 mM
NaH_2PO_4	40 mM
KCl	10 mM
$MgSO_4$	1 mM

➔ 0,2 g Mercaptoethanol auf 50 ml Z- Puffer geben

Na_2CO_3- Lösung

Na_2CO_3	1M

Permeabilitätspuffer

Ethanol	90 %
Toluol	10 %

oNPG- Lösung (stets frisch ansetzen)

4 mg/ml Z- Puffer

Für die Bestimmung der β- Galactosidase- Aktivität wurden die Proben auf Eis aufgetaut und 100 µl Probe mit Z- Puffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 50 µl Permeabilitätspuffer wurden die Proben 10 sec stark gevortext und für 5 min bei RT

inkubiert. Die Reaktion begann durch Zugabe von 200 µl oNPG- Lösung und wurde bei Eintreten einer leichten Gelbfärbung durch Zugabe von 500 µl Na_2CO_3 gestoppt. Dabei wurde die Reaktionszeit sekundengenau gestoppt und notiert. Nach Zentrifugation der Probe bei 5000 rpm für 5 min bei RT wurde die Extinktion des Überstandes bei O.D. $_{420\ nm}$ gemessen.

Die Enzymaktivität [Miller Units] berechnet sich folgendermaßen:

$$A = \frac{1000 \times O.D._{420\ nm}}{t \times V \times O.D._{600\ nm}}$$

A = Aktivität [Miller Units]

t = Reaktionszeit [min]

V = eingesetztes Probenvolumen [ml]

21. Immunogoldmarkierung von *S. agalactiae*

Mit Hilfe der Immunogoldmarkierung (Schubert, 2006) können Proteine, wie in dieser Arbeit das FbsA- Protein, spezifisch auf der Oberfläche von *S. agalactiae* elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

Die hierfür benötigten Lösungen sind im Folgenden dargestellt:

Blocking- Lösung:

1 % Kaninchen- Serum

1 % BSA

in 1 x Western Blot PBS (siehe 15.2.)

Blockingreagenz

1 % Blockingreagenz

in 1 x Western Blot PBS

Für die Goldmarkierung wurden 5 ml Übernachkultur bei 3000 rpm für 10 min bei RT abzentrifugiert. Nach dem Waschen mit 1 x Western Blot PBS erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 min. Das Pellet wurde in 100 µl PBS aufgenommen und je

10 µl der Streptokokken- Suspension in eine sterile Petrischale pipettiert. Anschließend wurde ein Kohle- beschichtetes Netzchen (= Grid, Sektion Elektronenmikroskopie der Universität Ulm) auf den Tropfen gelegt und für 5 min inkubiert. Die Fixierung der Bakterienzellen erfolgte nach Überführung des Grids auf 20 µl einer 2 %igen Paraformaldehydlösung (in PBS) und einer Inkubation für 5 min. Freie Bindestellen wurden durch Inkubation des Grids in 20 µl Blocking- Lösung für 1 min und in 20 µl Blockingreagenz für 30 min abgedeckt. Die Inkubation in 10 µl des Erstantikörpers (Anti- FbsA- Antikörper, 1/10 in Blocking- Lösung) erfolgte für 30 min bei RT. Nach sechsmaligem Überführen des Grids in je 20 µl Blocking- Lösung erfolgte die Inkubation des Grids in 10 µl Gold- markiertem Zweitantikörper (Anti- Maus- Antikörper, 1/10 in 1 % (w/v) BSA) für 30 min bei RT. Nach viermaligem Waschen mit je 100 µl PBS wurde die Probe mit Fixierlösung (4 % Glutaraldehyd + 2 % Paraformaldehyd in PBS) fixiert und in der Zentralen Einrichtung Elektronenmikroskopie der Universität Ulm kritisch- gefriergetrochnet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. P. Walther am Transmissionselektronenmikroskop in der Zentralen Einrichtung Elektronenmikroskopie der Universität Ulm angefertigt.

III. Ergebnisse

1. Charakterisierung des putativen Regulators Rgg3 aus *Streptococcus agalactiae*

1.1. Die *rgg3*- codierende Region in *Streptococcus agalactiae*

Die veröffentlichten Genomsequenzen von *Streptococcus agalactiae* (Glaser et al, 2002, Tettelin et al, 2002 und 2005) enthalten Gene, die für putative Transkriptionsregulatoren codieren. Das in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Gen aus *Streptococcus agalactiae* 6313 weist 100 % Identität zu dem Gen *gbs2117* aus *Streptococcus agalactiae* NEM316 (Glaser et al, 2002) auf, dessen Genprodukt Ähnlichkeit zu Vertretern der Rgg- Familie an Transkriptionsregulatoren aufweist. Aufgrund dieser Homologie und aufgrund des Vorhandenseins von zwei weiteren Rgg- ähnlicher Regulatoren (Samen et al, 2006) wurde *gbs2117* in *Streptococcus agalactiae* 6313 als *rgg3* bezeichnet.

Abbildung 1 zeigt die *rgg3*- codierende Region in *Streptococcus agalactiae* NEM316.

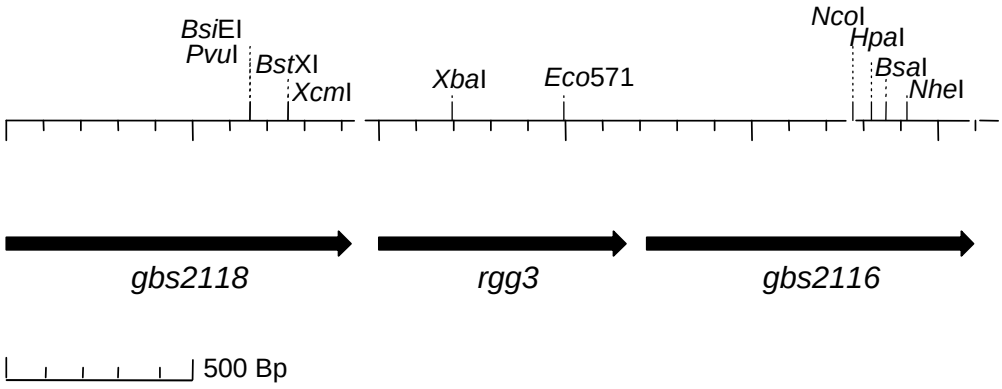


Abbildung 1: Restriktionskarte der *rgg3*- codierenden Region aus *S. agalactiae* NEM316

Das *rgg3*- Gen aus *S. agalactiae* 6313 (**Abbildung 1**) besitzt ein Größe von 660 Basenpaaren. Das resultierende Protein Rgg3 besteht aus 220 Aminosäuren und hat eine Masse von 24925 Da. Strukturanalysen mit Hilfe der Datenbank `Prosite´ (http://expasy.org/tools/scanprosite) ergaben ein vorhergesagtes Helix-turn-Helix- Motiv,

bestehend aus 56 Aminosäuren am N- terminalen Ende des Proteins. Mit Hilfe von Blast-Analysen konnte eine 100 %ige Übereinstimmung der Sequenz auf Aminosäureebene in vier der acht sequenzierten *S. agalactiae*-Stämme festgestellt werden.

Die Funktion der *rgg3*- flankierenden Gene *gbs2116* und *gbs2117* (**Abbildung 1**) ist bisher unbekannt. Datenbankanalysen zeigten, dass *gbs2116* für ein putatives transmembranes Protein und *gbs2118* für eine putative Inosin- Monophosphat- Dehydrogenase kodiert.

In weiteren Datenbankanalysen zeigte Rgg3 aus *S. agalactiae* 27 % Identität zu Rgg aus *Streptococcus pyogenes* (Lyon et al, 1998; Chaussee et al, 1999 und 2001 bis 2004; Neely et al, 2003; Beres et al, 2006; Hytönen et al, 2006), 26 % Identität zu Rgg aus *Streptococcus gordonii* (Sulavic et al, 1992 und 1996; Vickerman 1995), 22 % Identität zu Rgg aus *Streptococcus pneumoniae* (Hoskins et al, 2001), sowie 22 % Identität zu MutR aus *Streptococcus mutans* (Qi et al, 1999; Ajdic et al, 2002), der ebenfalls einen Transkriptionsregulator der Rgg- Familie darstellt. Da die Rgg- Proteine aus *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus gordonii* an der Regulation von Virulenzfaktoren bzw. des Metabolismus beteiligt sind, ist es von Interesse die Bedeutung von Rgg3 für die Virulenz von *S. agalactiae* näher zu charakterisieren.

1.2. Die Bedeutung von *rgg3* für die Virulenz von *Streptococcus agalactiae* 6313

Herstellung definierter *rgg3*- Deletionsmutanten

Um die Bedeutung von Rgg3 für die Virulenz von *S. agalactiae* 6313 zu charakterisieren, wurde zunächst das *rgg3*- Gen in *S. agalactiae* 6313 deletiert und anschließend durch Einbringen eines Plasmid codierten *rgg3*- Gens die Deletion komplementiert. Zur Herstellung des Deletionsplasmides wurden zunächst die flankierenden Bereiche des *rgg3*- Gens mit den Primerpaaren rgg3_del1/rgg3_del2 und rgg3_del3/rgg3_del4 mittels PCR aus genomischer DNA von *S. agalactiae* 6313 amplifiziert. Dabei trugen die beiden Primer rgg3_del2 und rgg3_del3 jeweils komplementäre Basenpaare, so dass bei der darauffolgenden Cross-over PCR beide PCR- Produkte als Matrize zur Amplifikation mit den Primern rgg3_del1 und rgg3_del4 eingesetzt werden konnten. Das erhaltene PCR- Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Kpn*I verdaut und in den ebenfalls *Bam*HI-/*Kpn*I-geschnittenen Vektor pG^{+}host6 kloniert (**Abbildung 2**). Das resultierende Plasmid wurde als pGΔ*rgg3* bezeichnet und in *S. agalactiae* 6313 transformiert.

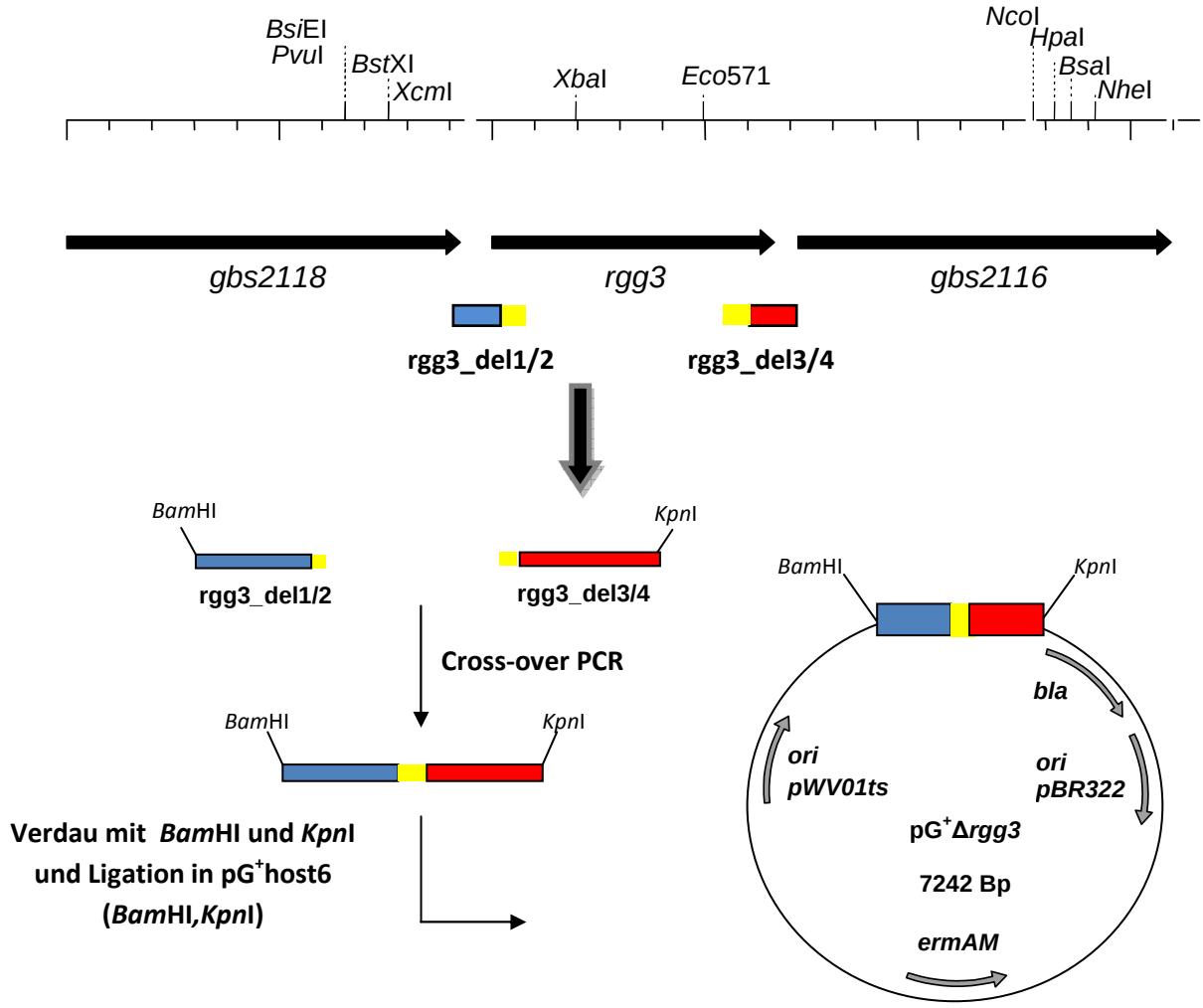


Abbildung 2: Schema zur Konstruktion des Deletionsplasmides pGΔ*rgg3*

Plasmid tragende Klone wurden auf THY- Platten mit Erythromycin bei 30 °C selektioniert. *S. agalactiae*- Klone in denen das Plasmid pGΔ*rgg3* durch homologe Rekombination in die *rgg3*- kodierende Region integriert worden war, wurden auf THY- Agarplatten mit Erythromycin bei einer Temperatur von 39 °C selektioniert. Da das Plasmid pGΔ*rgg3* den temperatursensitiven Replikationsursprung *ori pWV01ts* trägt, können bei dieser Temperatur nur jene Klone wachsen, in die das Plasmid chromosomal integriert wurde. Während einer anschließenden 10- tägigen Passage der Kultur bei 30 °C ohne Erythromycin-Selektion, wurde das Wachstum derjenigen Klone begünstigt, bei denen das Plasmid über eine zweite homologe Rekombination aus dem Chromosom entfernt worden war (**Abbildung 3**). Anschließend wurden Verdünnungen der Kulturen auf THY- Agarplatten ausplattiert und die erhaltenen Klone auf den Verlust ihrer Erythromycin- Resistenz überprüft. Klone, die sensitiv gegenüber Erythromycin waren, wurden mittels PCR und Southern Blot- Analyse auf die Deletion des *rgg3*- Gens untersucht (**Abbildung 4**).

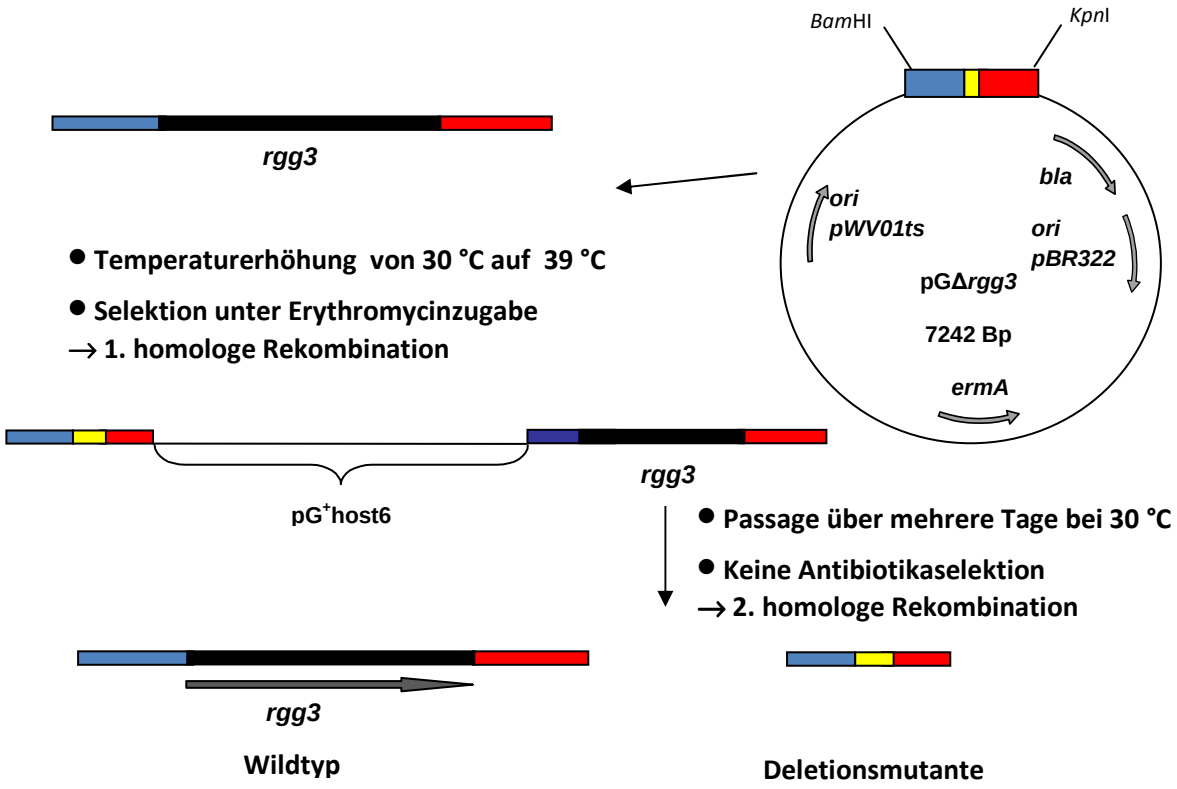


Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Deletion von *rgg3* mittels des Plasmides pGΔ*rgg3*

In **Abbildung 4** ist die Überprüfung der Deletion von verschiedenen *S. agalactiae* 6313 Klonen mittels PCR und Southern Blot- Analyse dargestellt. Hierzu wurde chromosomale DNA aus Erythromycin sensitiven Klonen präpariert. Für den Nachweis mittels PCR wurde das Primerpaar rgg3_del1K und rgg3_del2K verwendet, welche außerhalb des *rgg3*- Gens hybridisieren. Für die Southern Blot- Analyse wurde die chromosomale DNA mit *Ksp*A1 verdaut. Anschließend erfolgte die Größentrennung der Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese und darauffolgende Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran. Daran anknüpfend erfolgte die Hybridisierung der DNA mit einer Digoxigenin- markierten Sonde, die mit den Primern rgg3_del1 und rgg3_del2 mittels PCR hergestellt wurde. Die Detektion erfolgte über Peroxidase- gekoppelte Anti- Digoxigenin- Antikörper mittels Chemilumineszenz. Die mit *Ksp*A1 verdaute chromosomale DNA von *S. agalactiae* 6313 wt zeigte im Southern Blot ein Signal bei ca. 3800 Bp, während die chromosomale DNA der *rgg3*- Mutante ein Signal bei ca. 3200 Bp lieferte (**Abbildung 4**). Da die Deletion des *rgg3*-Gens zu einem Verlust von 625 Bp führt, konnte das *rgg3*- Gen erfolgreich deletiert werden.

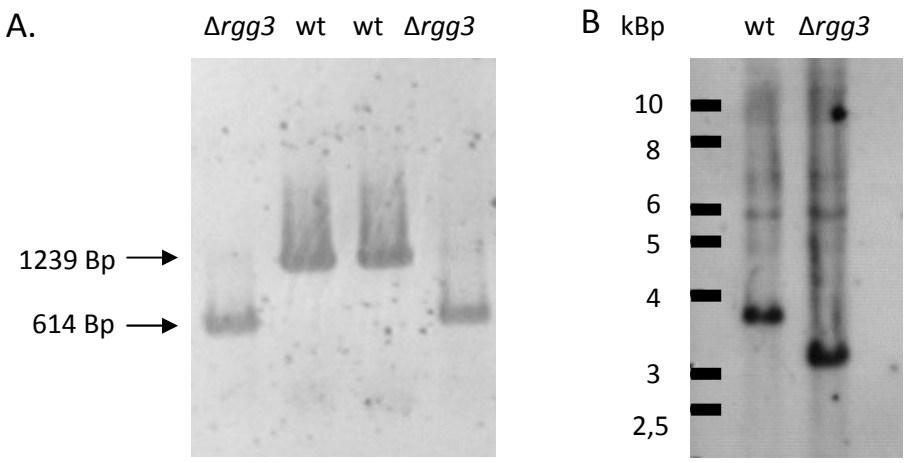


Abbildung 4: Nachweis der Deletion von *rgg3* in *S. agalactiae* 6313 mittels PCR (A.) und Southern Blot- Analyse (B.). Der Nachweis mittels PCR erfolgte durch Amplifikation mit den *rgg3* flankierenden Primern rgg3_del1K und rgg3_del2K. Zum Nachweis der Deletion mittels Southern Blot- Analyse wurde chromosomale DNA mit *Ksp*A1 verdaut, gelelektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Bindung einer Digoxigenin- markierten Sonde wurde mit einem Peroxidase gekoppelten Anti- Digoxigenin- Antikörper mittels Chemilumineszenz detektiert.

Herstellung einer *rgg3*/*fbsA*- Doppelmutante

Zur Beantwortung weiterer Fragestellungen wurden *rgg3*/*fbsA*- Doppelmutanten hergestellt. Hierfür wurde das von Schubert et al (2004) konstruierte Deletionsplasmid pGΔ*fbsA* in die in dieser Arbeit konstruierte Mutante *S. agalactiae* 6313 Δ*rgg3* transformiert und Plasmid tragende Klone auf THY/Erythromycin- Platten bei 30 °C selektioniert. Die anschließende Selektion auf Integration des Plasmides mittels homologer Rekombination und der Verlust des Plasmides mittels einer 2. homologen Rekombination erfolgte wie in **Abbildung 3** beschrieben. Der Nachweis der Deletion von *fbsA* wurde mit dem Primerpaar fbp_rep2 und fbp_del4 mittels PCR durchgeführt (**Abbildung 5**). Die Amplifikation der *fbsA*- flankierenden Bereiche mittels PCR ergab ein PCR- Produkt für *S. agalactiae* 6313 wt bei ca. 2100 Bp, während für die *rgg3*/*fbsA*- Doppelmutante ein PCR- Produkt bei ca. 800 Bp erhalten wurde

(**Abbildung 5**). Da die Deletion des *fbsA*- Gens zu einem Verlust von 1318 Bp führt, konnte das *fbsA*- Gen erfolgreich im *S. agalactiae*- Stamm 6313 Δ*rgg3* deletiert werden.

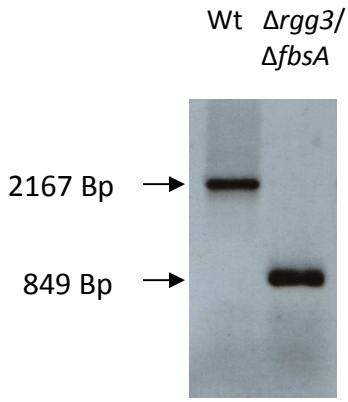


Abbildung 5: Nachweis der Deletion von *fbsA* in *S. agalactiae* 6313 Δ*rgg3* mittels PCR. Der Nachweis erfolgte durch PCR- Amplifikation mit den *fbsA* flankierenden Primern fbp_rep2 und fbp_del4.

Herstellung des Komplementationsplasmides pOri*rgg3*

Um den Effekt der Deletion von *rgg3* im Genom von *S. agalactiae* 6313 Δ*rgg3* zu komplementieren, wurde das *rgg3*- Gen ohne eigenen Promoter mit den Primern rgg3_komp1 und rgg3_komp2 mittels PCR aus chromosomaler DNA von *S. agalactiae* 6313 amplifiziert, das PCR- Produkt mit *Bam*HI und *Pst*I verdaut, in den ebenfalls *Bam*HI/*Pst*I-verdauten Vektor pOri23 ligiert und in *E. coli* DH5α transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB/Erythromycin- Platten bei 37 °C. Das resultierende Plasmid pOri*rgg3* (**Abbildung 6**) wurde anschließend aus *E. coli* DH5α pOri*rgg3* isoliert und in *S. agalactiae* 6313 Δ*rgg3* transformiert. Plasmid tragende Klone wurden auf THY/Erythromycin- Platten selektioniert. Als Kontrolle wurde zusätzlich das Plasmid pOri23 ohne Insert in die *S. agalactiae*- Stämme 6313 bzw. 6313 Δ*rgg3* transformiert.

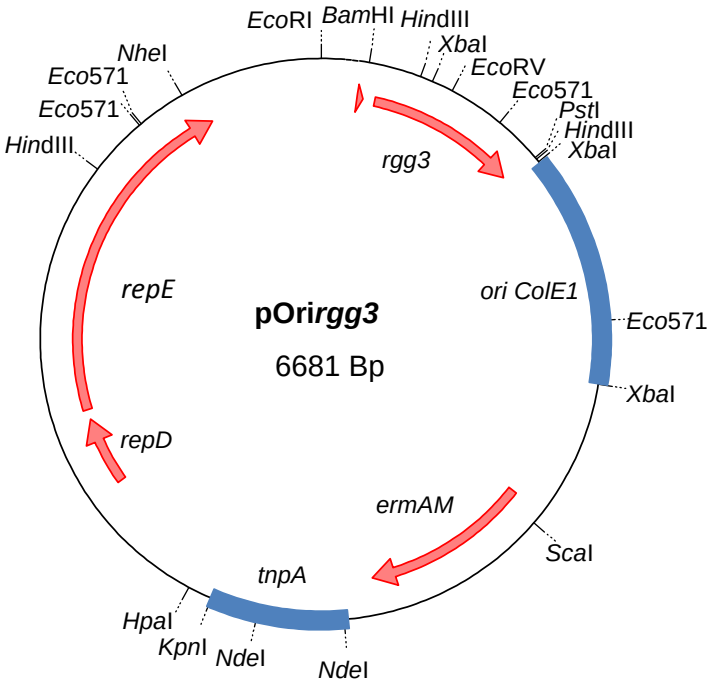


Abbildung 6: Restriktionskarte des Komplementationsplasmides pOri*rgg3*

Bedeutung des putativen Regulators Rgg3 für die Bindung von *S. agalactiae* 6313 an humanes Fibrinogen

Die Bindung von *S. agalactiae* an Proteine der extrazellulären Matrix, insbesondere an humanes Fibrinogen und dessen Bedeutung für die Infektion ist hinreichend bekannt (Lämmler et al, 1983, Schubert et al, 2002 und 2005; Jonsson et al, 2005; Lindahl et al, 2005; Tenenbaum et al; 2005, Pietrocola et al 2006; Rosenau et al, 2007). Um die Bedeutung von *rgg3* für die Bindung von *S. agalactiae* an humanes Fibrinogen zu untersuchen, wurde Fibrinogen auf 96- Well Platten über Nacht immobilisiert, ungesättigte Bindestellen mit 10 % BSA geblockt und die FITC- (Fluoresceinisothiocyanat-) markierten *S. agalactiae*-Stämme 6313 wt pOri, 6313 Δ*rgg3* pOri und 6313 Δ*rgg3* pOri*rgg3,* 6313 wt, 6313 Δ*rgg3*, 6313 Δ*rgg3*Δ*fbsA*, 6313 Δ*fbsA* auf das immobilisierte Fibrinogen gegeben. Die Menge gebundener Bakterien wurde anhand der Fluoreszenz im Cytofluor bestimmt und in Relation zu der eingesetzten Menge an Bakterien gesetzt.

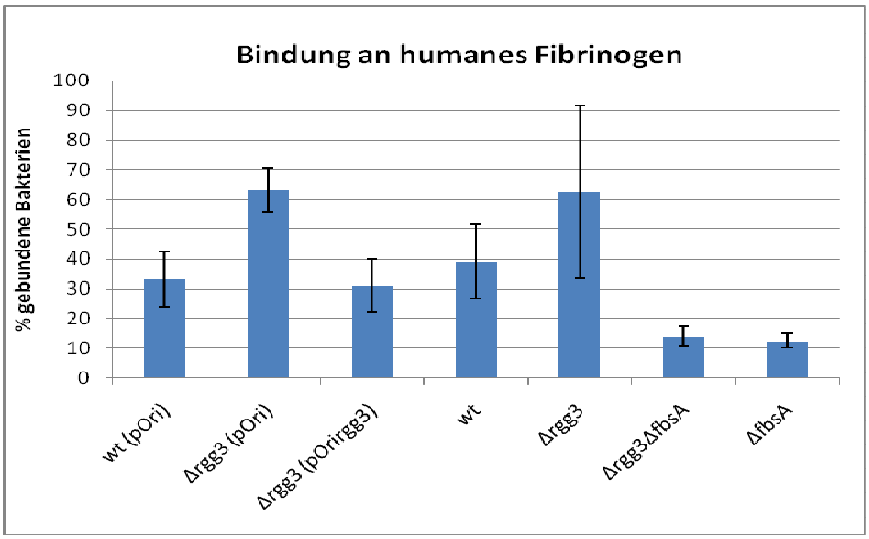


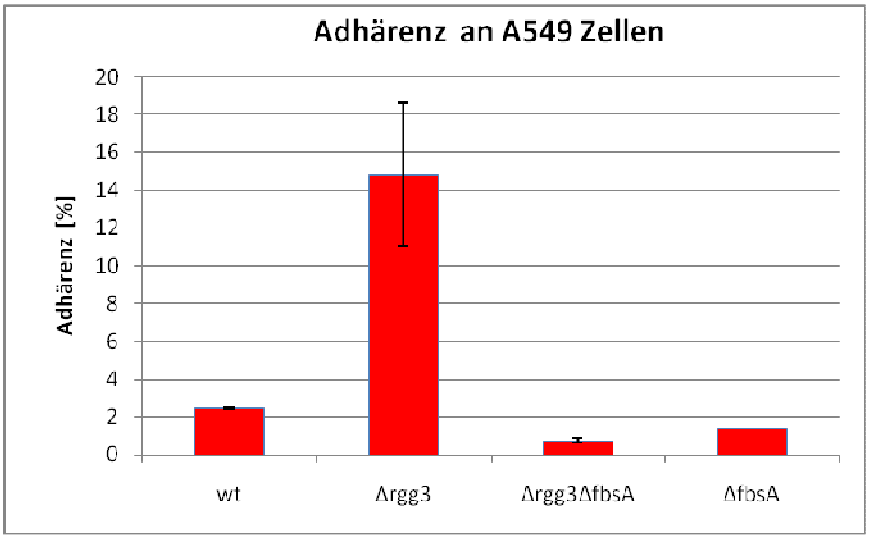
Abbildung 7: Bindung von FITC-markierten *S. agalactiae* 6313 wt pOri, 6313 Δ*rgg3* pOri, 6313 Δ*rgg3* pOri*rgg3*, 6313 wt, 6313 Δ*rgg3*, 6313 Δ*rgg3*Δ*fbsA* und 6313 Δ*fbsA* an humanes Fibrinogen

Die Analyse der Bindung von *S. agalactiae* 6313 an humanes Fibrinogen (**Abbildung 7**) zeigt zunächst, dass durch Einbringen des Plasmides pOri23 kein signifikanter Unterschied zwischen dem Stamm *S. agalactiae* 6313 wt mit 39 % Bindung und 6313 wt pOri mit 33 % Bindung zu erkennen ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Plasmid pOri23 keinen Einfluss auf die Fibrinogenbindung hat. Sowohl mit Plasmid, als auch ohne Plasmid konnte eine signifikante Erhöhung der Fibrinogenbindung in der *rgg3*- Mutante im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden, wobei eine Erhöhung ohne pOri23 um 27 % bzw. mit pOri23 um 48 % erfolgt. Des Weiteren konnte durch Einbringen des Plasmid codierten *rgg3*- Gens dieser Effekt mit 8,7 % Bindung wieder auf Wildtypniveau gebracht werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Deletion von *rgg3* Einfluss auf die Bindung von *S. agalactiae* 6313 an humanes Fibrinogen nimmt. Als Kontrolle diente die Bindung der *fbsA*-Deletionsmutante (Schubert et al, 2004) an Fibrinogen, welche mit 12 % eine signifikante Verminderung der Bindungsfähigkeit zeigte. Da FbsA von Schubert et al (2002) als Hauptfibrinogenrezeptor identifiziert worden ist, und somit eine Verminderung der Bindungsfähigkeit den Erwartungen entspricht, können die Ergebnisse interpretiert werden. Zusätzlich zeigt die *rgg3*/*fbsA*- Doppelmutante ebenfalls eine verminderte Fibrinogenbindung, welche mit 14 % auf dem Niveau der *fbsA*- Deletionsmutante liegt. Dieser Effekt lässt vermuten, dass Rgg3 Einfluss auf die FbsA- vermittelte Fibrinogenbindung hat.

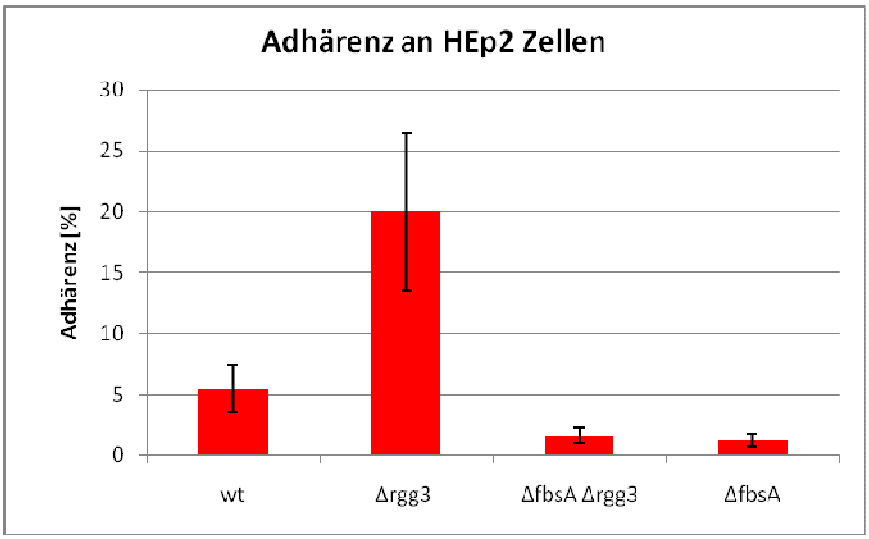
Bedeutung des putativen Regulators Rgg3 für die Adhärenz bzw. Invasion von *S. agalactiae* 6313 an bzw. in eukaryotische Zellen

Die Fähigkeit von Bakterien an Wirtszellen zu adhärieren bzw. in diese einzudringen stellt einen wichtigen Virulenzmechanismus pathogener Bakterien und ein initiales Ereignis in der Infektionskaskade dar. Daher war es von Interesse, den Einfluss von Rgg3 auf die Adhärenz bzw. Invasion von *S. agalactiae* 6313 an bzw. in eukaryotische Zellen zu analysieren. Für die Untersuchung des Einflusses von Rgg3 auf die Adhärenz wurden differenzierte Zellen der Lungenepithelzelllinie A549 und der Rachenepithelzelllinie HEp2 in 24- Well Platten ausgesät, am nächsten Tag mit Bakterien definierter optischer Dichte für 2 h zur Bestimmung der Adhärenz bzw. für 4 h unter Antibiotikazugabe zur Bestimmung der Invasion inkubiert und anschließend die Zahl gebundener bzw. invadierter Bakterien durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungen auf THY- Platten bestimmt.
Zunächst wurde die Adhärenz und Invasion der Stämme *S. agalactiae* 6313 wt, 6313 Δ*rgg3*, 6313 Δ*rgg3*Δ*fbsA* und 6313 Δ*fbsA* an A549 und HEp2 Zellen untersucht.

A.



B.



C.

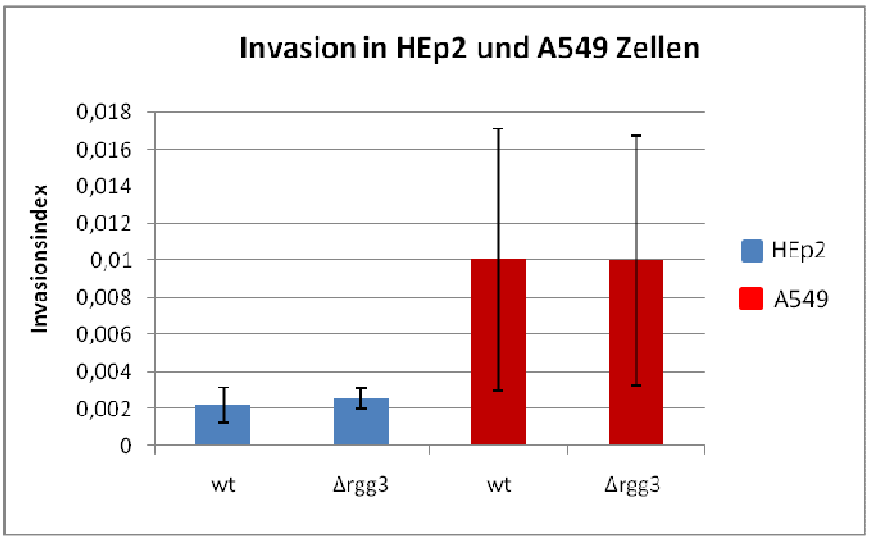
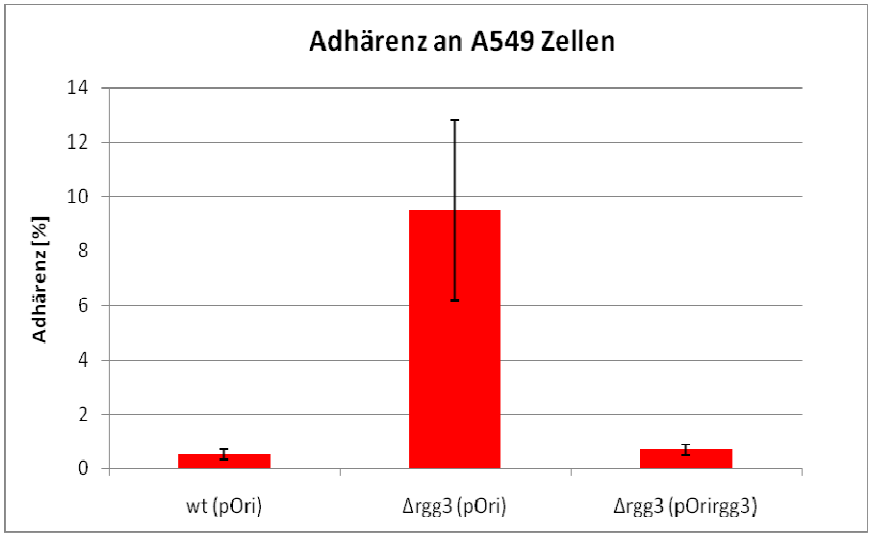


Abbildung 8: Adhärenz- und Invasionsverhalten der *S. agalactiae*– Stämme 6313 wt, 6313 Δ*rgg3*, 6313 Δ*rgg3*Δ*fbsA* und 6313 Δ*fbsA* an bzw. in die humane Lungenepithelzelllinie A549 (A und C) und die humane Rachenepithelzelllinie HEp2 (B und C). Angegeben ist der jeweilige prozentuale Anteil adhärierter bzw. invadierter Zellen bezogen auf die Zahl der eingesetzten Bakterien nach zweistündiger Inkubation mit den eukaryotischen Zellen.

Wie der **Abbildung 8** zu entnehmen ist, führt die Deletion von *rgg3* in *S. agalactiae* 6313 zu einer Adhärenz von ca. 14,8 % an A549 Zellen (**Abb. 8 A**) und 19,9 % an HEp2 Zellen (**Abb. 8 B**). Dies entspricht einem Anstieg der Adhärenz in der *rgg3*- Mutante um das 5,9-fache bei A549 Zellen und 3,6- fache bei HEp2 Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Deletion des *rgg3*- Gens die Adhärenz an

eukaryotische Epithelzellen signifikant erhöht. Als Kontrolle diente die *fbsA*-Deletionsmutante, die, wie bereits von Schubert et al (2004) gezeigt werden konnte, eine stark verminderte Adhärenz an A549 Zellen aufweist. Zusätzlich konnte in den hier beschriebenen Experimenten gezeigt werden, dass die *fbsA*- Deletionsmutante eine verminderte Adhärenz an HEp2 Zellen zeigt (**Abb. 8 B**). Des Weiteren zeigt die *rgg3*/*fbsA*-Doppelmutante mit Adhärenzwerten von 0,74 % bzw. 1,6 % eine ebenfalls stark verminderte Adhärenz an die getesteten Epithelzelllinien (**Abb. 8 A und B**), so dass erneut die Vermutung nahe liegt, dass FbsA eine Rolle bei der *rgg3*- kontrollierten Adhärenz spielt. Die Invasion ist bezogen auf die Adhärenz nicht beeinflusst, was sich in **Abbildung 8 C** durch einen nicht vorhandenen Unterschied im Invasionsindex zwischen Wildtyp und *rgg3*- Mutante widerspiegelt.

Um die Effekte eindeutig auf die Deletion des *rgg3*- Gens zurückführen zu können, wurde die Adhärenz der Stämme *S. agalactiae* 6313 wt pOri, 6313 Δ*rgg3* pOri und 6313 Δ*rgg3* pOri*rgg3* an die eukaryotischen Zelllinien A549 und HEp2 untersucht. Hierbei konnte ebenfalls eine Erhöhung der Adhärenz bei A549 Zellen um das 17-fache und bei HEp2 Zellen um das 4,9-fache ermittelt werden (**Abbildung 9**). Dieser Effekt konnte durch Einbringen eines Plasmid codierten *rgg3*- Gens in *S. agalactiae* 6313 Δ*rgg3* auf Wildtyp- Niveau rückgängig gemacht werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *rgg3* zu einem Anstieg der Adhärenz von *S. agalactiae* 6313 an eukaryotische Zelllinien führt und dieser Effekt durch Komplementation aufgehoben werden kann.



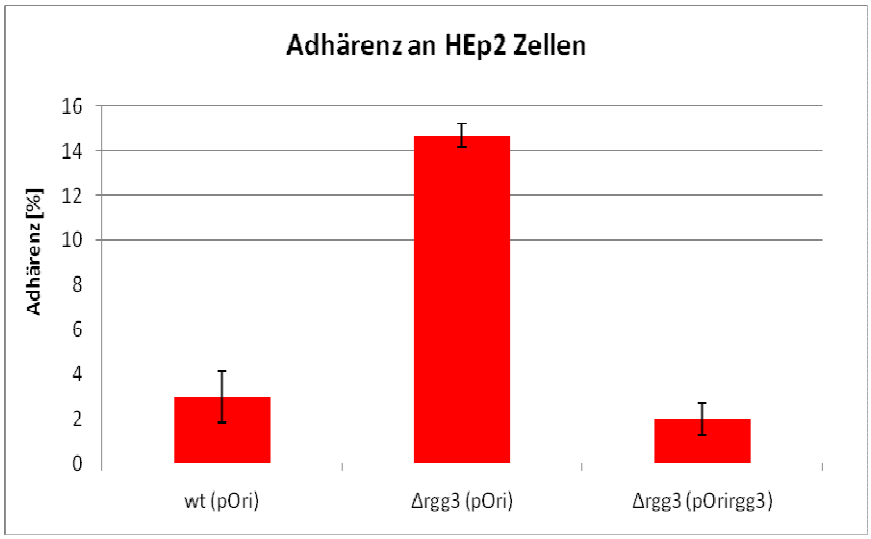


Abbildung 9: Adhärenz der Stämme *S. agalactiae* 6313 wt pOri, 6313 Δ*rgg3* pOri und 6313 Δ*rgg3* pOri*rgg3* an die Epithelzelllinien A549 und HEp2. Angegeben ist der jeweilige prozentuale Anteil adhärierter Zellen bezogen auf die Zahl der Bakterien nach zweistündiger Inkubation mit den eukaryotischen Zellen.

1.3. Wachstumsphasen abhängige Expression des *rgg3*- Gens

Die Expression von Virulenzregulator- Genen ist in vielen Fällen Wachstumsphasen abhängig wie zum Beispiel die des *mga*- Gens aus *Streptococcus pyogenes* (McIver et al, 1997), des *rgg*- Gens aus *Streptococcus pyogenes* (Chaussee et al, 2004) oder des *lytR*- Gens aus *Streptococcus mutans* (Chatfield et al, 2005). Aus diesem Grund wurde mittels quantitativer Real-time PCR die Wachstumsphasen abhängige Expression von *rgg3* in *S. agalactiae* bestimmt. Hierzu wurde Gesamt- RNA aus *S. agalactiae* 6313 während des Wachstums in THY- Flüssigmedium bei 37 °C isoliert und in cDNA unter Verwendung des `First Strand cDNA Synthesis Kit´ (Fermentas) und Random Hexamer Primern umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der cDNA mit den Primern rgg3_C1 und rgg3_N1 mittels quantitativer Real-time PCR am Light Cycler (Roche).

Um eine Quantifizierung zu ermöglichen wurde zunächst eine Kalibriergerade mit *gyrA*-spezifischen Primern und mit chromosomaler DNA definierter Menge erstellt. Aus der erhaltenen Gerade konnte nun direkt jedem Wendepunkt eine Transkriptmenge zugeordnet werden. In dieser Arbeit wurde die Kalibriergerade von Ulrike Samen verwendet, welche in **Abbildung 10** zu sehen ist.

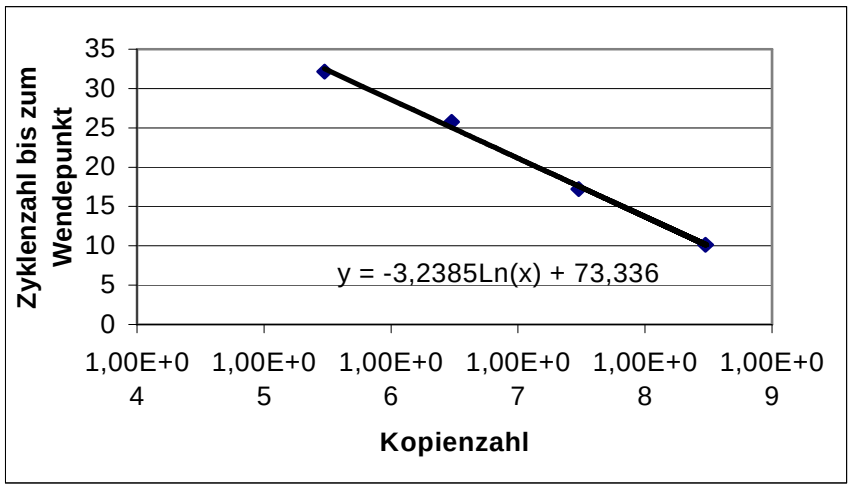


Abbildung 10: Kalibriergerade zur Bestimmung der Transkriptmenge bezogen auf dem Wendepunkt im Light Cycler Lauf (Samen, 2005)

Wie in **Abbildung 11** zu erkennen ist, konnte mittels quantitativer Real-time PCR eine Wachstumsphasen abhängige Expression des *rgg3*- Gens ermittelt werden. Dabei ist ein Expressionspeak in der späten exponentiellen Phase zu erkennen. Die Transkriptmenge nimmt mit Eintritt in die stationäre Phase ab, was die Vermutung nahe legt, dass *rgg3* in der exponentiellen Phase von Bedeutung ist.

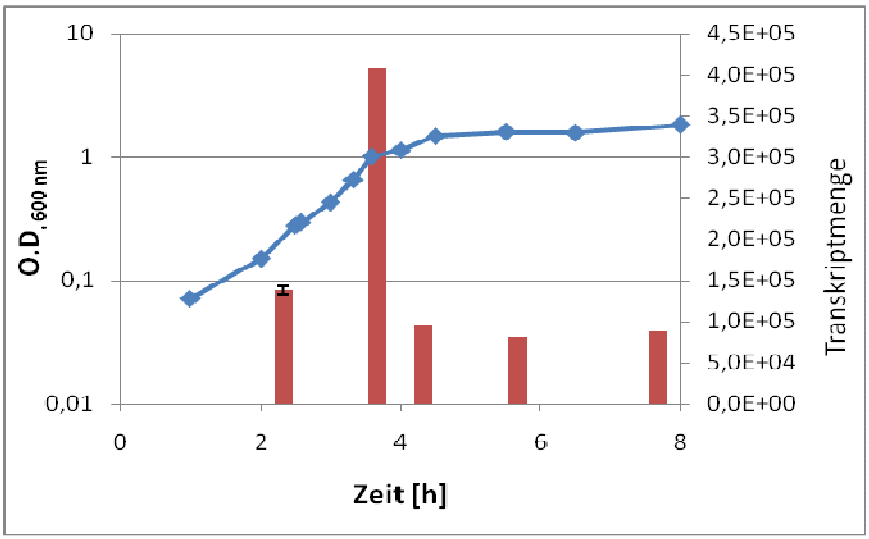


Abbildung 11: Wachstum von *S. agalactiae* 6313 in THY- Medium bei 37 °C (Rauten) und Untersuchung der Wachstumsphasen abhängigen Expression von *rgg3* (Balken) mittels quantitativer Real-time PCR mit *rgg3*- spezifischen Primern; Dabei wurde die Transkriptmenge von *rgg3* an fünf verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums bestimmt.

1.4. Die Bedeutung von Rgg3 für die Expression von *fbsA*

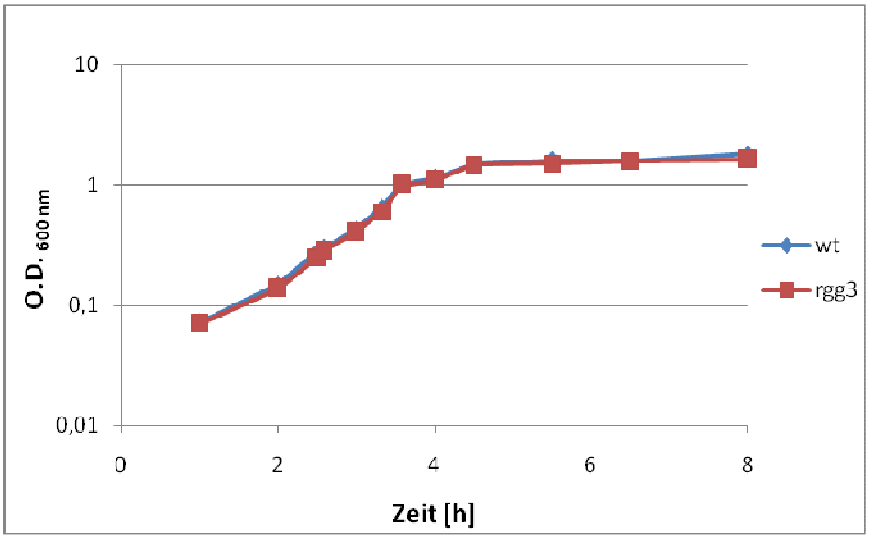
In der vorliegenden Arbeit zeigt die *rgg3*- Deletionsmutante eine erhöhte Fähigkeit an humanes Fibrinogen zu binden und gleichzeitig eine signifikant erhöhte Adhärenz an humane Epithelzellen. Gleichzeitig zeigte eine *rgg3*/*fbsA*- Doppelmutante eine stark verminderte Fibrinogenbindung und verminderte Adhärenz an Epithelzellen. Von Schubert et al (2002) wurde FbsA bereits als Hauptfibrinogenrezeptor beschrieben. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine *fbsA*- Deletionsmutante eine stark verminderte Adhärenz an Epithelzellen aufweist (Schubert et al, 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass Rgg3 Einfluss auf die *fbsA*- Expression in *S. agalactiae* hat. In den nachfolgend beschriebenen Expressionsstudien sollte dieser Einfluss näher untersucht werden.

Untersuchung des Einflusses von *rgg3* auf die Expression von *fbsA* mittels quantitativer Real-time PCR

Um den Einfluss von *rgg3* auf die *fbsA*- Expression zu untersuchen, wurden quantitative Real-time PCR Experimente mit Gesamt- RNA unterschiedlicher Wachstumsphasen aus *S. agalactiae* 6313 wt und 6313 Δ*rgg3* durchgeführt. Hierfür wurde die Gesamt- RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die anschließende quantitative Real-time PCR erfolgte mit *fbsA*- spezifischen Primern. Als interner Standard diente das *gyrA*- Gen, ein konstitutiv exprimiertes Gen. Die Quantifizierung der *fbsA*- Transkriptmengen erfolgte mit der bereits in **Abbildung 10** dargestellten Kalibriergerade.

Wie aus **Abbildung 12 A** ersichtlich ist, sind keine Unterschiede im Wachstum von *S. agalactiae* 6313 wt und 6313 Δ*rgg3* zu ermitteln. Des Weiteren konnten im Verlauf des Wachstums keine signifikanten Unterschiede in der *fbsA*- Expression zwischen *S. agalactiae* 6313 wt und 6313 Δ*rgg3* erkannt werden (**Abb. 12 B**). Somit ist anzunehmen, dass die Expression von *fbsA* nicht unter der Kontrolle von Rgg3 steht.

A.



B.

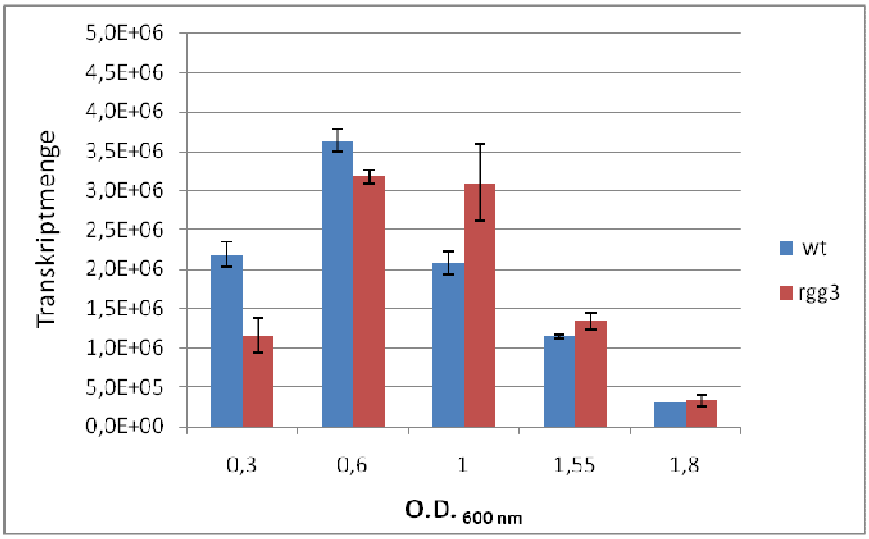


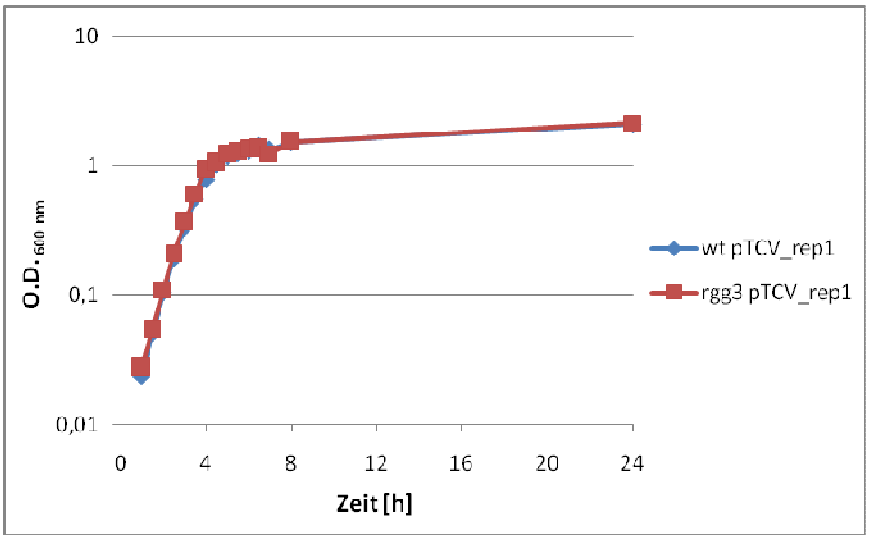
Abbildung 12: Wachstum von *S. agalactiae* 6313 wt und 6313 Δ*rgg3* in THY- Medium bei 37 °C (A) und Untersuchung der Wachstumsphasen abhängigen Expression von *fbsA* mittels quantitativer Real-time PCR mit *fbsA*- spezifischen Primern (B); Dabei wurde die Transkriptmenge von *fbsA* an fünf verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums bestimmt.

Untersuchung des Einflusses von *rgg3* auf die Promoteraktivität von *fbsA* mittels β-Galactosidase- Reportergenstudien

Um die Promoteraktivität des *fbsA*- Gens in Abhängigkeit von der Deletion von *rgg3* näher zu untersuchen, wurden Reportergenstudien mit *S. agalactiae* 6313 wt und 6313 Δ*rgg3* durchgeführt. Hierfür wurde das von Axel Schubert (2005) konstruierte Plasmid pTCV_rep1 in *S. agalactiae* 6313 wt und 6313 Δ*rgg3* transformiert. Das Plasmid trägt die Promoterregion des *fbsA*- Gens vor einem promoterlosen β- Galactosidase- Gen. Somit kann mit Hilfe der Bestimmung der β- Galactosidase- Aktivität direkt auf die Promoteraktivität des *fbsA*- Gens geschlossen werden. Plasmid tragende Klone wurden auf Erythromycin/ Kanamycin/THY- Platten selektioniert und die resultierenden Stämme mit 6313 wt pTCV_rep1 und 6313 Δ*rgg3* pTCV_rep1 bezeichnet. Das Wachstum der Stämme erfolgte bei 37 °C in 100 ml Erythromycin/Kanamycin/THY- Medium in Erlenmeyerkolben unter leichtem Schwenken. Während des Wachstums wurden jede halbe Stunde Proben zur Bestimmung der $O.D._{600\ nm}$ und der β- Galactosidase- Aktivität entnommen.

Abbildung 13 A zeigt den Wachstumsverlauf der beiden *S. agalactiae*- Stämme 6313 wt pTCV_rep1 und 6313 Δ*rgg3* pTCV_rep1. Hierbei konnte kein Wachstumsunterschied zwischen dem Wildtyp und der *rgg3*- Mutante festgestellt werden. Die Bestimmung der β-Galactosidase- Aktivität (**Abbildung 13 B**) zeigte den bereits bekannten Verlauf der *fbsA*-Promoteraktivität über die Zeit (Schubert, 2005). Hierbei nimmt die *fbsA*- Promoteraktivität während der exponentiellen Phase zu und erreicht einen Peak in der späten exponentiellen Phase. Dabei ist zwischen Wildtyp und *rgg3*- Mutante kein signifikanter Unterschied in der Promoteraktivität zu erkennen. Dies bestätigt die Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR Experimente und unterstreicht die Vermutung, dass Rgg3 nicht an der transkriptionellen Regulation des *fbsA*- Gens beteiligt ist.

A.



B.

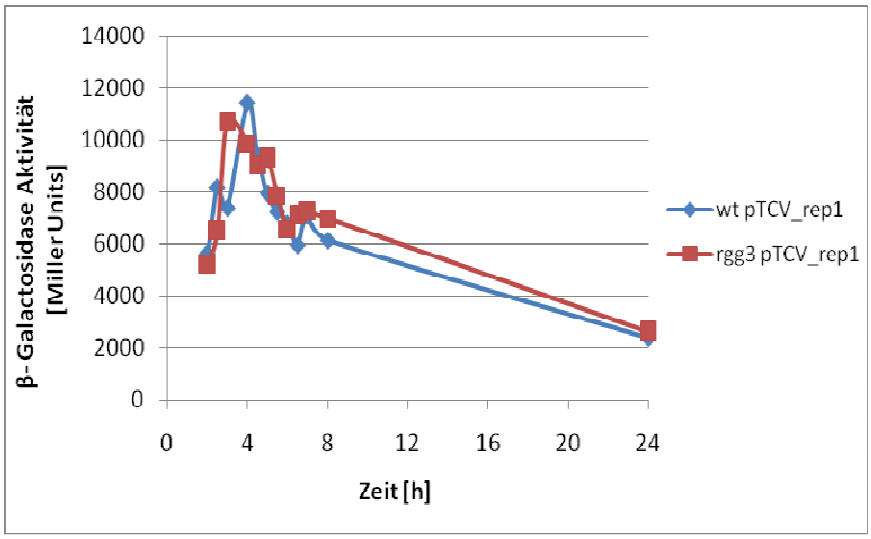


Abbildung 13: Wachstum der *S. agalactiae*- Stämme 6313 wt pTCV_rep1 und 6313 Δ*rgg3* pTCV_rep1 bei 37 °C in Erythromycin/Kanamycin/THY- Medium (A) und Bestimmung derer β-Galactosidase- Aktivität in Miller Units (B)

1.5. Die Bedeutung von Rgg3 für die Expression bekannter und putativer Virulenzgene

Um die Bedeutung von Rgg3 für die Expression von bereits bekannten und putativen Virulenzgenen näher zu untersuchen, wurden quantitative Real-time PCR Experimente durchgeführt und die Transkriptmenge der untersuchten Gene quantifiziert. Da aus vorangegangenen Versuchen ein Expressionsmaximum von *rgg3* in der exponentiellen Phase bei einer $O.D._{600\ nm}$ von 0,6 ermittelt worden ist, wurden für die folgenden Versuche

die *S. agalactiae*- Stämme 6313 wt und 6313 Δ*rgg3* in THY- Flüssigmedium bis zum Erreichen einer Optischen Dichte von 0,6 kultiviert und aus den Bakterien Gesamt- RNA isoliert. Die erhaltene RNA wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend eine quantitative Real-time PCR im Light Cycler mit spezifischen Primern durchgeführt. Als interner Standard diente das *gyrA*- Gen. Die Quantifizierung erfolgte mit der bereits in **Abbildung 10** dargestellten Kalibriergeraden.

Insgesamt wurde die Transkriptmenge von 28 bekannten oder putativen Viruenzgenen (Spellerberg et al, 1999; Franken et al, 2001; Poyart et al, 2001; Glaser et al, 2002; Doran und Nizet, 2004; Lamy et al, 2004; Liu und Nizet, 2004; Lalioui, 2005; Lauer et al 2005; Lindahl et al, 2005; Dramsi et al, 2006; Maisey et al, 2007; Samen et al, 2007; Santi et al, 2007; Tenenbaum et al, 2007), sowie der zwei das *rgg3*- Gen umgebenden offene Leserahmen bestimmt. In **Tabelle 4 A und B** sind die untersuchten Gene und die bekannte oder putative Funktion derer Genprodukte zusammengefasst. Zusätzlich ist der in Light Cycler- Analysen ermittelte Expressionsfaktor zwischen Wildtyp und *rgg3*- Mutante aufgelistet.

Tabelle 4: Mittels quantitativer Real-time PCR untersuchte Virulenzgene (A) und Gene kodierend für Oberflächenproteine (B) in *S. agalactiae* 6313 wt und 6313 Δ*rgg3*; Angegeben ist der Faktor der Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp und *rgg3*- Mutante. Zusätzlich ist die putative Funktion der Genprodukte genannt.

Tab 4 A: Gene bekannter und putativer Virulenzfaktoren

Gen	**Funktion des Genprodukts**	**Faktor**
srtA	Zellwandverankerung von Proteinen mit LPXTG- Motiv	+1,03
cpsA	Kapselregulator	-1,11
covR	Regulator des Zwei- Komponentensystems CovR/CovS	-1,17
cylE	Gen des Hämolysinoperons	-1,07
hyl	Hyaluronidase	-1,65
sod	Superoxiddismutase	+1,01
camp	CAMP- Faktor	-1,69
gbs1919	putative Neuraminidase	+1,09
gbs1263	Fibronektin- bindendes Protein	-1,12
fbsB	Fibrinogen- bindendes Protein	-1,84
lmb	Laminin- bindendes Protein	+1,22
gbs2116	`upstream´ von *rgg3*	-1,02
gbs2118	`downstream´ von *rgg3*	-1,03

Tab 4 B: Gene kodierend für bekannte oder putative Oberflächenproteine (Glaser et al, 2002)

Gen	Bekannte bzw. Putative Funktion des Genprodukts	Faktor
bibA	Adhäsin	+1,03
alp3	Adhäsin	-1,26
gbs1143	unbekannt	-1,84
gbs1288	unbekannt	-1,68
gbs1356	Sialinsäure- bindendes Protein	-1,44
gbs1420	unbekannt	-1,29
gbs1539	unbekannt	-1,20
gbs1540	Amidase	-1,71
gbs1929	Cyclo-Nucleotid-Phosphodiesterase	-1,15
cspA	Fibrinogen- spaltende Protease	-1,14
sapA	Pili	+1,18
scpB	C5a Peptidase	+1,25
srr1	Cytokeratin bindendes Protein	+1,01
gbs0428	unbekannt	-1,17
gbs0451	C5a- Peptidase	+1,13
gbs0632	unbekannt	-1,10
gbs0456	unbekannt	+1,21

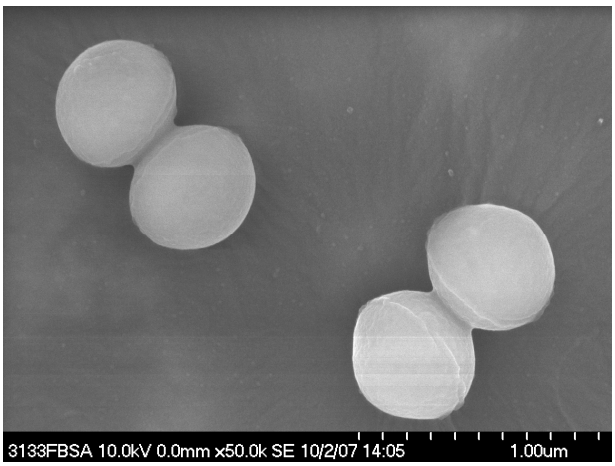
Wie aus **Tabelle 4** hervorgeht konnte bei keinem der untersuchten Gene ein signifikanter Unterschied in der Transkriptmenge zwischen *S. agalactiae* 6313 Wildtyp und *rgg3*- Mutante ermittelt werden. Ebenfalls konnte kein Unterschied in der Expression der das *rgg3*- Gen umgebenden Gene *gbs2116* und *gbs2118* festgestellt werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Deletion von *rgg3* zu keinem polaren Effekt auf die umgebenden Gene führt. Somit liegt die Vermutung nahe, dass Rgg3 nicht durch hier untersuchte Mechanismen die Virulenz von *S. agalactiae* 6313 beeinflußt.

1.6. Detektion von FbsA auf der Oberfläche von *S. agalactiae* 6313

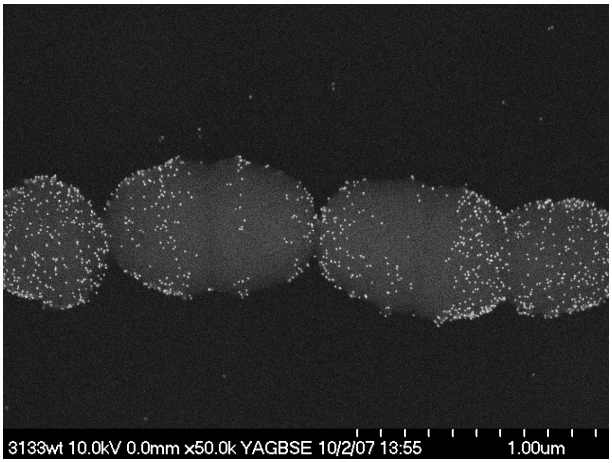
Da die Fibrinogenbindungsstudien und Adhärenzversuche einen Einfluss von Rgg3 auf das FbsA- Protein von *S. agalactiae* 6313 vermuten lassen, wurden rasterelektronen-mikroskopische Aufnahmen in der Zentralen Abteilung Elektronenmikroskopie der Universität Ulm durchgeführt. Hierbei wurde FbsA mittels Immunogoldmarkierung auf der Oberfläche von *S. agalactiae* 6313 wt pOri, 6313 Δ*rgg3* pOri und 6313 Δ*rgg3* pOri*rgg3* nachgewiesen. Als Kontrolle diente hierbei der Stamm 6313 Δ*fbsA*.

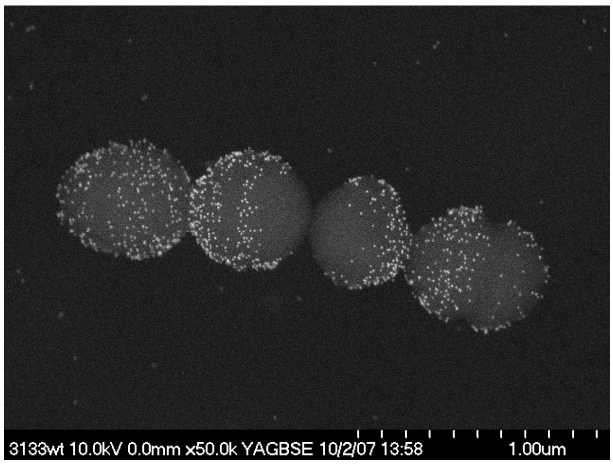
Für die Aufnahmen wurden die Bakterien auf Kohle- beschichteten Grids immobilisiert, mit Blockingreagenz behandelt und anschließend mit 2 % Paraformaldehyd fixiert. Nach der Fixierung erfolgte die Inkubation mit Anti- FbsA- Antikörpern und Gold- markierten Zweitantikörpern. Abschließend wurden die markierten Zellen mit Fixierlösung behandelt und in der Abteilung Elektronenmikroskopie kritisch- gefriergetrocknet.

A.

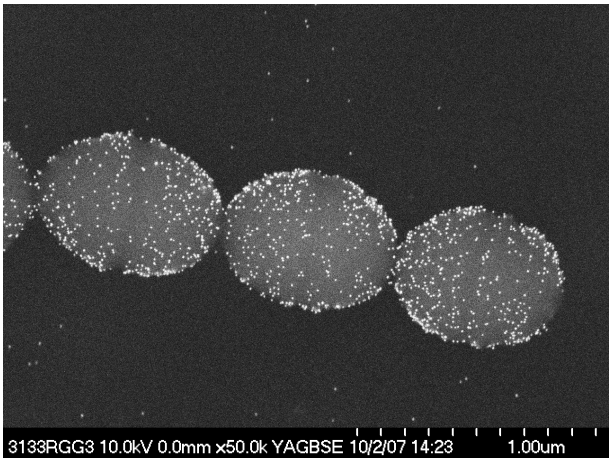


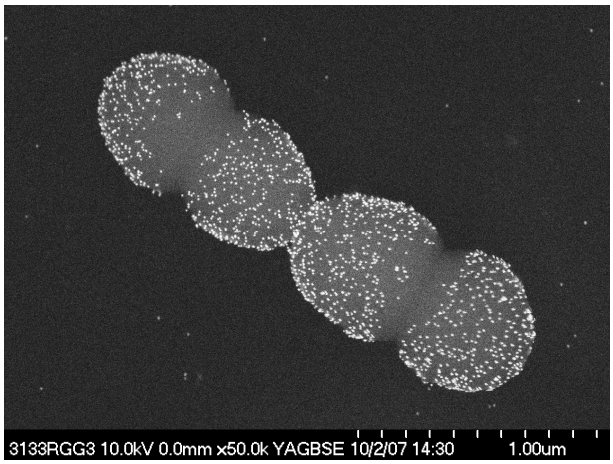
B.



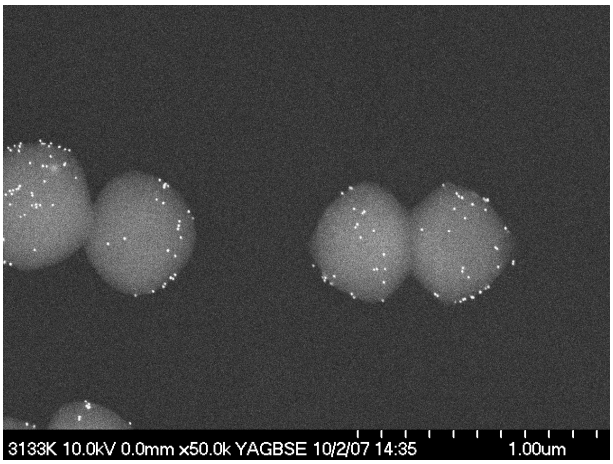


C.





D.



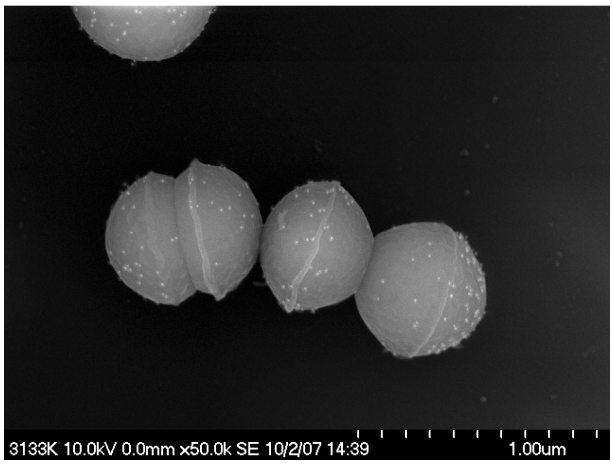


Abbildung 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zur Detektion des FbsA- Proteins auf der Oberfläche von *S. agalactiae* 6313 Δ*fbsA* (A), 6313 wt pOri (B), 6313 Δ*rgg3* pOri (C) und 6313 Δ*rgg3* pOri*rgg3* (D). Hierbei wurde FbsA mittels Maus- Anti- FbsA- Antikörpern und Gold- markierten Anti- Maus- Zweitantikörpern markiert.

Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (**Abbildung 14**) ist ersichtlich, dass das FbsA- Protein auf der Oberfläche von *S. agalactiae* 6313 mittels Immunogold- Markierung detektiert werden kann. Die Deletion von *rgg3* führt zu einer Zunahme der FbsA- Partikel auf der Oberfläche der Bakterien (**Abb. 14 C**). Mittels Einbringen eines Plasmid codierten *rgg3*-Gens nimmt die FbsA- Menge auf der Oberfläche von *S. agalactiae* wieder ab (**Abb. 14 D**). Die Kontrolle *S. agalactiae* 6313 Δ*fbsA* zeigt keine Goldmarkierung, was eine Kreuzreaktion der Antikörper mit anderen Oberflächenproteinen ausschließt. Die erhaltenen Ergebnisse

legen die Vermutung nahe, dass Rgg3 an einem nicht- transkriptionellen Mechanismus beteiligt ist, welcher die Menge von FbsA auf der Oberfläche von *S. agalactiae* reguliert.

1.7. Herstellung eines Rgg3- Fusionsproteins

Zur weiteren Charakterisierung von Rgg3 als DNA- bindendes Protein wurde Rgg3 als Maltose- bindendes Fusionsprotein im *E. coli*- Stamm TG1 rekombinant hergestellt. Hierfür wurde mit den Primern mbp_rgg3_N1 und mbp_rgg3_C1 das *rgg3*- Gen aus chromosomaler DNA mittels PCR amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I verdaut und in das ebenfalls *Bam*HI/*Pst*I- verdaute Plasmid pMal ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5α transformiert und positive Klone auf LB/Ampicillin- Platten selektioniert. Das resultierende Plasmid wurde als pMal*rgg3* bezeichnet (**Abbildung 15**). Nach der Isolierung des Plasmides aus *E. coli* DH5α erfolgte die anschließende Transformation in den *E. coli*- Stamm TG1.

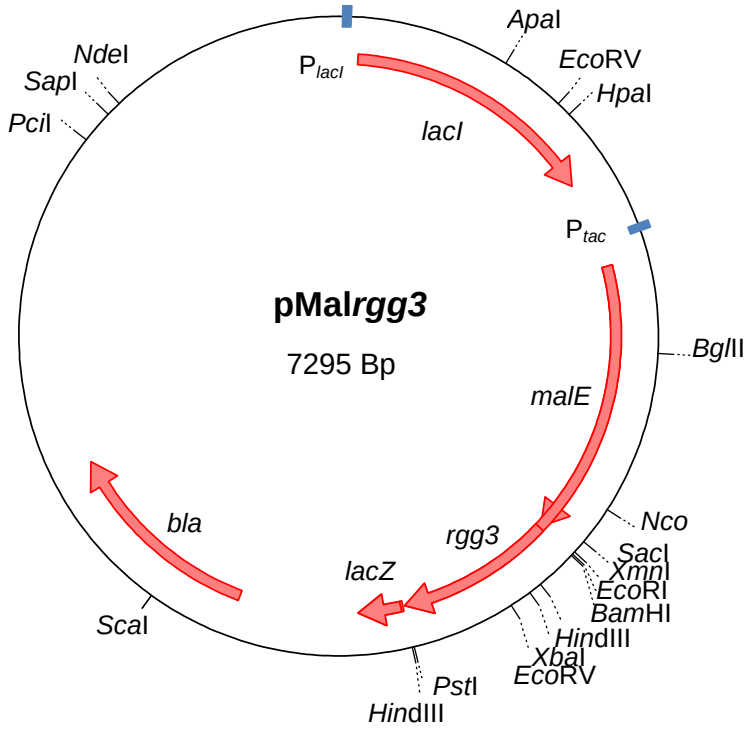


Abbildung 15: Restriktionskarte des Plasmides pMal*rgg3*

Das Plasmid pMal*rgg3* kodiert für ein Rgg3 Fusionsprotein, welches am N- terminalen Ende ein Maltose- bindendes Protein trägt. Die Überproduktion des resultierenden

Fusionsproteins Rgg3_mbp erfolgt nach Induktion der Expression mit IPTG auf Grund des Vorhandenseins eines vorgeschaltenen *tac*- Promoters und des LacI- Repressors. Nach dem Zellaufschluss wurde Rgg3_mbp über eine Amylose- Säule aufgereinigt und mit Maltose-haltigem Phosphatpuffer eluiert. Die Aufreinigung von Rgg3_mbp und dessen Detektion mittels Western Blot- Analyse mit Anti- Mbp- Antikörpern und Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpern mittels Chemilumineszenz ist in **Abbildung 16** dargestellt.

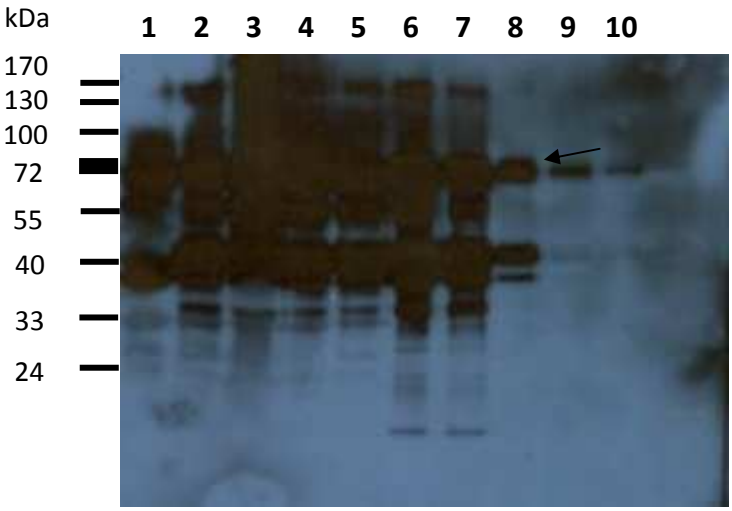


Abbildung 16: Western Blot- Analyse zum Nachweis von Maltosebindeprotein (Mbp) gekoppeltem Rgg3- Fusionsprotein mit Kaninchen- Anti- Mbp- Antikörpern und Peroxidase gekoppeltem Anti- Kaninchen- Antikörpern mittels Chemilumineszenz; Zu sehen ist Zellextrakt von *E. coli* TG1 pMal*rgg3* vor Induktion (Spur 1) und nach Induktion (Spur 2), Zellpellet (Spur 3) und Überstand (Spur 4) nach French Press- Aufschluss, Durchfluss nach Kopplung an eine Amylose- Säule (Spur 5), Eluate 1-5 mit jeweils 10 mM Maltose-haltigem Puffer (Spur 6-10).

Wie aus **Abbildung 16** ersichtlich ist, konnte das Fusionsprotein Rgg3_mbp mit einer Größe von 68 kDa erfolgreich in *E. coli* TG1 induziert und mittels Amylose-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Zusätzlich ist eine weitere Bande bei ca. 40 kDa zu sehen. Diese Bande entspricht dem von *E. coli* gebildeten Maltosebindeprotein, welches durch diese Aufreinigung nicht abgetrennt werden kann.
Somit steht das Fusionsprotein Rgg3_mbp für weiterführende Versuche zur Verfügung.

2. Charakterisierung des putativen Regulators RogB3 aus *Streptococcus agalactiae*

2.1. Die *rogB3*- codierende Region in *Streptococcus agalactiae*

Wie bereits beschrieben enthalten die veröffentlichten Genomsequenzen von *Streptococcus agalactiae* (Glaser et al, 2002, Tettelin et al, 2002 und 2005) Gene, die für putative Transkriptionsregulatoren codieren. Das im Folgenden beschriebene Gen aus *Streptococcus agalactiae* 6313 weist 100 % Identität zu dem Gen *gbs1426* aus *Streptococcus agalactiae* NEM316 (Glaser et al, 2002) auf, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu Vertretern der RofA-like Protein (RALP)- Familie an Transkriptionsregulatoren aufweist. Aufgrund dieser Homologie und aufgrund des Vorhandenseins von zwei weiteren RofA- ähnlichen Regulatoren (Gutekunst, 2003) wurde *gbs1426* in *Streptococcus agalactiae* 6313 mit *rogB3* benannt.

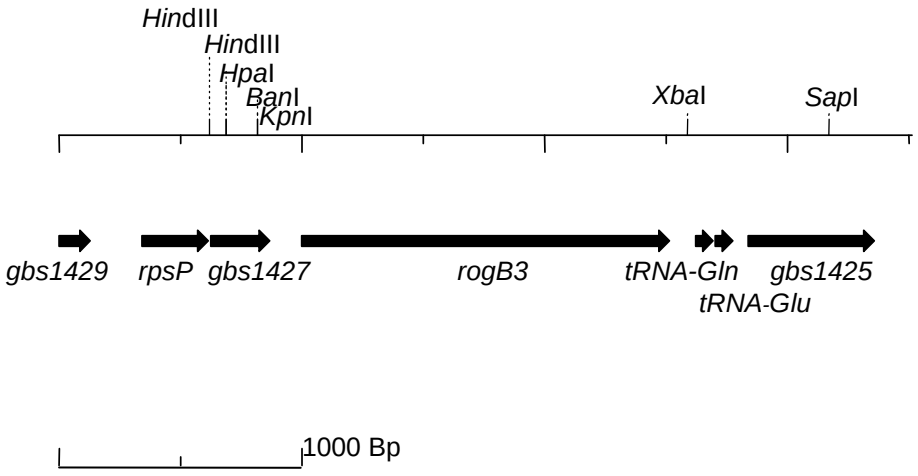


Abbildung 17: Restriktionskarte der *rogB3*- codierenden Region aus *S. agalactiae* NEM316

Das Gen *rogB3* besitzt eine Größe von 1509 Basenpaaren (**Abbildung 17**). Das resultierende Genprodukt RogB3 besteht aus 503 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 59206 Dalton. Datenbank- Analysen auf Aminosäureebene ergaben für RogB3 aus *S. agalactiae* 24 % Identität zu Nra und 29 % Identität zu RofA aus *Streptococcus pyogenes*. RofA und NraA sind sog. `stand alone´ Regulatoren und haben eine große Bedeutung in der Regulation von Virulenzfaktoren in *S. pyogenes* (Podbielski et al, 1999; Molinari et al, 2001, Kreikemeyer

2002, 2003 und 2007; Fogg et al, 1994 und 1997; Granok et al, 2000; Beckert et al, 2001, Kwinn et al, 2007). Zusätzlich konnte für RogB3 aus *S. agalactiae* 26 % Identität zu RlrA aus *Streptococcus pneumoniae* (Hava et al, 2002 und 2003) gefunden werden. RlrA ist ein transkriptioneller Regulator der unter anderem MSCRAMM- Gene in *Streptococcus pneumoniae* reguliert (Hava et al, 2002).

2.2. Die Bedeutung von *rogB3* für die Virulenz von *Streptococcus agalactiae* 6313

Herstellung definierter *rogB3*- Deletionsmutanten

Aufgrund der hohen Identiät von RogB3 zu Regulatoren der RALP- Familie aus *Streptococcus pyogenes*, ist es von Interesse dessen Funktion in *S. agalactiae* 6313 näher zu untersuchen. Hierfür wurde das *rogB3*- Gen in *S. agalactiae* 6313 deletiert und anschließend durch Einbringen eines Plasmid codierten *rogB3*- Gens komplementiert. Zur Herstellung des Deletionsplasmides wurde nach demselben Prinzip wie bei der Deletion des *rgg3*- Gens (**Abbildung 2**) verfahren und zunächst die flankierenden Bereiche des *rogB3*- Gens mit den Primerpaaren rogB3_del1/rogB3_del2 und rogB3_del3/rogB3_del4 mittels PCR aus genomischer DNA von *S. agalactiae* 6313 amplifiziert. Durch komplementäre Bereiche an den beiden Primern rogB3_del2 und rogB3_del3 konnten in der darauffolgenden Cross-over PCR beide PCR- Produkte als Matrize eingesetzt werden. Das mit den Primern rogB3_del1 und rogB3_del4 erhaltene PCR- Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hin*dIII verdaut und in den ebenfalls *Bam*HI-/*Hin*dIII- geschnittenen Vektor pG$^+$host6 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde als pGΔ*rogB3* bezeichnet und in *S. agalactiae* 6313 transformiert. Zur Herstellung von *rogB3*- Deletionsmutanten wurde nach gleichem Schema wie bei der Herstellung von *rgg3*- Mutanten verfahren (**Abbildung 3**).

Klone, die sensitiv gegenüber Erythromycin waren, wurden mittels PCR und Southern Blot-Analyse auf die Deletion des *rogB3*- Gens untersucht (**Abbildung 18**).

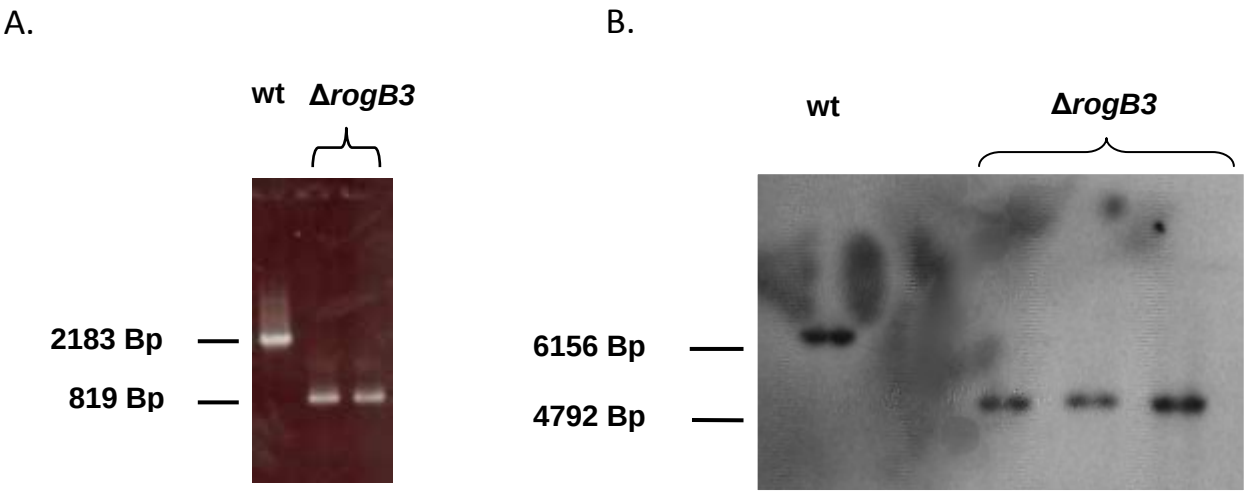


Abbildung 18: Nachweis der Deletion von *rogB3* in *S. agalactiae* 6313 mittels PCR (A.) und Southern Blot- Analyse (B.). Der Nachweis mittels PCR erfolgte durch Amplifikation mit den *rogB3* flankierenden Primern rogB3_del1K und rogB3_del2K. Zum Nachweis der Deletion mittels Southern Blot wurde chromosomale DNA mit *Ksp*A1 verdaut, gelelektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Bindung einer Digoxigenin- markierten Sonde wurde mit einem Peroxidase gekoppelten Anti- Digoxigenin- Antikörper mittels Chemilumineszenz detektiert.

Der Nachweis der erfolgreichen Deletion des *rogB3*- Gens in *S. agalactiae* erfolgte mittels PCR und dem Primerpaar rogB3_del1K und rogB3_del2K mit chromosomaler DNA (**Abbildung 18 A**). Zusätzlich wurde die Deletion mittels Southern Blot- Analyse detektiert (**Abbildung 18 B**). Hierfür wurde chromosomale DNA von *S. agalactiae* 6313 und 6313 Δ*rogB3* mit *Ksp*A1 verdaut. An die Größentrennung der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese und darauffolgende Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran folgte die Hybridisierung der DNA mit einer Digoxigenin- markierten Sonde, die mit den Primern rogB3_del1 und rogB3_del2 hergestellt worden war. Die Detektion erfolgte über Peroxidase-gekoppelte Anti- Digoxigenin Antikörper mittels Chemilumineszenz. Die mit *Ksp*A1 verdaute chromosomale DNA von *S. agalactiae* 6313 wt zeigte im Southern Blot ein Signal bei ca. 6000 Bp, während die chromosomale DNA der *rogB3*- Mutante ein Signal bei ca. 4700 Bp lieferte (**Abbildung 18**). Da die Deletion des *rogB3*- Gens zu einem Verlust von 1364 Bp führt, konnte das *rogB3*- Gen erfolgreich deletiert werden.

Herstellung des Komplementationsplasmides pOri*rogB3*

Um die beobachteten Effekte auf das deletierte *rogB3*- Gen zurückführen zu können, wurde ein *rogB3*- tragendes Plasmid hergestellt. Hierfür wurde das *rogB3*- Gen ohne eigenen Promoter mit den Primern rogB3_komp1 und rogB3_komp2 mittels PCR aus der chromosomalen DNA von *S. agalactiae* 6313 amplifiziert, das PCR- Produkt mit *Bam*HI und *Pst*I verdaut, in den ebenfalls *Bam*HI/*Pst*I- verdauten Vektor pOri23 ligiert und in *E. coli* DH5α transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB/Erythromycin- Platten bei 37 °C. Das resultierende Plasmid pOri*rogB3* (**Abbildung 19**) wurde anschließend aus *E. coli* DH5α pOri*rogB3* isoliert und in *S. agalactiae* 6313 Δ*rogB3* transformiert. Plasmid tragende Klone wurden auf THY/Erythromycin- Platten selektioniert. Als Kontrolle wurde zusätzlich das Plasmid pOri23 ohne Insert in *S. agalactiae* 6313 und 6313 Δ*rogB3* transformiert.

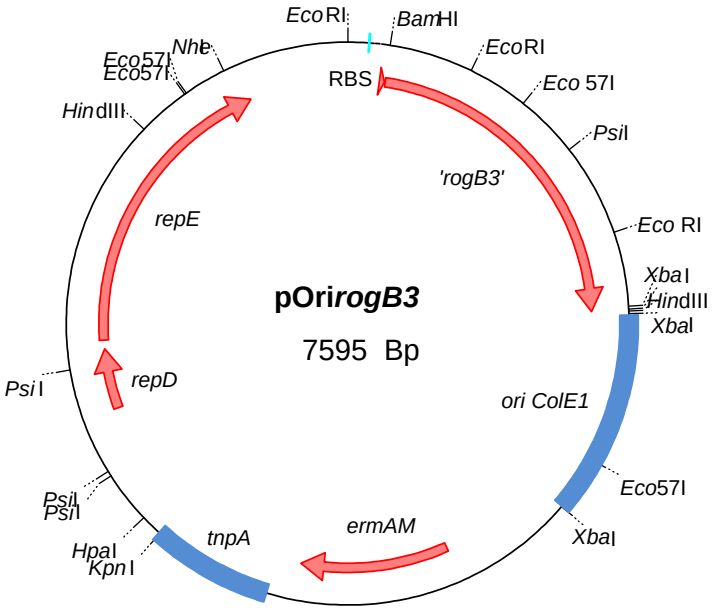


Abbildung 19: Restriktionskarte des Komplementationsplasmides pOri*rogB3*

Bedeutung des putativen Regulators RogB3 für die Bindung von *S. agalactiae* 6313 an humanes Fibrinogen

Wie bereits beschrieben stellt die Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronektin und Fibrinogen einen wichtigen Virulenzfaktor pathogener Bakterien dar. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von *rogB3* auf die Bindung von *S. agalactiae* 6313 an humanes Fibrinogen untersucht (**Abbildung 20**). Hierfür wurden 96- Well- Platten mit humanem Fibrinogen beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Wells mit 10 % BSA- Lösung geblockt und anschließend mit den FITC- (Fluoresceinisothiocyanat) markierten *S. agalactiae*- Stämmen 6313 wt pOri, 6313 Δ*rogB3* pOri und 6313 Δ*rogB3* pOri*rogB3* inkubiert. Nach diversen Waschschritten wurde die Menge gebundener Bakterien im Cytofluor durch Bestimmung der Fluoreszenz bestimmt und in Relation zu der Menge an eingesetzten Bakterien gesetzt.

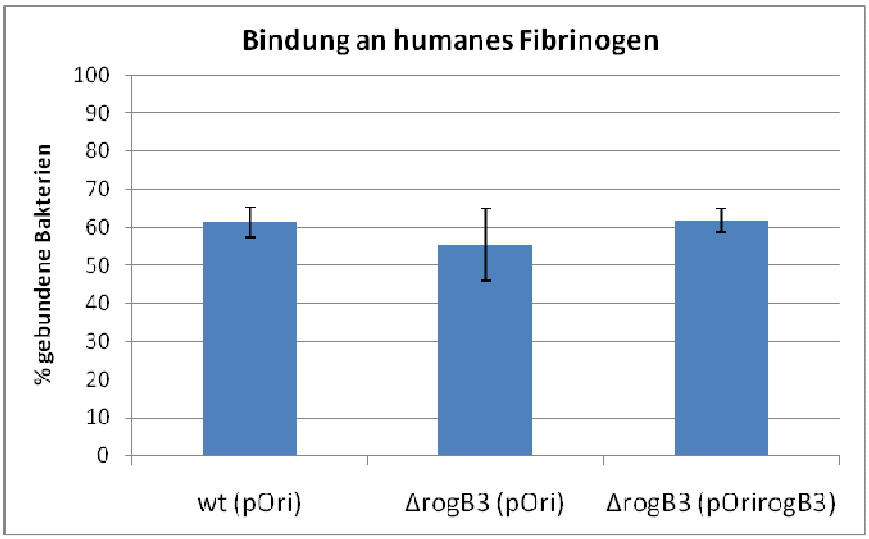


Abbildung 20: Bindung von FITC- markierten *S. agalactiae* 6313 wt pOri, 6313 Δ*rogB3* pOri und 6313 Δ*rogB3* pOri*rogB3* an humanes Fibrinogen

Wie in **Abbildung 20** zu erkennen ist, hat die Deletion von *rogB3* keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von *S. agalactiae* 6313 an humanes Fibrinogen.

Bedeutung des putativen Regulators RogB3 für die Adhärenz von *S. agalactiae* 6313 an eukaryotische Zellen

Um den Einfluss von RogB3 auf die Virulenz von *S. agalactiae* näher zu untersuchen, wurden Adhärenzversuche mit *S. agalactiae* 6313 wt pOri, 6313 Δ*rogB3* pOri und 6313 Δ*rogB3* pOri*rogB3* an die Lungenepithelzelllinie A549 durchgeführt (**Abbildung 21**). Hierfür wurden eukaryotische A549 Lungenepithelzellen in 24- Well Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 ausdifferenziert. Am nächsten Tag wurden Bakterien einer bestimmten optischen Dichte zugegeben und der Ansatz für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl gebundener Zellen mittels Ausplattieren von Verdünnungen auf THY- Platten bestimmt und in Relation zu der Gesamtzahl an Bakterien nach zweistündiger Inkubation gesetzt.

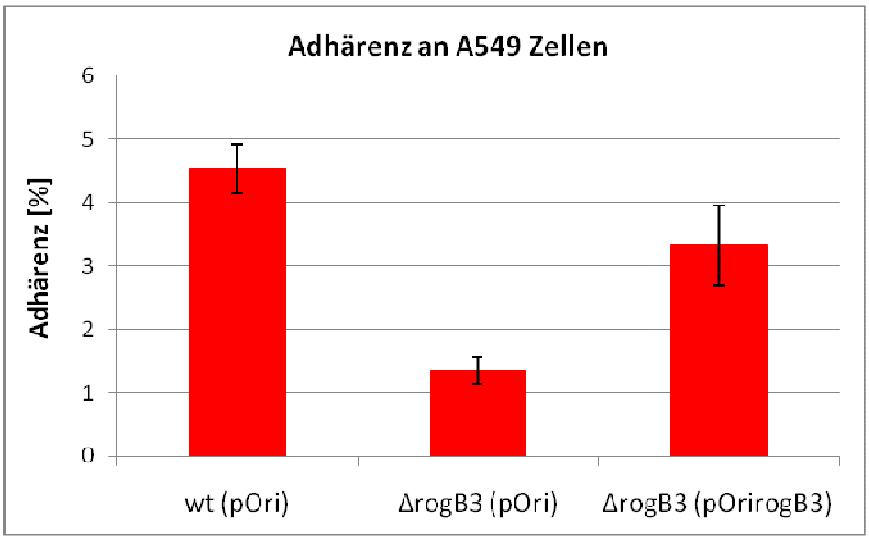


Abbildung 21: Adhärenz der Stämme *S. agalactiae* 6313 wt pOri, 6313 Δ*rogB3* pOri und 6313 Δ*rogB3* pOri*rogB3* an die Epithelzelllinie A549. Angegeben ist der jeweilige prozentuale Anteil adhärierter Zellen bezogen auf die Zahl der Bakterien nach zweistündiger Inkubation mit den eukaryotischen Zellen.

Wie aus **Abbildung 21** zu erkennen ist, erreicht der Wildtyp eine Adhärenz von 4,5 %, während die *rogB3*- Mutante eine Adhärenz an A549- Zellen von 1,34 % aufweist. Somit ist in der *rogB3*- Mutante die Adhärenz um 70 % im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt. Die Abnahme der Adhärenz konnte durch Einbringen eines Plasmid codierten *rogB3*- Gens in den *S. agalactiae*- Stamm 6313 Δ*rogB3* wieder auf annähernd Wildtyp- Niveau von 3,32 % erhöht werden. Somit ist davon auszugehen, das RogB3 an der Adhärenz der Bakterien an humane Lungenepithelzellen beteiligt ist.

Untersuchung des Einflusses von *rogB3* auf die Expression von *fbsA* mittels quantitativer Real-Time PCR

FbsA ist als Hauptfibrinogenrezeptor in *S. agalactiae* beschrieben (Schubert et al, 2002) und hat Einfluss auf die Adhärenz der Bakterien an humane Epithelzellen (Schubert et al, 2004). Um den Einfluss von RogB3 auf die Expression des *fbsA*- Gens zu untersuchen, wurden quantitative Real- time PCR- Experimente durchgeführt (**Abbildung 22**). Hierfür wurde Gesamt- RNA aus *Streptococcus agalactiae* 6313 wt pOri, Δ*rogB3* pOri und 6313 Δ*rogB3* pOri*rogB3* bei Wachstum in THY- Flüssigmedium bei 37 °C bei einer Optischen Dichte von 0,3 isoliert und in cDNA unter Verwendung des `First Strand cDNA Synthesis Kit` (Fermentas) und Random Hexamer Primern umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Amplifikation der cDNA mit den Primern FbsAluc1 und FbsAluc2 mittels quantitativer Real- time PCR am Light Cycler (Roche). Für die Quantifizierung wurde die Kalibriergerade von Ulrike Samen verwendet, welche in **Abbildung 10** zu sehen ist.

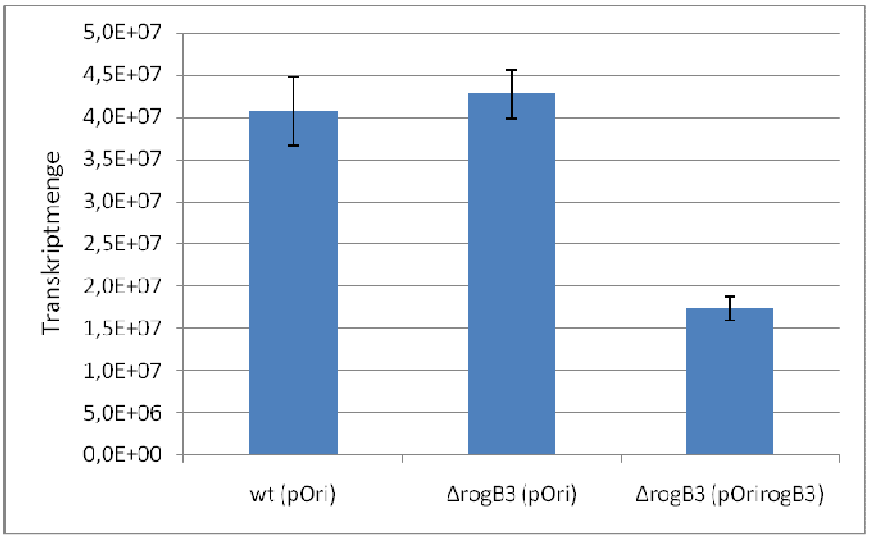


Abbildung 22: Untersuchung des Einflusses von RogB3 auf die Expression von *fbsA* mittels quantitativer Real-time PCR mit den *fbsA*- spezifischen Primern FbsAluc1 und FbsAluc2

Wie aus **Abbildung 22** ersichtlich ist, hat die Deletion des *rogB3*- Gens keinen Einfluss auf die Expression von *fbsA* bei einer optischen Dichte von 0,3. Dies lässt vermuten, dass der beobachtete Einfluss von RogB3 auf die Adhärenz von *S. agalactiae* nicht durch das FbsA-Protein vermittelt wird.

3. Funktionelle Charakterisierung des RogB2- Proteins

Hintergrund der im Folgenden beschriebenen Arbeiten sind Untersuchungen von Anja Eichner (2005) und Ulrike Samen (2005) zu dem Regulator RogB2 aus *S. agalactiae* NEM316. Hierbei konnte ein Effekt von RogB2 auf die Virulenz von *S. agalactiae* nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Deletion des *rogB2*- Gens zu einer erhöhten Adhärenz an die Lungenepithelzelllinie A549 und zu einer erniedrigten Adhärenz an die Rachenepithelzelllinie HEp2 führt. Desweiteren zeigte die *rogB2*- Deletionsmutante eine erhöhte Bindung an humanes Fibrinogen und humanes Keratin 4. Diese beschriebenen Effekte konnten durch Einbringen eines Plasmid codierten *rogB2*- Gens wieder auf Wildtypniveau komplementiert werden. Des Weiteren konnte mittels quantitativer Real-time PCR nachgewiesen werden, dass RogB2 die Expression von bekannten Virulenzgenen beeinflusst. Dabei konnte eine Verminderung der Expression von *srr1* (Samen et al, 2007) und *sapA* (Lauer et al, 2005; Dramsi et al 2006; Maisey et al, 2007) in der *rogB2*-Deletionsmutante nachgewiesen werden. Desweiteren wurde die Bedeutung von RogB2 für die Expression von *fbsA* (Schubert et al 2002 und 2004) untersucht. In dieser Studie fand Anja Eichner (2005) einen negativen Einfluss von *rogB2* auf die *fbsA* Expression, wo hingegen Ulrike Samen (2005) keinen signifikanten Einfluss feststellte.

Ziel der folgenden Arbeit war die Herstellung und Aufreinigung eines RogB2-Fusionsproteins, sowie dessen Charakterisierung bezüglich der DNA- Bindefähigkeit an die Promoterregionen der Gene *srr1*, *sapA* und *fbsA* mittels EMSA (`Electrophoretic mobility shift assay´).

3.1. Herstellung eines RogB2- Fusionsproteins

Zur funktionellen Charakterisierung des RogB2- Proteins wurde dieses als Fusionsprotein rekombinant mit einem Hexahistidyl- Rest am C- terminalem Ende hergestellt. Hierfür wurde das *rogB2*- Gen in den Überexpressionsvektor pET28a kloniert und in den Expressionstamm *E. coli* ER2566 transformiert. Der rekombinante Stamm *E. coli* ER2566 pET28*rogB2* lag zu Beginn dieser Arbeit bereits vor (Eichner, 2005). Zur Aufreinigung des Proteins wurde der Stamm *E. coli* ER2566 pET28*rogB2* zunächst für 3 h bei 28 °C bis zu einer optischen Dichte von etwa 0,8 wachsen gelassen und anschließend die Expression des *rogB2*- Gens mittels

Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach Induktion erfolgte das Wachstum bei 18 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Kultur abzentrifugiert und das erhaltene Zellpellet mittels French Press aufgeschlossen. Der erhaltene Zellextrakt wurde abzentrifugiert und das im Überstand befindliche RogB2- Protein über eine Ni^{2+}- NTA- Säule aufgereinigt. Die Elution von RogB2 erfolgte mit 350 mM Imidazol. Zur Beseitigung des Imidazols erfolgte die Aufreinigung über eine PD10- Säule, welche nach dem Prinzip der Gelfiltration das Imidazol von dem RogB2- Protein trennt. In **Abbildung 23** ist der Nachweis der Aufreinigung mittels eines Coomassie- gefärbten SDS- Polyacrylamidgels und einer Western Blot- Analyse mit Anti- HisTag- Antikörpern und Peroxidase gekoppeltem Zweitantikörper dargestellt. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz.

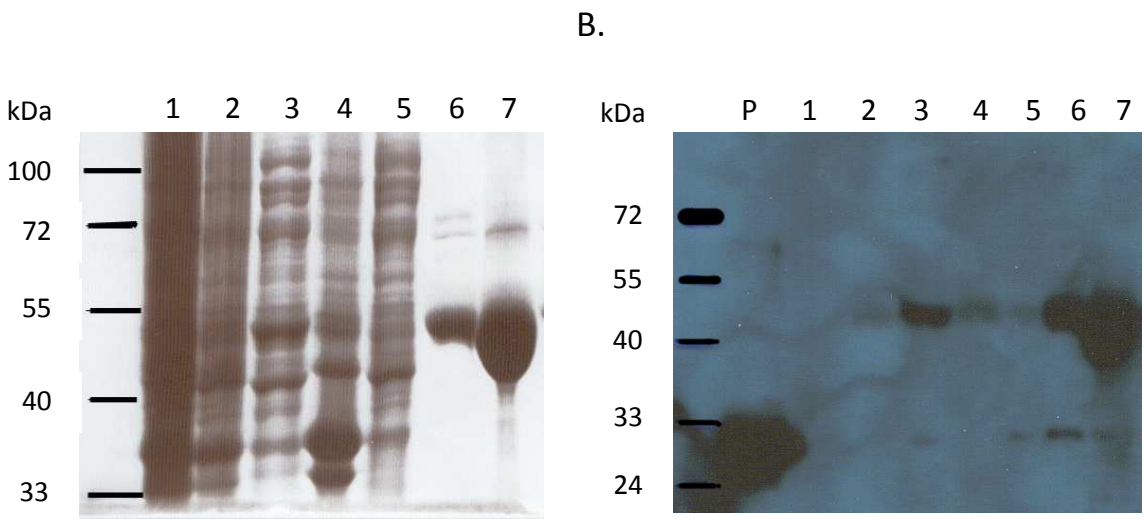


Abbildung 23: SDS- PAGE zum Nachweis der Aufreinigung des RogB2- Fusionsproteins in *E. coli* ER2566 mittels Coomassie- Färbung (A) und Western Blot- Analyse mit Anti- HisTag- Antikörpern und Peroxidase gekoppelten Ziege- Anti- Maus- Antikörpern (B). Dargestellt ist die Positivkontrolle FbsB-C (P), Zellextrakt von *E. coli* ER2566 pET28*rogB2* vor Induktion (1) und nach Induktion (2); Pellet (3) und Überstand (4) nach French Press- Zellaufschluss; Durchfluss (5) nach Ni^{2+}- NTA- Affinitätschromatographie, sowie die Elutionsfraktion von RogB2 mit 350 mM Imidazol (6) und nach Aufreinigung über die PD10- Säule (7)

Wie aus **Abbildung 23** zu entnehmen ist, konnte das Fusionsprotein RogB2 mit einer Größe von 56 kDa erfolgreich in *E. coli* ER2566 pET28*rogB2* induziert und mittels Ni^{2+}- NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden.

3.2. Untersuchung der DNA- Binderegion von RogB2 mittels EMSA (`Electrophoretic mobility shift assay´)

In vorangegangen Untersuchungen mittels quantitativer Real- time- PCR konnte gezeigt werden, dass RogB2 die Expression von *sapA* und *srr1* beeinflusst (Eichner, 2005; Samen, 2005). Zusätzlich konnte Anja Eichner zeigen, dass in einer *rogB2*- Deletionsmutante die Expression des *fbsA*- Gens erhöht ist. Somit liegt die Vermutung nahe, dass RogB2 die Expression über eine direkte Bindung an die Promoterregionen der untersuchten Gene beeinflusst. Um dies näher zu untersuchen, wurden EMSAs mit den Promoterregionen der Gene *sapA*, *srr1* und *fbsA* mit Hilfe des aufgereinigten Fusionsproteins RogB2 durchgeführt. Hierfür wurden die Promoterregionen der genannten Gene mittels PCR aus chromosomaler DNA von *S. agalactiae* NEM316 amplifiziert und mit aufsteigenden Konzentrationen an RogB2- Fusionsprotein inkubiert. Der Probenansatz wurde anschließend auf ein Agarosegel geladen und die Retardation der Banden durch Färbung mit Ethidiumbromid auf dem UV-Schirm sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle wurde ein geninterner Bereich des *cpsA*- Gens sowie 1 µg BSA eingesetzt. In den **Abbildungen 24-26** sind die jeweiligen Untersuchungen der einzelnen Promoterregionen, sowie die Lokalisation der DNA- Sonden dargestellt.

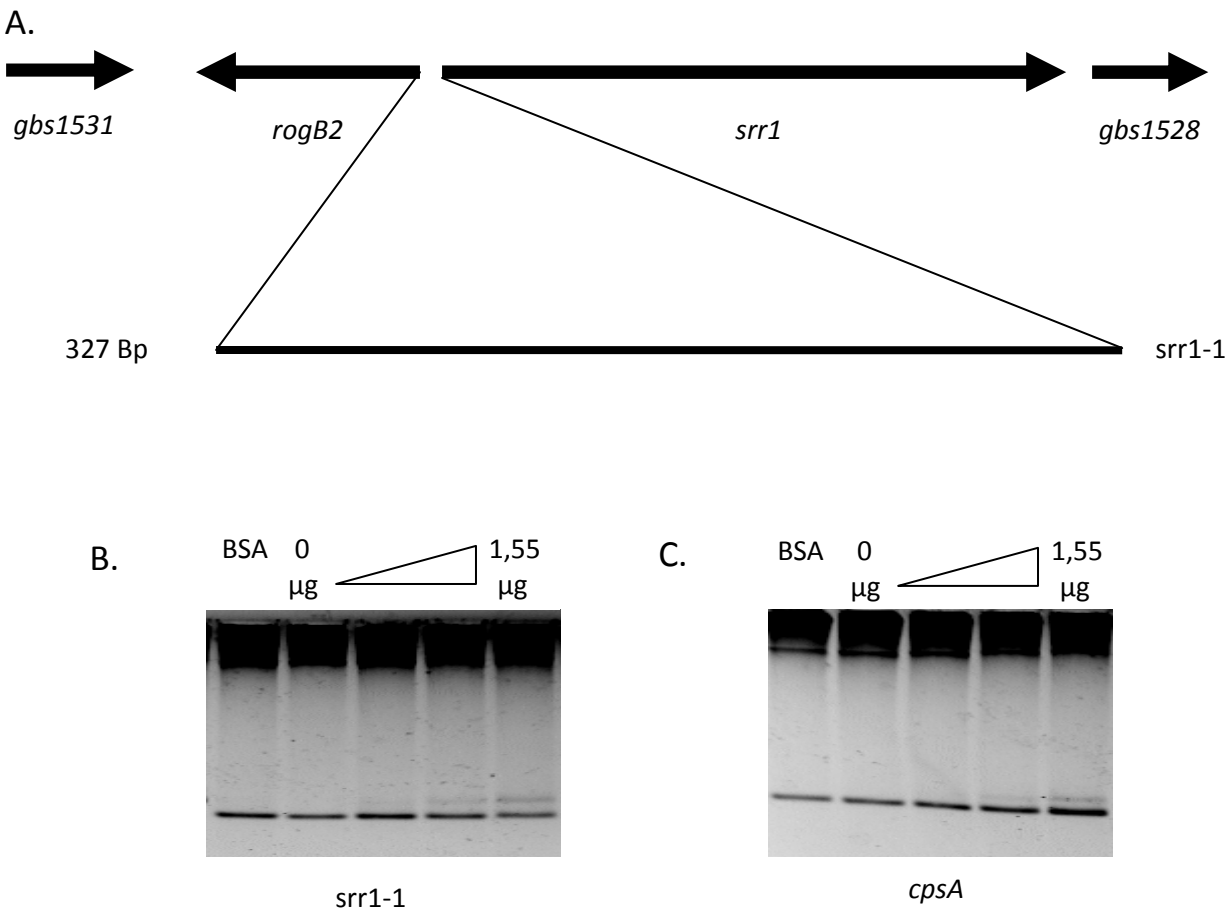
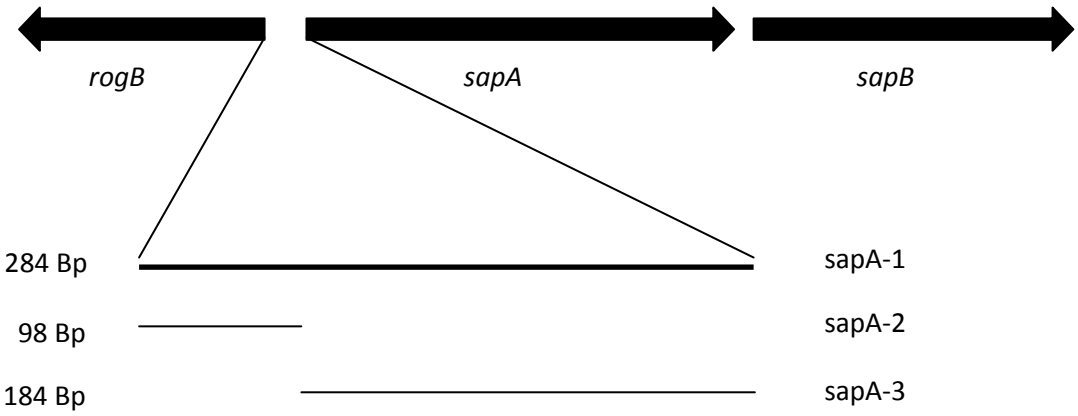


Abbildung 24: Schematische Darstellung des *srr1*- intergenen Bereiches sowie der DNA-Sonde srr1-1 (A); EMSAs zur Überprüfung der Bindung des Regulators RogB2 an die Sonde srr1-1 mit aufsteigender Proteinkonzentration (B) sowie die Bindung an den geninternen Bereich des *cpsA*- Gens als Negativkontrolle (C)

Wie aus **Abbildung 24** ersichtlich konnte eine leichte unspezifische Retardation in der DNA-Sonde des geninternen Bereichs des *cpsA*- Gens nachgewiesen werden. Diese Retardation ist auch in der Sonde srr1-1 zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass RogB2 nicht spezifisch an die Promoterregion des *srr1*- Gens bindet und dass dessen Expression indirekt von RogB2 beeinflusst wird.

A.



B.

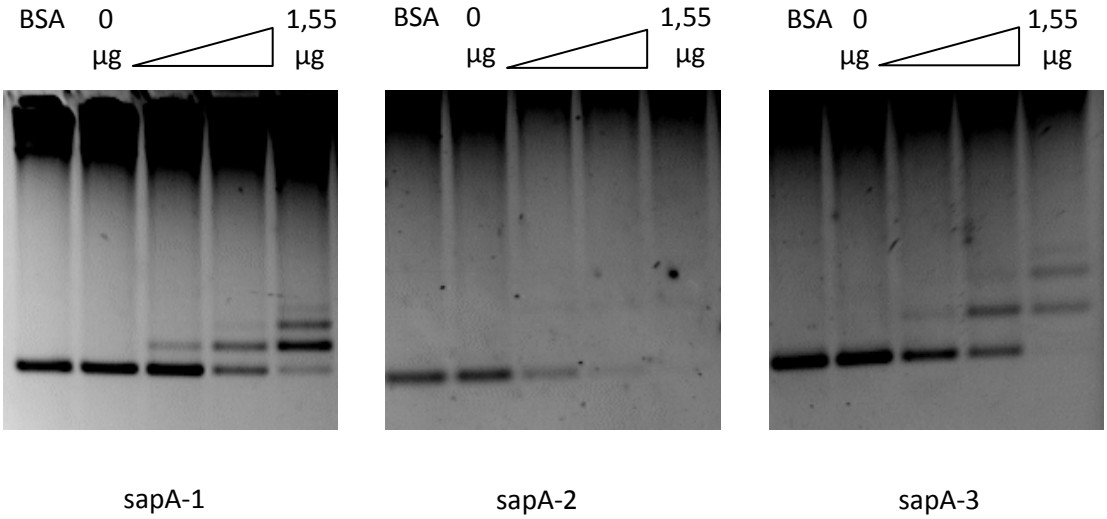
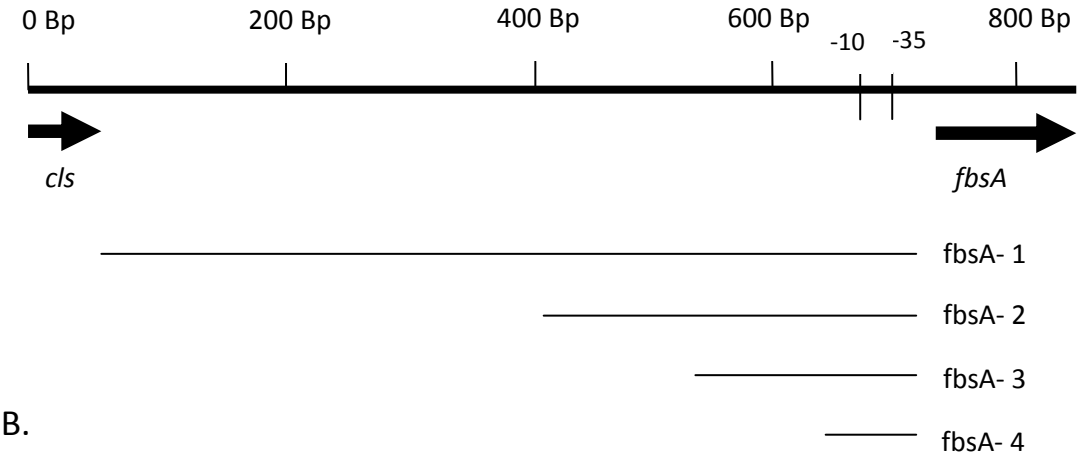


Abbildung 25: Schematische Darstellung der *sapA*- Promoterregion sowie der DNA- Sonden sapA-1, sapA-2 und sapA-3 (A); EMSAs zur Überprüfung der Bindung des Regulators RogB2 in aufsteigender Proteinkonzentration an die Sonden sapA-1, sapA-2 und sapA-3 (B)

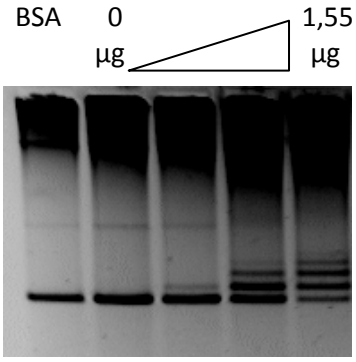
Wie in **Abbildung 25** zu erkennen ist, bindet RogB2 an die Promoterregion von *sapA*. Dabei konnte eine starke Bindung an das Fragment sapA-1 festgestellt werden. Durch Synthese kleinerer Sonden innerhalb der Promoterregion von *sapA* sollte die Binderegion näher eingegrenzt werden. Dabei konnte eine schwache Bindung an die Sonde sapA-2 nachgewiesen werden, was sich im EMSA durch Abnahme des Sondensignals zeigt. Die starke Bindung an das Fragment sapA-3 und das Vorhandenseins mehrerer retardierter Banden lassen den Schluss zu, dass sich eine oder mehrere Bindestellen auf dem 184 Basenpaar großen Bereich vor dem *sapA*- Gen befinden. Somit liegt die Vermutung

nahe, dass RogB2 über direkte Bindung an die Promoterregion Einfluss auf die Expression von *sapA* hat.

A.

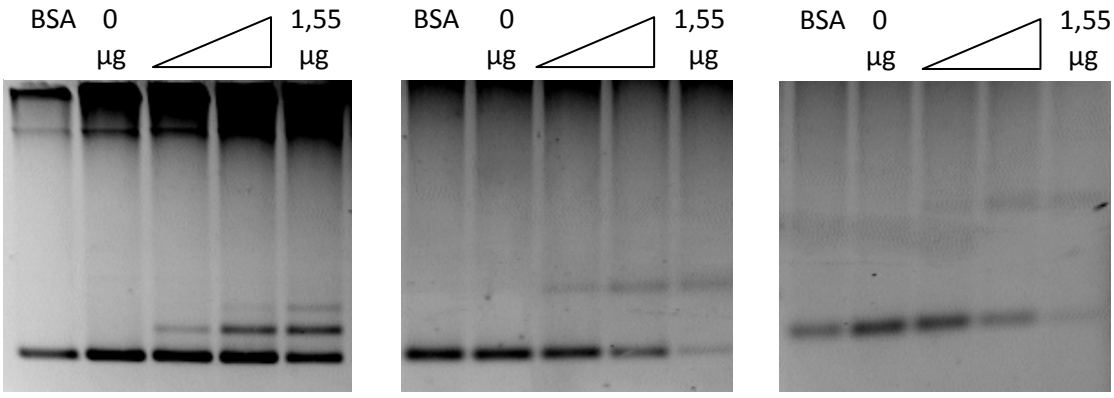


B.



fbsA-1

C.



fbsA-2 fbsA-3 fbsA-4

Abbildung 26: Schematische Darstellung der *fbsA*- Promoterregion sowie der DNA- Sonden fbsA-1, fbsA-2, fbsA-3 und fbsA-4 (A); EMSAs zur Überprüfung der Bindung des Regulators RogB2 in aufsteigender Proteinkonzentration an die Sonden fbsA-1 (B), fbsA-2, fbsA-3 und fbsA-4 (C)

Wie in **Abbildung 26** zu erkennen ist, bindet RogB2 an die Promoterregion des *fbsA*- Gens. Dabei konnte eine eindeutige Bindung an die Sonden fbsA-1 und fbsA-2 nachgewiesen werden. Die Bindung an die beiden kleineren Sonden fbsA-3 und fbsA-4 sind nicht so eindeutig ausgeprägt, so dass vermutet werden muss, dass sich die Hauptbinderegion auf dem Fragment fbsA-2 befindet. Aufgrund des Vorhandenseins mehrerer retardierter Banden kann vermutet werden, dass sich mehrere Bindemotive für RogB2 in der *fbsA*- intergenen Region befinden. Zur weiteren Eingrenzung des DNA- Bindemotives könnten weitere EMSA-Studien mit kleineren Fragmenten der hier getesteten DNA- Sonden beitragen.

Anhand der durchgeführten Retardationsexperimente konnte die DNA- Bindefähigkeit des Regulators RogB2 nachgewiesen werden. Dabei ist aus den Ergebnissen abzuleiten, dass RogB2 einen direkten Einfluss auf die Expression der Gene *sapA* und *fbsA* hat, sowie keinen direkten Einfluss auf die Expression von *srr1.*

4. Bedeutung des *fbsB4*- Gens für die Virulenz von *Streptococcus agalactiae* Gi7

Den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen über die Bedeutung des *fbsB*- Gens aus *S. agalactiae* Gi7 liegen Ergebnisse vorangegangener Arbeiten zu Grunde (Gutekunst et al, 2004; Schaller, 2005). Hierbei konnte gezeigt werden, dass das FbsB- Protein in *S. agalactiae* in mindestens vier verschiedenen Varianten (FbsB1-4) auftritt, wobei das C- terminale Ende in allen untersuchten Varianten identisch ist und sich lediglich ein N- terminaler Bereich in der Aminosäuresequenz und Länge unterscheidet. Die Proteine FbsB1, FbsB3 und FbsB4 wurden bereits hinsichtlich ihrer Eigenschaft als Fibrinogen- bindende Proteine charakterisiert (Gutekunst et al, 2004; Schaller 2005). Des Weiteren wurden Deletionsmutanten für die beiden Gene *fbsB1* und *fbsB2* hergestellt und hinsichtlich ihrer Fibrinogenbindung und Adhärenz bzw. Invasion an bzw. in eukaryotische A549-Lungenepithelzellen beschrieben. Die Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen war durch die Deletion in beiden Fällen nicht beeinflusst. Im Adhärenz- und Invasionsverhalten konnten Unterschiede im Verhalten der einzelnen Deletionsmutanten festgestellt werden. Während die Deletion von *fbsB1* im Stamm *S. agalactiae* 6313 zu keiner veränderten Adhärenz, aber zu einer Verringerung der Invasion in A549- Zellen führte, resultierte die

Deletion von *fbsB2* im *S. agalactiae*- Stamm Gi736/52 in einer verringerten Adhärenz an A549- Zellen. Dieses unterschiedliche Verhalten ist vermutlich auf die Unterschiede im N-terminalen Ende des Proteins zurückzuführen, so dass es von Interesse ist, die weiter vorhandenen FbsB- Varianten auf die Bedeutung für die Virulenz von *S. agalactiae* zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde eine *fbsB4*- Deletionsmutante im *S. agalactiae*- Stamm Gi7 hergestellt und hinsichtlich ihrer Fibrinogenbindung und ihrer Adhärenz und Invasion an bzw. in die Lungenepithelzelllinie A549 untersucht.

Herstellung einer definierten *fbsB4*- Deletionsmutante

Das zur Herstellung der *fbsB4*- Deletionsmutante benötigte temperatursensitive Deletionsplasmid pGΔ*fbsB* lag zu Beginn der Arbeit vor (Gutekunst et al, 2004) und wurde in den *S. agalactiae*- Stamm Gi7 transformiert. Anschließend erfolgte die Selektion positiver Klone auf THY/Erythromycin- Platten bei 30 °C. Durch Erhöhung der Temperatur auf 39 °C wurde auf jene Klone selektioniert, welche das Plasmid durch eine erste homologe Rekombination in die chromosomale DNA integriert hatten. Anschließend erfolgte eine 10- tägige Passage der Kultur bei 30 °C ohne Erythromycin- Zugabe um das Wachstum derjenigen Klone zu begünstigen, welche das Plasmid über eine zweite homologe Rekombination wieder ausgeschleust haben. Durch das Ausplattieren verschiedener Verdünnungen auf THY- Platten ohne und mit Erythromycin konnten Klone erhalten werden, die Erythromycin- sensitiv waren und somit potentielle Deletionsmutanten darstellten. Der Nachweis der Deletion erfolgte mittels PCR mit den Primern sfbX_lacI und sapC_pstI2 und Southern Blot- Analyse (**Abbildung 27**). Hierfür wurde chromosomale DNA aus *S. agalactiae* Gi7 isoliert und mit *Nco*I verdaut. Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese und der Transfer auf eine Nylonmembran. Die Detektion der Deletion erfolgte mit einer Digoxigenin- markierten Sonde und Peroxidase gekoppelten Anti-Digoxigenin- Antikörpern mittels Chemilumineszenz.

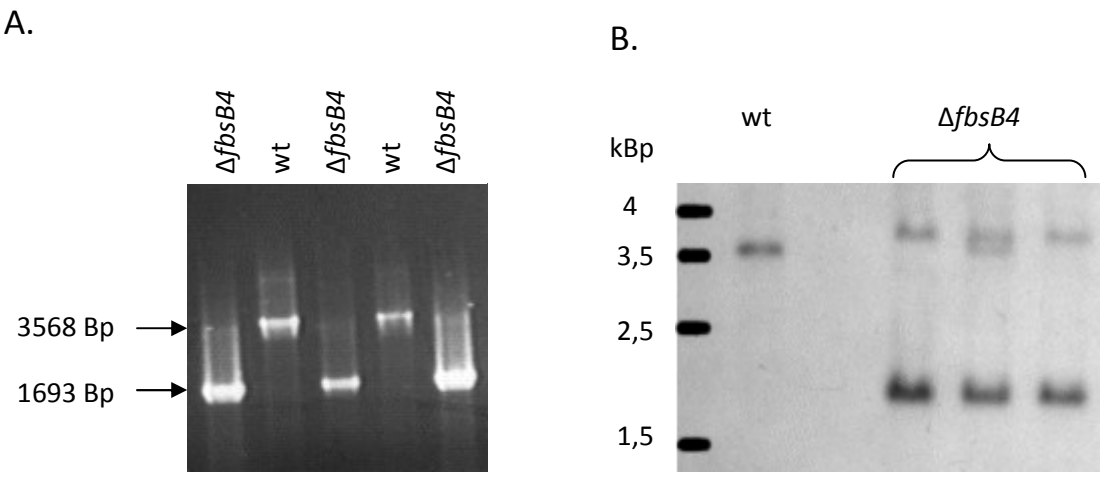


Abbildung 27: Nachweis der Deletion von *fbsB4* in *S. agalactiae* Gi7 mittels PCR (A.) und Southern Blot Analyse (B.). Der Nachweis mittels PCR erfolgte durch Amplifikation mit den *fbsB4* flankierenden Primern sfbX_lacI und sapC_pstI2; Zum Nachweis der Deletion mittels Southern Blot wurde chromosomale DNA mit *Nco*I verdaut, gelelektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Bindung einer Digoxigenin- markierten Sonde wurde mit einem Peroxidase gekoppelten Anti- Digoxigenin Antikörper mittels Chemilumineszenz detektiert.

Die mit *Nco*I verdaute chromosomale DNA von *S. agalactiae* Gi7 wt zeigte im Southern Blot ein Signal bei ca. 3600 Bp, während die chromosomale DNA der *fbsB4*- Mutante ein Signal bei ca. 1700 Bp lieferte (**Abbildung 4**). Die Deletion resultiert in den Verlust von 1875 Bp, so dass davon auszugehen ist, dass die Deletion von *fbsB4* erfolgreich war. Der resultierende *S. agalactiae*- Stamm wurde mit Gi7 Δ*fbsB4* bezeichnet.

Herstellung des Komplementationsplasmides pOri*fbsB4*

Zur Komplementation des *fbsB4*- Defekts in *S. agalactiae* Gi7, wurde das *fbsB4*- Gen mit den Primern fbsB_komp1a und fbsB_komp2 mittels PCR mit chromosomaler DNA aus *S. agalactiae* Gi7 amplifiziert, das *Bam*HI/*Pst*I- verdaute Produkt in den ebenfalls *Bam*HI/*Pst*I- verdauten Vektor pOri23 ligiert und in *E. coli* DH5α transformiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte auf LB/Erythromycin- Platten. Das resultierende Plasmid wurde als pOri*fbsB4* (**Abbildung 28**) bezeichnet und in den *S. agalactiae*- Stamm Gi7 Δ*fbsB4* transformiert. Als

Kontrolle wurde zusätzlich das Plasmid pOri23 in die *S. agalactiae*- Stämme Gi7 und Gi7 Δ*fbsB4* transformiert.

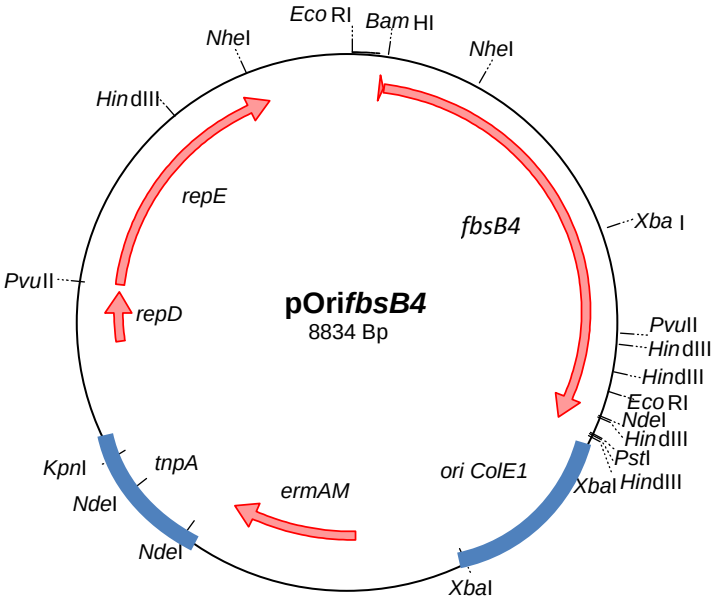


Abbildung 28: Restriktionskarte des Komplementationsplasmides pOri*fbsB4*

Bedeutung von FbsB4 für die Bindung von *S. agalactiae* Gi7 an humanes Fibrinogen

Wie bereits beschrieben, stellt die Bindung von *S. agalactiae* an humanes Fibrinogen einen wichtigen Virulenzfaktor dar. Für die Deletionsmutanten *S. agalactiae* 6313 Δ*fbsB1* und Gi736/52 Δ*fbsB2* konnte bereits gezeigt werden, dass diese in der Bindung an humanes Fibrinogen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert sind (Gutekunst et al, 2004; Schaller 2005). Da die Fähigkeit des aufgereinigten FbsB4- Proteins an humanes Fibrinogen zu binden bereits untersucht worden war (Schaller, 2005), sollte nun der Einfluss der *fbs4*- Deletion auf die Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen untersucht werden (**Abbildung 29**). Hierfür wurden 96- Well Platten mit humanem Fibrinogen über Nacht beschichtet. Nach dem Blocken mit 10 % BSA- Lösung wurden die FITC- markierten *S. agalactiae*- Stämme Gi7 und Gi7 Δ*fbsB4* zugegeben, nach 1 h die Wells gewaschen und die Bindung anhand der Fluoreszenz im Cytofluor gemessen. Dabei wurde die gemessene Menge an Bakterien in Relation zu der eingesetzten Menge Bakterien gesetzt.

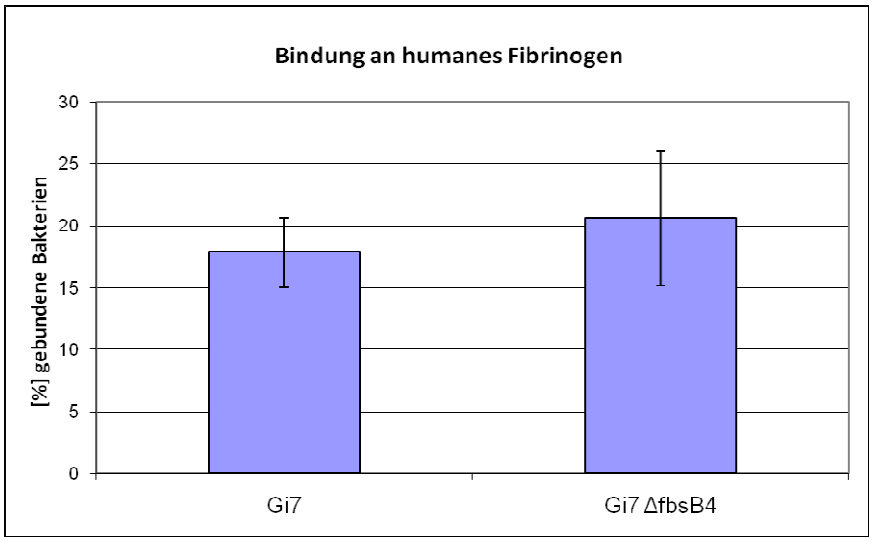


Abbildung 29: Bindung von FITC-markierten *S. agalactiae* Gi7 und Gi7 Δ*fbsB4* an humanes Fibrinogen

Wie in **Abbildung 29** zu erkennen ist, führt die Deletion von *fbsB4* zu keiner signifikanten Änderung der Fähigkeit von *S. agalactiae* Gi7 an humanes Fibrinogen zu binden. Dies lässt die Vermutung zu, dass FbsB4 nicht an der Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen beteiligt ist.

Bedeutung von FbsB4 für die Adhärenz und Invasion an bzw. in die humane Lungenepithelzellline A549

Für die Deletionsmutanten *S. agalactiae* 6313 Δ*fbsB1* und Gi736/52 Δ*fbsB2* konnte bereits gezeigt werden, dass die Invasion durch *fbsB1* (Gutekunst et al, 2004) und die Adhärenz durch *fbsB2* (Schaller, 2005) in bzw. an A549 Lungenepithelzellen beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden Adhärenz- und Invasionsversuche mit den *S. agalactiae*- Stämmen Gi7 und Gi7 Δ*fbsB4* durchgeführt (**Abbildung 30**). Hierfür wurden eukaryotische A549 Lungenepithelzellen in 24- Well Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 ausdifferenziert. Am nächsten Tag wurden Bakterien einer bestimmten optischen Dichte zugegeben und für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl gebundener Zellen mittels Ausplattieren von Verdünnungen auf THY- Platten bestimmt und in Relation zu der Gesamtzahl an Bakterien nach zweistündiger Inkubation gesetzt.

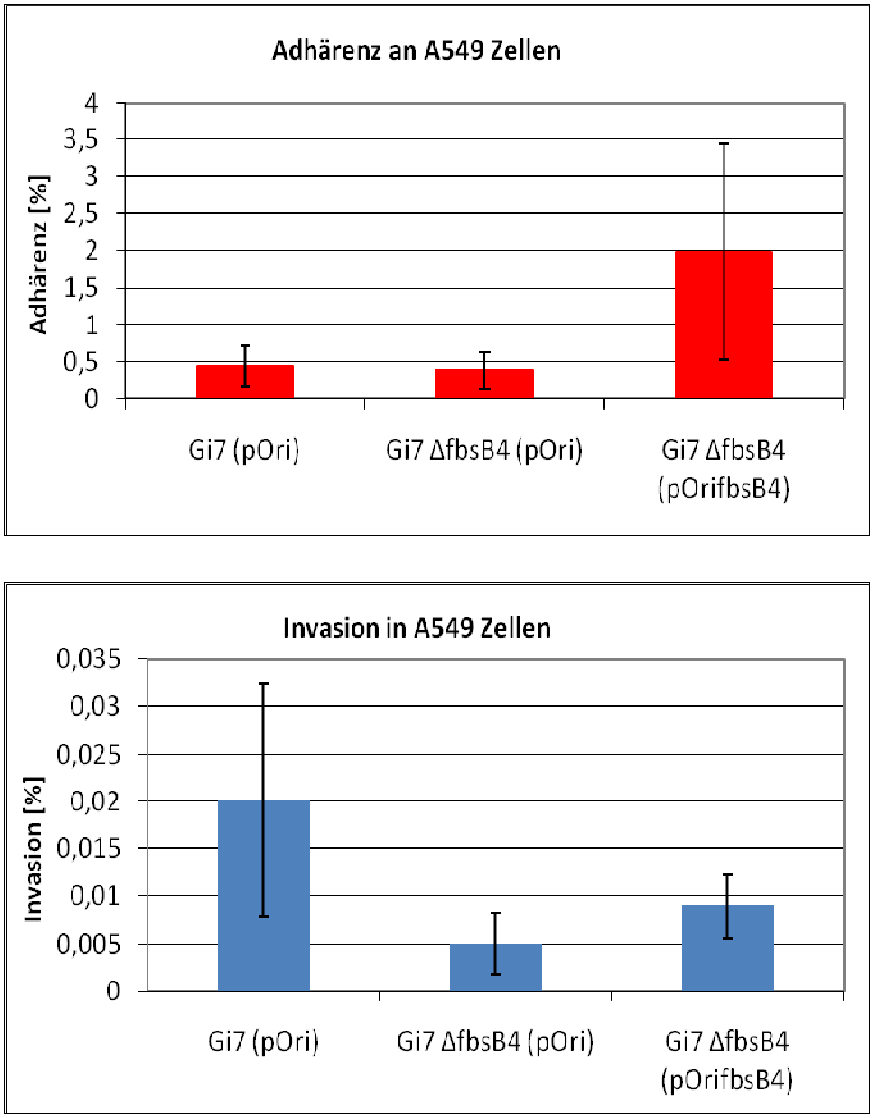


Abbildung 30: Adhärenz- und Invasionsverhalten der *S. agalactiae*– Stämme Gi7 und Gi7 Δ*fbsB4* an bzw. in die humane Lungenepithelzelllinie A549. Angegeben ist der jeweilige prozentuale Anteil adhärierter bzw. invadierter Zellen bezogen auf die Zahl der Bakterien nach zweistündiger Inkubation mit den eukaryotischen Zellen.

Wie aus **Abbildung 30** ersichtlich ist, zeigt die *fbsB4*- Deletionsmutante mit einer Adhärenz von 0,37 % keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp mit 0,43 %. Hingegen ist die Invasion in der Mutante mit 0,005 % im Vergleich zum Wildtyp mit 0,02 % signifikant erniedrigt. Dieser Effekt konnte durch Einbringen des Plasmid codierten *fbsB4*- Gens wieder regeneriert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass FbsB4 Einfluss auf die Invasion in *S. agalactiae* Gi7 nimmt. Somit zeigten die beiden FbsB- Varianten FbsB1 und FbsB4 Einfluss auf die Invasion der Bakterien in A549- Zellen, während FbsB2 Einfluss auf die Adhärenz von *S. agalactiae* an eukaryotische Epithelzellen hat.

IV. Diskussion

Streptococcus agalactiae, zur serologischen Gruppe B der Streptokokken zählend, ist ein natürlicher Besiedler des menschlichen Urogenitaltraktes (Saylers & Whitt, 2002). Zugleich gilt *S. agalactiae* als Hauptursache invasiver Infektionen bei Neugeborenen, wie Sepsen, Pneumonien und Meningitiden (Barton et al, 1973; Franciosi et al, 1973; Hahn, 1991; Kayser, 1998, Schuchat et al, 1998; Spellerberg, 2000; Doran et al, 2003; Doran and Nizet, 2004; Hanley, 2006). Die Übertragung der Bakterien auf den Fötus erfolgt über die Plazentamembran bzw. durch Verschlucken kontaminierter Amnionflüssigkeit bei der Geburt (Hickman et al, 1999; Spellerberg, 2000; Doran & Nizet, 2004; Liu et al, 2004). In letzter Zeit gewinnt *S. agalactiae* zunehmend an Bedeutung bei der Infektion von immunsupprimierten oder älteren Erwachsenen (Farley et al, 1995 und 2001; Jackson et al, 1995; Edwards & Baker, 2005). Derzeit werden *S. agalactiae*- Infektionen mittels Antibiotika- Gabe therapiert, wobei das Auftreten von Resistenzen und Unverträglichkeitsreaktionen (Lim et al, 1986; Kayser et al; 1998; Pearlman et al, 1998; Baltimore et al, 2001; Bland et al, 2001; Daley et al, 2004; Apgar et al, 2005) zu Problemen führen kann. Zur Entwicklung neuer Therapeutika bzw. Vakzine gegen *S. agalactiae*- Infektionen bedarf es eines besseren Verständnis der Virulenzmechanismen dieser Bakterien. Dabei spielen insbesondere Regulationsvorgänge eine große Rolle, mit deren Hilfe sich *S. agalactiae* an seine Umgebung anpasst.

Die Fähigkeit von *S. agalactiae,* Gewebe zu kolonisieren und Infektionen auszulösen bedarf eines regulatorischen Netzwerkes, welches auf Signale einer sich verändernden Umwelt reagieren kann. Einige Regulationsmechanismen, welche die Virulenz von anderen pathogenen Bakterien wie z. B. *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* oder *Vibrio cholerae* beeinflussen sind bereits charakterisiert worden (DiRita und Mekalanos, 1989; DiRita et al, 2000, Gutekunst et al, 2003; Kreikemeyer et al, 2003; Paterson et al, 2006; Ribardo et al, 2006; Samen et al, 2006; Churchward et al, 2007; Matson et al, 2007). Auch in *S. agalactiae* wurden bereits verschiedene Virulenzregulatoren untersucht (Paoletti et al, 1996; Ross et al, 1999; Koskiniemi et al, 1998; Cieslewicz et al, 2001; Poyart et al, 2001; Spellerberg et al, 2002; Gutekunst et al, 2003; Johri et al, 2003 und 2005; Shelver et al, 2003; Rajagopal et al, 2003 und 2005-2006; Lamy et al, 2004; Jiang et al, 2005; Samen et al, 2006). Neben verschiedenen Transkriptionsregulatoren wie z.B. RogB (Gutekunst et al, 2003), RovS

(Samen et al, 2006) oder MsmR (Heinz, Diplomarbeit 2006), ist auch das Zwei-Komponenten- System CovR/CovS von Bedeutung für die Virulenz von *S. agalactiae* (Lamy et al, 2004). Ebenso spielen Bedingungen wie die Wachstumsrate (Paoletti et al, 1996; Ross et al, 1999) oder die Anwesenheit von Sauerstoff (Johri et al, 2003) eine Rolle bei der Regulation der Virulenz in *S. agalactiae*.

Der in dieser Arbeit untersuchte putative Transkriptionsregulator Rgg3 zeigt Ähnlichkeiten zu Transkriptionsregulatoren der Rgg- Familie. Hierzu gehört u.a. das bereits charakterisierte Rgg/RopB aus *Streptococcus pyogenes* (Chaussee et al, 1999 und 2001-2002; Kreikemeyer et al, 2003; Neely et al, 2003), welches Einfluss auf die Expression verschiedener Virulenzgene hat und Teil des regulatorischen Netzwerkes von *S. pyogenes* in der stationären Phase ist (Kreikemeyer et al, 2003). Eines der Rgg- kontrollierten Gene ist *speB*, welches für eine Cystein- Protease bzw. das so genannte pyrogene Exotoxin B kodiert. SpeB als Laminin-, Glycoprotein- und Fibronektin- bindendes Protein (Hytönen et al, 2001 und 2003; Nyberg et al, 2004) ist ein wichtiger Virulenzfaktor in *Streptococcus pyogenes* und spielt eine Rolle bei der Internalisierung der Bakterien (Tsai et al, 1998; Chaussee et al, 2000; Jadoun et al, 2002; Nyberg et al, 2004) und bei der Modulation des Immunsystems (Lukomski et al, 1999; Collin et al, 2001-2002; Eriksson et al, 2003; Wei et al, 2005; Chiang et al, 2006). Zusätzlich besitzt SpeB Protease- Aktivität (Ohara- Nemoto et al, 1994), was zum Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix führt (Kapur et al, 1993). Ein direkter Einfluss von SpeB auf die Adhärenz der Bakterien an humane Zellen konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Hytönen et al, 2006).
Die Expression des Glycoprotein- bindenden Proteins PulA wird ebenfalls von Rgg beeinflusst (Hytönen et al, 2003; van Bueren et al, 2007). PulA zeigt Streptadhesin- Aktivität und erhöht die Adhärenz der Bakterien an humane Zellen (Hytönen et al, 2006).
Neben Rgg aus *Streptococcus pyogenes* wurde ein weiterer Rgg- ähnlicher Regulator aus *Streptococcus gordonii* charakterisiert, der ebenfalls den Namen Rgg trägt (Sulavic et al, 1992 und 1996; Vickerman 1995; Vickerman et al, 2002). In *S. gordonii* reguliert Rgg die Transkription des *gtfG*- Gens, welches für eine Glucosyltransferase kodiert, die das Polymer Glucan aus Saccharoseeinheiten bildet und zur Akkumulation der Bakterien auf Zähnen führt (Vickerman et al, 1991 und 1997; Vickerman et al, 2002).

Die Bedeutung und Funktion des *rgg3*- Gens aus *S. agalactiae* war zum Beginn dieser Arbeit noch nicht untersucht.

Neben *gbs2117* aus *S. agalactiae* NEM316, welches dem in dieser Arbeit untersuchtem *rgg3* in *S. agalactiae* 6313 entspricht, wurden in den veröffentlichten Genomsequenzen (Glaser et al, 2002, Tettelin et al, 2002 und 2005) von *S. agalactiae* zwei weitere Gene für putative Transkriptionsregulatoren der Rgg- Familie identifiziert. Eines der Gene entspricht dem von Samen et al (2006) beschriebenen *rovS*, dessen Deletion eine erhöhte Adhärenz an humane Lungenepithelzellen und eine erhöhte Bindung an humanes Fibrinogen hervorruft. Das in dieser Arbeit untersuchte *rgg3*- Gen zeigt ebenfalls in der Deletionsmutante eine signifikant erhöhte Adhärenz an humane Lungen- und Rachenepithelzellen und eine erhöhte Fähigkeit der Bakterien an humanes Fibrinogen zu binden. Diese Effekte konnten durch Einbringen eines Plasmid codierten *rgg3*- Gens wieder rückgängig gemacht werden. Die erhaltenen Ergebnisse lassen somit vermuten, dass Rgg3 als Repressor Einfluss auf die Bindung der Bakterien an eukaryotische Zellen und Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) hat.

Die Kolonisierung des weiblichen Urogenitaltraktes durch *S. agalactiae* ist ein bedeutender Risikofaktor für eine Infektion der Neugeborenen durch diese Bakterien (Pass et al; 1979). Dabei spielt die Fähigkeit der Streptokokken an epitheliale und endotheliale Zellen zu adhärieren und in diese einzudringen eine zentrale Rolle (Zewaneh et al, 1979; Broughton et al, 1983; Jelinkova et al, 1986; Teti et al, 1987; Wibawan et al, 1992; Kallman et al, 1993; Tamura et al, 1994; Spellerberg, 2000; Boyle & Finlay 2003). Die erhöhte Adhärenz sowohl an A549- als auch an HEp2- Zellen in der *rgg3*- Deletionsmutante lassen den Schluss zu, dass Rgg3 wichtig für die Anheftung der Bakterien an humane Epithelien ist, aber beim Eindringen in eukaryotische Zellen keine Rolle spielt.

Für die Anheftung an und das Eindringen in epitheliale Zellen ist die Wechselwirkung der bakteriellen Oberfläche mit wirtsspezifischen Strukturen von zentraler Bedeutung. Die Beteiligung von Lipoteichonsäuren (Nealon et al, 1984 und 1985; Teti et al, 1987; Goldschmidt et al, 1984; Hasty et al, 1992) und Pili (Dramsi et al, 2006; Maisey et al, 2007) als direktes Bindeglied zwischen eukaryotischen Zellen und Streptokokken ist schon mehrfach diskutiert worden. Die Vermittlung der Adhärenz über Adhäsine stellt einen weiteren Mechanismus der Anheftung für pathogene Bakterien dar (Bulgakova et al, 1986; Hasty et al, 1992; Cue et al, 1998; Peacock et al, 1999; Courtney et al, 2002; Bröker and Spellerberg, 2004; Lindahl et al, 2005; Santi et al, 2007). Adhäsine interagieren mit

Strukturen der Wirtszelle und Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) wie Fibrinogen, Fibronektin, Keratin, Kollagen, Laminin bzw. Vitronektin und bewerkstelligen so die Adhärenz der Bakterien an eukaryotische Kompartimente (Mamo et al, 1987; Kostrzynska et al, 1992; Wang et al 1994; Spellerberg et al, 1999; Cunningham 2000; Beckman et al, 2002; Schubert et al, 2002; Tamura et al, 2002, Gutekunst et al, 2004; Samen et al, 2006).

Fibrinogen ist ein 330 kDa großes Glykoprotein bestehend aus sechs Untereinheiten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Fuss et al, 2001; Mosesson et al, 2001 und 2005; Weisel et al, 2005). Als Bestandteil des Blutplasmas und der extrazellulären Matrix (Hay, 1991; Mosesson et al, 2005) spielt es zum einen eine Rolle in der Adhärenz pathogener Bakterien an Wirtszellen (Courtney et al, 1994; Shenkman et al; 2000; Jonsson et al, 2005) und führt zum anderen durch die Bindung von Fibrinogen auf der Oberfläche der Bakterien zum Schutz der Bakterien vor Opsonophagozytose durch das Immunsystem (Whitnack & Beachey 1982 und 1984- 1985; Chhatwal et al 1985; Poirier et al, 1989; Courtney et al, 1997; Thern et al, 1998; Cunningham, 2000; Ringdahl et al, 2000; Lindahl et al, 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *rgg3* in *S. agalactiae* 6313 zu einer erhöhten Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen führt und dieser Effekt durch Einbringen eines Plasmid codierten *rgg3*- Gens wieder rückgängig gemacht werden konnte.

In *S. agalactiae* sind die beiden Fibrinogen- bindenden Proteine FbsA (Schubert et al 2002 und 2004) und FbsB (Jacobsson et al, 2003; Gutekunst et al, 2004) bekannt. Während FbsB die Invasion der Bakterien in humane Epithelzellen beeinflusst (Gutekunst et al, 2004), bildet FbsA den Hauptfibrinogenrezeptor in *S. agalactiae* (Schubert et al, 2002 und 2004). FbsA ist ein hochrepetitives Protein und trägt eine 35 Aminosäure umfassende Signalpeptidsequenz, eine Membrandomäne und ein LPXTG- Zellwandankermotiv (Schubert et al, 2002). Die Deletion des *fbsA*- Gens in *S. agalactiae* 6313 führt zu einer starken Verminderung der Fibrinogen- Bindungsfähigkeit der Bakterien und zu einer stark reduzierten Adhärenz an die Lungenepithelzelllinie A549. Die in dieser Arbeit untersuchte Adhärenz einer *rgg3*/*fbsA*-Doppelmutante in *S. agalactiae* führte zu einer der *fbsA*- Mutante ähnlich reduzierten Adhärenz an A549- und HEp2- Zellen. Auch die Fibrinogen- Bindefähigkeit war in der Doppelmutante stark vermindert, so dass eine Verbindung zwischen der FbsA- vermittelten Adhärenz und der Rgg3- regulierten Adhärenz anzunehmen ist.

Die Deletion der Regulatoren RovS (Samen et al, 2006) bzw. CovR (Lamy et al, 2004) führt zu einer im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Adhärenz von *S. agalactiae* an humane Epithelzellen. In beiden Fällen kommt es zu einer Hochregulierung der Transkriptmenge des *fbsA*- Gens. Aus diesem Grund wurden quantitative Real- time PCR Experimente zur Analyse des Einflusses von Rgg3 auf die *fbsA*- Expression durchgeführt. Hierbei konnte im Verlauf des Wachstums kein Unterschied in der Expression des *fbsA*- Gens in der *rgg3*- Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Diese Ergebnisse konnten durch Bestimmung der Promoteraktivität des *fbsA*- Gens mittels Reportergenfusion mit dem Gen der β- Galactosidase bestätigt werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass Rgg3 keinen Einfluss auf die Expression des *fbsA*- Gens in *S. agalactiae* hat.

Des Weiteren wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen mit monoklonalen Antikörpern gegen das Oberflächenprotein FbsA die Menge an FbsA auf der Oberfläche der *S. agalactiae*- Stämme 6313 wt pOri, 6313 Δ*rgg3* pOri und 6313 Δ*rgg3* pOri*rgg3* bestimmt. Dabei konnte eine Erhöhung der FbsA- Dichte in der *rgg3*- Deletionsmutante erkannt werden. In der Komplementante hingegen konnte nur wenig FbsA auf der Oberfläche detektiert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass Rgg3 über einen noch nicht bekannten Mechanismus Einfluss auf die Exposition von FbsA auf der Oberfläche der Bakterien nimmt.
Die Verankerung von Proteinen auf der Oberfläche Gram- positiver Bakterien erfolgt durch Sortasen, welche einen wichtigen Virulenzfaktor darstellen (Navarre & Schneewind, 1999; Pallen et al, 2001; Dramsi et al, 2001; van Wely et al, 2001; Comfort et al, 2004; Ton-That et al, 2004; Desvaux et al, 2006; Marraffini et al, 2006; Scott & Barnett, 2006; Vanier et al, 2007). In *S. agalactiae* erfolgt die Abspaltung des LPXTG- Motivs und damit die Verankerung LPXTG- enthaltender Proteine über die Sortase SrtA (Lalioui et al, 2005). Der Einfluss von Rgg3 auf die Expression des *srtA*- Gens wurde mittels quantitativer Real- time PCR ermittelt. Dabei konnte kein Unterschied in der *srtA*- Expression zwischen Wildtyp und *rgg3*- Mutante ermittelt werden. Des Weiteren wurde der Einfluss von Rgg3 auf die Expression von Genen kodierend für putative oder bekannte Oberflächenproteine sowie bekannter Virulenzfaktoren ermittelt (Spellerberg, 2000; Glaser et al, 2000; Liu & Nizet, 2004; Herbert et al, 2004; Lindahl et al, 2005). Dabei konnte ebenfalls kein Einfluss von Rgg3 auf die Transkriptmenge der untersuchten Gene ermittelt werden. Somit ist anzunehmen, dass Rgg3 über einen hier nicht untersuchten Mechanismus die Virulenz von *S. agalactiae* beeinflusst.

Inwiefern Rgg3 die erhöhte Exposition von FbsA auf der Oberfläche von *S. agalactiae* beeinflusst, konnte bisher nicht geklärt werden. Möglicherweise hat Rgg3 Einfluss auf die Expression von Genen, die an der Translokation von FbsA beteiligt sind. Axel Schubert (2002) konnte durch Sequenzanalysen am N- terminalen Ende von FbsA ein putatives Signal- Peptid (Nielsen et al, 1997) identifizieren. Für Gram- positive Bakterien, insbesondere für *Bacillus subtilis,* konnten bereits verschiedene Signal- Peptid abhängige Transportmechanismen identifiziert werden (Tjalsma et al, 2000; van Wely et al, 2001; Buist et al, 2006). Abhängig von der Sequenz des Signalpeptides werden dabei verschiedene Transportmechanismen in Anspruch genommen, wie z.B. das Sec- abhängige und das Sec- unabhängige (Tat = Twin-Arginin Translokation, Pili- Export und ABC- Transporter) Transportsystem (Tjalsma et al, 2000). So wird das Oberflächenprotein GspB, ein putatives Adhäsin aus *Streptococcus gordonii*, über ein Sec- abhängiges System aus der Zelle transportiert. Des Weiteren liegt die Vermutung nahe, dass die Cystein- Protease SpeB aus *Streptococcus pyogenes* ebenfalls Sec-abhängig sezerniert wird (Carlsson et al, 2006). Eine direkte Kolokalisation einer Sec-Translokase und Sortase A in der Cytoplasmamembran von *Streptococcus mutans* konnte erst kürzlich nachgewiesen werden (Hu et al, 2007).

Eine weitere Möglichkeit die erhöhte FbsA- Exposition in der *rgg3*- Mutante zu erklären, besteht in einer posttranskriptionellen Regulation der Stabilität bzw. der ribosomalen Zugänglichkeit des *fbsA*- Transkripts. Für *Streptococcus pneumoniaae* konnte bereits eine posttranskriptionelle Regulation des *ply*- (Pneunomysin) Transkriptes durch ClpP nachgewiesen werden (Kwon et al, 2004). Ebenso konnte in *Streptococcus pyogenes* eine Abhängigkeit der mRNA- Stabilität verschiedener Transkripte von der Wachstumsphase und der Anwesenheit von PNPase (Polynucleotidphosphorylase) gezeigt werden (Barnett et al 2007). In *Bacillus subtilis* konnte eine posttranskriptionelle Regulation des *hag*- Gens (Flagellin kodierendes Gen) durch den Regulator Csr (carbon storage regulator) nachgewiesen werden. Dabei bindet der Regulator Csr an die Shine- Dalgarno- Sequenz am Transkript und verhindert somit dessen Translation (Yakhnin et al, 2007). Die Regulation über eine nicht- translatierte RNA unterliegt der Kontrolle des Zwei- Komponenten- Systems FasBCA in *S. pyogenes* (Kreikemeyer et al, 2001 und 2003), was zu einer verlängerten Expression von Adhäsinen und sezernierten Virulenzfaktoren führt. Die Menge an mRNA wird durch deren Auf- und Abbau bestimmt. Deren Translation ist wiederum abhängig von verschiedenen Faktoren. Da Rgg3 die Expression des *fbsA*- Gens nicht auf transkriptioneller

Ebene beeinflusst, könnte er als Regulator eine Rolle bei der Stabilisierung bzw. Translation der *fbsA*- mRNA spielen.

Transkriptionsregulatoren sind in vielen Fällen eingebunden in ein regulatorisches Netzwerk, in welchem gemeinsame Zielgene durch mehrere Mechanismen reguliert werden. So arbeiten die Regulatoren Mga, Nra, RofA und Rgg in *Streptococcus pyogenes* auf verschiedenen Ebenen zusammen und bilden ein regulatorisches Netzwerk (Kreikemeyer et al, 2003). Auch konnten direkte Protein- Protein- Interaktionen zwischen Regulatoren nachgewiesen werden. So assoziiert Rgg aus *S. pyogenes* mit dem negativen Regulator LacD.1, welcher als Sensor eine Rolle im Zuckermetabolismus spielt (Loughman et al, 2006). Das Vorkommen verschiedener Regulatoren, welche die Synthese von Oberflächenproteinen in *S. agalactiae* beeinflussen (Lindahl et al, 2005), legt die Vermutung nahe, dass Rgg3 im Zusammenspiel mit diesen die Virulenz der Bakterien beeinflussen könnte. So steht die Adhärenz von *S. agalactiae* an epitheliale Zellen unter der Kontrolle des Zwei-Komponenten- Systems CovR/CovS (Lamy et al, 2004). Auch die beiden Transkriptionsregulatoren RogB (Gutekunst et al, 2003) und RovS (Samen et al, 2006) kontrollieren die Adhärenz der Bakterien. Während in der *rogB*- Deletionsmutante eine niedrigere Adhärenz festgestellt werden konnte, zeigt die *rovS*- Deletionsmutante eine höhere Adhärenz im Vergleich zum Wildtyp. Beide Regulatoren zeigen ebenfalls einen Effekt auf die Bindefähigkeit von *S. agalactiae* an humanes Fibrinogen. Die Adhärenz an humanes Fibrinogen wird ebenfalls beeinflusst durch das Zwei- Komponenten- System Rgf (Spellerberg et al, 2002). Während für RogB und RovS bereits ein Effekt auf die Expression von *fbsA* gezeigt werden konnte, darf dies bisher von Rgf nur vermutet werden. Die Tatsache das Rgg3 die Adhärenz und die Fibrinogenbindung von *S. agalactiae* vermindert ohne dabei Einfluss auf die Expression von *fbsA* zu haben, die Exposition von FbsA auf der Zelloberfläche aber dennoch verändert ist, lässt ein Zusammenspiel von Rgg3 mit verschiedenen Regulatoren vermuten, die zusammen in ein regulatorisches Netzwerk eingebunden sind. Der genaue Mechanismus der Rgg3- kontrollierten Virulenz muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Die das *rgg3*- Gen flankierenden offenen Leseraster *gbs2116* und *gbs2118* wurden bisher noch nicht charakterisiert. Datenbankanalysen ergaben auf Aminosäureebene für das Genprodukt von *gbs2116* ein putatives transmembranes Protein, sowie für *gbs2118* eine

putative Inosin- Monophosphat- Dehydrogenase. Da für *Streptococcus gordonii* gezeigt werden konnte, dass das stromabwärts gelegene *gtfG*- Gen durch Rgg reguliert wird (Vickerman et al, 2002) und das Gen für den Rgg- ähnlichen Regulator RggC aus *Streptococcus thermophilus* in einem Operon organisiert ist (Rawlinson et al, 2005), liegt die Vermutung nahe, dass auch Rgg3 flankierende Gene reguliert. Aus diesem Grund wurden quantitative Real- time PCR- Experimente mit den Genen *gbs2116* und *gbs2118* durchgeführt, um den Effekt der Deletion von *rgg3* auf deren Expression zu untersuchen. Hierbei konnte kein Unterschied der Expressionslevel zwischen Wildtyp und der *rgg3*-Deletionsmutante festgestellt werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die beiden das *rgg3*- Gen flankierenden Leseraster nicht unter der Kontrolle von Rgg3 stehen und es zu keinem polaren Effekt der Deletion kommt.

Die unterschiedliche Expression von Virulenzgenen während der Infektion und die daraus resultierende Anpassung der Bakterien an Signale der Umgebung bedarf der Zusammenarbeit verschiedener Regulationsmechanismen. Die Expression bestimmter Gene in Abhängigkeit von der Wachstumsphase spielt dabei eine zentrale Rolle (Kreikemeyer et al, 2003 und 2004; Beyer-Sehlmeyer et al, 2005; Shelburne et al, 2005). Von einigen Regulatoren ist eine Wachstumsphasen- abhängige Expression bereits bekannt (McIver et al, 1997; Neely et al, 2003; Chaussee et al, 2004; Chatfield et al, 2005; Dmitriev et al, 2006). So konnte gezeigt werden, dass sich die LytR vermittelte Adhärenz in *Streptococcus mutans* in Abhängigkeit von der Wachstumsphase ändert (Chatfield et al, 2005). Auch für Rgg aus *S. pyogenes* konnte mittels Proteomanalyse eine Wachstumsphasen abhängige Regulation verschiedener Proteine wie z.B. SpeB nachgewiesen werden (Neely et al, 2003; Chaussee et al, 2004; Dmitriev et al, 2006). Der Regulator Mga aus *Streptococcus pyogenes* zeigte eine veränderte Expression über das Wachstum und eine Wachstumsphasen- abhängige Regulation des M- Proteins und der C5a- Peptidase (McIver et al, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels quantitativer Real- time PCR in *S. agalactiae* eine Wachstumsphasen-abhängige Expression des *rgg3*- Gens nachgewiesen. Dabei steigt die *rgg3*- Expression in der exponentiellen Phase an und erreicht einen Peak in der späten exponentiellen Phase. In der stationären Phase nimmt die Expression wieder ab. Somit ist anzunehmen, dass Rgg3 insbesondere in der exponentiellen Phase für *S. agalactiae* von Bedeutung ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren die Funktion der beiden Regulatoren RogB2 und RogB3 näher untersucht. In den veröffentlichten Genomsequenzen von *S. agalactiae* (Glaser et al, 2002, Tettelin et al, 2002 und 2005) wurden drei Gene identifiziert, deren Genprodukte auf Aminosäureebene Sequenzhomologien zu Regulatoren der RALP- (`RofA-like proteins´) Familie aufweisen. Die korrespondierenden Gene wurden mit *rogB*, *rogB2* und *rogB3* benannt. Von Gutekunst et al (2003) wurde RogB bereits als positiver Regulator für die Adhärenz und Fibrinogenbindung von *S. agalactiae* charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass RogB direkt die Expression von *fbsA* reguliert. Der am besten charakterisierte Regulator der RALP- Familie ist RofA aus *Streptococcus pyogenes* (Fogg et al, 1994, Fogg & Chaperon 1997). Er wurde erstmals als Aktivator des *prtF*- Gens, kodierend für das Adhäsin, Invasin und Fibronektin- bindende Protein Sfb (Hanski & Caparon, 1992; Talay et al, 1992, 1994 und 2000; Molinari et al, 1997; Okada et al, 1998; Molinari & Chhatwal, 1999) beschrieben. Des Weiteren unterliegt RofA einer Sauerstoff- abhängigen Regulation (VanHeyningen et al, 1993) und ist wichtig für die Wirt- Pathogen- Wechselwirkung (Beckert et al, 2001). Bereits bekannte RofA- regulierte Gene sind *speB*, *sagA* und *mga* (Beckert et al, 2001; Cunningham et al, 2000). Ein weiterer Vertreter von Regulatoren der RALP- Familie in *S. pyogenes* ist Nra, welcher ebenfalls Gene kodierend für Oberflächenproteine wie Cpa und SfbII kontrolliert (Podbielski et al, 1999) und Einfluss auf die Expression der Virulenzgene *speB*, *speA*, *sagA* und *mga* hat (Podbielski et al, 1999; Cunningham et al, 2000). Molinari et al (2001) konnte einen Effekt von Nra auf die Interaktion der Bakterien mit Epithelzellen nachweisen. Vor kurzem konnte mit RALP3 ein weiterer Vertreter der RALP- Familie charakterisiert werden (Kreikemeyer et al, 2007; Kwinn et al, 2007), welcher Einfluss auf die Bildung der Kapsel und der Cystein- Protease, so wie auf die Invasion der Bakterien hat. Wie von den beschriebenen Effekten abgeleitet werden kann, spielen RofA- ähnliche Regulatoren, eingebunden in das regulatorische Netzwerk, für die Virulenz von *S. pyogenes* eine zentrale Rolle (Kreikemeyer et al, 2002 und 2003). In *S. pneumoniae* konnte der RofA- ähnliche Regulator RlrA identifiziert werden (Hava et al, 2002). RlrA reguliert die chromosomal divergent zum *rlrA*-Gen angeordneten Gene *rrgA-C* und *srtB-D,* kodierend für MSCRAMMs (`microbial surface components that recognize adhesive matrix molecules´; Patti et al, 1994) und Sortasen. Zusätzlich spielt RlrA eine Rolle bei der Interaktion der Bakterien mit der Schleimhaut des respiratorischen Traktes (Hava et al, 2002). Die große Bedeutung der RofA- ähnlichen Regulatoren in *S. pyogenes* und *S. pneumoniae* für die Virulenz der Bakterien und die bereits

gezeigte Regulation der Virulenz in *S. agalactiae* durch RogB wecken das Interesse, die beiden zur RALP- Familie zugehörigen Proteine RogB2 und RogB3 näher zu charakterisieren und deren Funktion in *S. agalactiae* zu analysieren.

Wie bereits beschrieben, stellt die Adhärenz an epitheliale Zellen und wirtsspezifische Strukturen eine wichtige Rolle in der Infektionskaskade von *S. agalactiae* dar. Für verschiedene Adhäsine unterschiedlicher pathogener Bakterien wurde gezeigt, dass sie Proteine der extrazellulären Matrix binden. So zeigt das M- Protein von *S. pyogenes* Fibrinogen- und Fibronektin- bindende Fähigkeit und vermittelt so die Adhärenz an epitheliale Zellen (Ellen et al, 1972; Caparon et al, 1991; Courtney et al, 1994; Okada et al, 1994; Wang et al, 1994; Christner et al, 1997). Auch das Fibronektin- bindende Protein Sfb aus *S. pyogenes* ist beteiligt an der Adhärenz der Bakterien an epitheliale Zellen des Respirationstraktes (Hanski et al, 1992). In *S. agalactiae* konnte für das Keratin- 4 bindende Protein Srr1 ebenfalls eine Beteiligung an der Adhärenz an epitheliale HEp2- Zellen nachgewiesen werden (Samen et al, 2007). FbsA ist als der Hauptfibrinogenrezeptor in *S. agalactiae* identifiziert worden (Schubert et al, 2002). Gleichzeitig vermittelt FbsA die Adhärenz an die humane Lungenepithelzelllinie A549 (Schubert et a, 2004). Für verschiedene Regulatoren aus *S. agalactiae* konnte bereits ein Einfluss auf die Adhärenz im Zusammenhang mit einer veränderten Expression von Adhäsinen bestätigt werden. Somit wurde für RogB eine Funktion als positiver Regulator der Adhärenz und der Expression des *fbsA*- Gens postuliert (Gutekunst et al, 2003). Auch RovS zeigt Einfluss auf die Adhärenz und die Expression des Fibrinogenrezeptors FbsA (Samen et al, 2006). Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten für eine *rogB3*- defiziente Mutante in *S. agalactiae* 6313 eine im Vergleich zum Wildtyp niedrigere Adhärenz an die humane Lungenepithelzelllinie A549. Gleichzeitig zeigte die Mutation keinen Einfluss auf die Bindung an humanes Fibrinogen. Auch in der exponentiellen Wachstumsphase wurde zwischen Wildtyp und Mutante kein Unterschied in der Expression des *fbsA*- Gens gefunden. Somit ist davon auszugehen, dass RogB3 die Adhärenz von *S. agalactiae* 6313 an die Epithelzelllinie A549 kontrolliert ohne Einfluss auf die Fibrinogenbindung der Bakterien zu nehmen. Ebenso erfolgt die *rogB3*-vermittelte Adhärenz ohne eine Einflussnahme auf die *fbsA*- Expression, was auf eine Beteiligung anderer Adhärenzfaktoren schließen lässt. Dies könnte unter anderem die Beeinflussung der Expression anderer Adhäsine, wie z.B. BibA (Santi et al, 2007) oder Pili-

Strukturen sein, für welche eine Beteiligung an der Adhärenz diskutiert wird (Lauer et al, 2005; Dramsi et al, 2006; Maisey et al, 2007). Um den Einfluss des putativen Regulators RogB3 auf die Virulenz von *S. agalactiae* näher charakterisieren zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Die Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Regulator RogB2 waren Arbeiten von Anja Eichner (Diplomarbeit, 2005) und Ulrike Samen (2005). Dabei konnte eine erhöhte Bindung der *rogB2*- defizienten Mutante an humanes Fibrinogen und Keratin-4 nachgewiesen werden. Gleichzeitig wies RogB2 einen Einfluss auf die Adhärenz von *S. agalactiae* an die epithelialen Zelllinien A549 und HEp2 auf. Während die Adhärenz der *rogB2*- Deletionsmutante an die Lungenepithelzelllinie A549 erhöht war, konnte eine erniedrigte Adhärenz an die Rachenepithelzelllinie HEp2 ermittelt werden. Dem Oberflächenprotein Srr1 wird eine Beteiligung an der Adhärenz von *S. agalactiae* an HEp2-Zellen und eine Bindung an Keratin-4 zugesprochen (Samen et a, 2007). Mittels quantitativer Real-time PCR konnte ein Einfluss der Deletion von RogB2 auf die Expression des *srr1*- Gens, welches in direkter divergenter Nachbarschaft zum *rogB2*- Gen liegt, nachgewiesen werden (Eichner 2005; Samen, 2005). Dabei führte die Deletion von *rogB2* zu einer erniedrigten Expression von *srr1*. Diese Ergebnisse bestätigen einen Einfluss von RogB2 auf die *srr1*-vermittelte Adhärenz der Bakterien an humane Rachenepithelzellen. Des Weiteren konnte ein Einfluss von RogB2 auf die Expression der Gene *fbsA* und *sapA* ermittelt werden. FbsA, der Hauptfibrinogenrezeptor von *S. agalactiae*, vermittelt die Adhärenz der Bakterien an humane Epithelzellen (Schubert et al, 2002 und 2004). Das *sapA*- Gen kodiert für Pilistrukturen (Lauer et al, 2005; Dramsi et al, 2006) und ist beteiligt an der Adhärenz der Bakterien an humane Gehirnendothelzellen (Maisey et al, 2007). Von Gutekunst et al (2003) konnte bereits ein Einfluss des Regulators RogB auf die Expression des *fbsA*- und *sapA*- Gens nachgewiesen werden. Somit kann vermutet werden, dass auch RogB2 durch Regulation der Expression von *fbsA* und *sapA* Einfluss auf die Adhärenz der Bakterien nimmt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage in wie fern RogB2 durch direkte Interaktion mit den Promoterregionen der Gene *srr1*, *fbsA* und *sapA*, Einfluss auf deren Expression nimmt. Hierfür wurden EMSAs (Electrophoretic mobility shift assay = Bandshift) durchgeführt und die Bindung eines RogB2- Fusionsproteins an die Promoterregionen der Gene *srr1*, *fbsA* und *sapA* bestimmt. Für viele Regulatoren ist eine direkte Bindung an die

Promoterregionen regulierter Gene bekannt. So konnte ebenfalls durch EMSAs eine direkte Bindung von RovS, einem Regulator der Rgg- Familie in *S. agalactiae*, an die Promoterregion des *fbsA*- Gens nachgewiesen und ein Bindemotiv bestimmt werden (Samen et al, 2006). In *S. pyogenes* konnte eine direkte Bindung des RofA- Proteins an die intergene Region zwischen *rofA* und dem regulierten *prtf*- Gen nachgewiesen werden und mittels DNase I-Footprint- Experimenten ein Bindemotiv ermittelt werden (Granok et al, 2000). Auch für den Regulator Mga aus *S. pyogenes* konnte eine direkte Interaktion mit der eigenen Promoterregion und den Promoterregionen der Gene *emm*, *scpA* und *sclA* bestimmt werden (McIver et al, 1995, 1999, 2002; Almengor et al, 2004). Weitere Regulatoren, die eine direkte Bindung an regulierte DNA- Fragmente zeigen sind LasX aus *Lactobacillus sakei* (Rawlingson, et al, 2005), RopB und CovR aus *Streptococcus pyogenes* (Neely et al, 2003; Federle et al, 1999 und 2002) und Rgg aus *Streptococcus gordonii* (Vickerman et al, 2003).

In den hier untersuchten Bandshift- Experimenten wurde eine starke Interaktion des RogB2-Fusionsproteins mit DNA- Fragmenten, welche die Promoterregionen der Gene *fbsA* und *sapA* enthalten, ermittelt. Es ist also anzunehmen, dass RogB2 durch direkte Bindung an die DNA Einfluss auf die Expression der Gene *fbsA* und *sapA* nimmt. Viele Vertreter der RALP-Familie zeigen eine direkte Bindung an die eigene Promoterregion und beeinflussen so ihre eigene Expression. So konnte eine Autoregulation für das *rofA*- Gen (Granok et al, 2000) und das *nra*- Gen (Podbielski et al, 1999) aus *S. pyogenes*, sowie für das *rlrA*- Gen aus *S. pneumoniae* (Hava et al, 2003) gezeigt werden. Da das *rogB2*- Gen divergent zum *srr1*-Gen angeordnet ist (Samen, 2005), ist die intergene Region der beiden Gene doppelt interessant. In den hierfür durchgeführten Bandshift- Studien konnte allerdings keine spezifische Bindung an die *srr1*/*rogB2*- intergene Region festgestellt werden. Somit ist anzunehmen, dass RogB2 zum einen auf Transkriptionsebene keine Autoregulation aufweist und zum anderen die Expression von *srr1* nicht über direkte Bindung an die Promoterregion beeinflusst. Ein indirekter Einfluss von Regulatoren auf die Expression von verschiedenen Genen ist bereits für RofA diskutiert worden (Beckert et al, 2001) und stellt für *S. pyogenes* einen Grundmechanismus im regulatorischen Netzwerk dar (Kreikemeyer et al, 2003). Somit konnte RogB2 als direkter Regulator für die Expression der Gene *fbsA* und *sapA* bestätigt, sowie ein indirekter Einfluss von RogB2 auf die Transkription von *srr1* aufgezeigt werden. Weitere Analysen könnten diesen Effekt näher charakterisieren und eventuell ein konserviertes Bindemotiv herauskristallisieren.

Wie bereits mehrmals belegt werden konnte, wird Oberflächenproteinen von pathogenen Bakterien eine wichtige Funktion für die Virulenz der Bakterien zugesprochen (Joh et al, 1999; Cunningham et al, 2000; Broker et al, 2004; Doran & Nizet 2004; Herbert et al, 2004; Lindahl et al, 2005; Schwarz- Linek et al, 2006). In *S. agalactiae* wurden bereits mehrere Zellwand- assoziierte Proteine gefunden, welche einen wesentlichen Beitrag zur Anheftung bzw. Invasion der Bakterien leisten. Hierzu zählen unter anderem die Proteine Alp3 (Stalhammer-Carlemalm et al, 1999), BibA (Santi et al, 2007), FbsA (Schubert et al, 2002 und 2004), FbsB (Jaccobson; 2003; Gutekunst et al, 2004), SapA (Lauer et al, 2005; Dramsi et al, 2006; Maisey et al, 2007) und Srr1 (Samen et al, 2006). Die Bindung einzelner Adhäsine an Proteine der extrazellulären Matrix spielt dabei eine bedeutende Rolle. In *S. agalactiae* konnte ein weiteres Fibrinogen- bindendes Protein identifiziert und charakterisiert werden, das als FbsB bezeichnet wurde (Jaccobson et al, 2003; Gutekunst et al, 2004, Diplomarbeit Schaller 2005). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bilden die Grundlage der in dieser Arbeit vorgestellten funktionellen Charakterisierung des FbsB4- Proteins aus *S. agalactiae* Gi7. Das FbsB- Protein enthält ein Signalpeptid, aber im Gegensatz zu FbsA kein Zellwandankermotiv (Gutekunst et al, 2004). Durch FACS- Analysen konnte FbsB dennoch auf der Oberfläche von *S. agalactiae* nachgewiesen werden (Tettelin et al, 2002). Vorangegangene Studien zeigten, dass das *fbsB*- Gen in den untersuchten Stämmen in jeweils einer von vier unterschiedlichen Varianten nachgewiesen werden kann (Gutekunst et al, 2004). Auf Proteinebene ist in allen vier Varianten das aus 231 Aminosäuren bestehende C- terminale Ende identisch und besitzt die Fähigkeit an Rinderfibrinogen zu binden (Jaccobson, 2003; Diplomarbeit Schaller 2005). Die N- terminale Region ist in Länge und Abfolge der Aminosäuresequenz zwischen den jeweiligen Varianten unterschiedlich. Für FbsB1 konnte das N- terminale Ende als Fusionsprotein aufgereinigt und dessen Bindefähigkeit an humanes Fibrinogen detektiert werden (Gutekunst et al, 2004). Als Bestandteil der extrazellulären Matrix und des Blutplasmas spielt Fibrinogen eine bedeutende Rolle für die Virulenz pathogener Bakterien (Whitnack & Beachey 1982 und 1984- 1985; Chhatwal et al 1985; Poirier et al, 1989; Courtney et al, 1994 und 1997; Thern et al, 1998; Cunningham, 2000; Ringdahl et al, 2000; Shenkman et al; 2000; Jonsson et al, 2005; Lindahl et al, 2005; Rivera et al, 2007). Wie durch Strukturanalysen festgestellt werden konnte, besteht Fibrinogen aus insgesamt sechs Untereinheiten, je zwei Aα, Bβ und γ- Ketten (Fuss et al, 2001; Mosesson et al, 2001 und 21005; Weisel et al, 2005). Heike Gutekunst

(2004) konnte belegen, dass FbsB1 an die Aα- Untereinheit von Fibrinogen bindet. Im Rahmen der Diplomarbeit von Beate Schaller (2005) konnten zusätzlich die Varianten FbsB3 und FbsB4 als Fusionsprotein hergestellt und hinsichtlich ihrer Fibrinogenbindung charakterisiert werden. Dabei konnte für FbsB3 und FbsB4 eine Bindung an tierisches, aber nicht an humanes Fibrinogen bestätigt werden. Zusätzlich konnte durch Herstellung einer Deletionsmutante ein Einfluss von FbsB1 auf die Virulenz von *S. agalactiae* 6313 nachgewiesen werden. Hierbei zeigte die *fbsB1*- defiziente Mutante eine veränderte Invasion in A549- Zellen. Die Adhärenz und die Bindung an humanes Fibrinogen waren hingegen nicht beeinflusst (Gutekunst et al, 2004). Die Internalisierung und Überlebensfähigkeit von *S. agalactiae* in eukaryotischen Zellen ist bereits mehrfach untersucht worden (Rubens et a, 1992; Gibson et al, 1993; Valentin-Weigand et al, 1995 und 1997; Nizet et al, 1997; Winram et al, 1998; Bolduc et al, 2002; Cheng et al, 2002; Tyrell et al, 2002; Adderson et al, 2003; Nitsche-Schmitz et al, 2007) und stellt auch in anderen pathogenen Bakterien einen wichtigen Virulenzmechanismus dar (LaPenta et al, 1994; Karunasagar et al, 1994; Cue et al, 1998; Ozeri et al, 1998; Jadoun et al; 1998 und 2002; Molinari et al, 1999 und 2000; Vazquez-Boland et al, 2001; Courtney et al, 2002; Haggar et al, 2003; Kreikemeyer et al, 2004). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit war es möglich eine *fbsB4*- Deletionsmutante im *S. agalactiae*- Stamm Gi7 zu erhalten. Um die Funktion von FbsB4 für die Virulenz von *S. agalactiae* Gi7 näher zu untersuchen, wurden Adhärenz- und Invasionsversuche an bzw. in die Lungenepithelzelllinie A549 durchgeführt und der Einfluss der Deletion auf die Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen bestimmt. Dabei konnte kein Einfluss der Deletion auf die Adhärenz der Bakterien an die Lungenepithelzelllinie A549 und auf die Bindung an humanes Fibrinogen nachgewiesen werden. Die Invasion der Bakterien in A549- Zellen hingegen war in der Deletionsmutante erniedrigt, so dass davon ausgegangen werden muss, dass FbsB4 eine Rolle bei der bakteriellen Internalisierung in eukaryotische Zellen spielt. Somit zeigt FbsB4 funktionell einen ähnlichen Phänotyp wie FbsB1, woraus geschlossen werden kann, dass die FbsB- Proteine für die Virulenz von *S. agalactiae* von großer Bedeutung sind.

Durch die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen zur Charakterisierung der Regulatoren Rgg3 und RogB3 ist deren Bedeutung für die Virulenz von *S. agalactiae* 6313 evident geworden, da beide Einfluss auf die Interaktion von *S. agalactiae* mit humanen

Epithelzellen und wirtseigenen Strukturen haben. Insbesondere unterliegt die Rgg3-regulierte Adhärenz einem noch nicht bekannten Mechanismus, da die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen keinen Schluss auf putative Zielgene zulassen. Es konnte lediglich durch elektronenmikroskopische Analysen ein Einfluss von Rgg3 auf die FbsA- Exposition auf der Oberfläche gezeigt werden.

Durch EMSAs konnte der Einfluss von RogB2 auf die Transkription näher untersucht werden. Dabei konnte eine direkte und indirekte Interaktion des RogB2- Proteins mit den Promoterregionen regulierter Genen nachgewiesen werden. Dies untermauert erneut die Bedeutung von Regulatoren der Rgg- und RALP- Familie für die Virulenz von *S. agalactiae*.

Fortführende Studien zum Oberflächenprotein FbsB, welche in dieser Arbeit gezeigt wurden, ergaben einen Einfluss von FbsB4 auf die Internalisierung der Bakterien in eukaryotische Zellen. So liegt die Vermutung nahe, dass die FbsB- Proteine einen wesentlichen Beitrag zur Virulenz der Bakterien leisten.

Insgesamt leistet die vorliegende Arbeit einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der komplexen Virulenzkaskaden in *S. agalactiae* und liefert somit die Grundlage für weiterführende Studien, welche dazu betragen könnten, die Pathogenitätsmechanismen dieser Bakterien vollständig zu verstehen.

V. Zusammenfassung

Streptococcus agalactiae ist ein natürlicher Besiedler des menschlichen Urogenitaltraktes und gilt zudem als Hauptverursacher von Infektionen wie Sepsen, Meningitiden und Pneumonien bei Neugeborenen. Gleichzeitig gewinnt er zunehmend an Bedeutung bei Infektionen von immunsupprimierten Erwachsenen. Trotz der medizinischen Relevanz sind die Mechanismen der Virulenz von *Streptococcus agalactiae* bisher nur unzureichend verstanden. Deren Aufklärung ist daher von großem wissenschaftlichem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des putativen Regulators Rgg3 auf die Virulenz von *S. agalactiae* untersucht. Dabei führte die Deletion des *rgg3*- Gens zu einer erhöhten Bindung der Bakterien an humanes Fibrinogen und zu einer erhöhten Adhärenz der Bakterien an humane Lungen- und Rachenepithelzellen. Durch das Einbringen eines Plasmid codierten *rgg3*- Gens konnte dieser Effekt komplementiert werden. Da das FbsA- Protein maßgeblich an der Fibrinogenbindung von *S. agalactiae* und der bakteriellen Adhärenz an Epithelzellen beteiligt ist, wurden Expressionsanalysen des *fbsA*- Gens über das Wachstum in den *S. agalactiae*- Stämmen 6313 wt und 6313 Δ*rgg3* mittels quantitative Real-time PCR durchgeführt. Dabei konnte kein Unterschied in der Transkriptmenge des *fbsA*- Gens zwischen *S. agalactiae* Wildtyp und der *rgg3*- defizienten Mutante festgestellt werden. Zusätzlich konnte in β-Galactosidase- Reportergenstudien kein Unterschied in der Promoteraktivität des *fbsA*- Gens zwischen Wildtyp und *rgg3*- Deletionsmutante ermittelt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass Rgg3 nicht an der transkriptionellen Regulation des *fbsA*- Gens in *S. agalactiae* beteiligt ist. Durch Immunogoldmarkierung konnte elektronenmikroskopisch eine erhöhte FbsA- Menge auf der Oberfläche von *S. agalactiae* 6313 Δ*rgg3* nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass Rgg3 über einen bislang unbekannten Mechanismus die Exposition des FbsA- Proteins auf der Oberfläche der Bakterien beeinflusst. Zusätzlich wurde mittels quantitativer Real-time PCR die Bedeutung von Rgg3 für die Expression weiterer *S. agalactiae*- Gene untersucht, die für Oberflächenproteine bzw. Virulenzfaktoren kodieren. Dabei konnte kein Unterschied in der Expression aller untersuchten Gene zwischen Wildtyp und *rgg3*- Mutante festgestellt werden. Somit ist davon auszugehen, dass Rgg3 keinen Einfluss auf die Transkription der hier untersuchten Gene nimmt. In weiteren quantitativen Real-time PCR Experimenten konnte

eine Wachstumsphasen- abhängige Expression des *rgg3*- Gens nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Expression einen Anstieg in der späten exponentiellen Phase und eine Abnahme der Expression in der stationären Phase. Dies lässt den Schluss zu, dass Rgg3 in der exponentiellen Phase für *S. agalactiae* von Bedeutung ist. In der vorliegenden Arbeit wurde neben Rgg3 auch der Einfluss des putativen Regulators RogB3 auf die Virulenz von *S. agalactiae* 6313 untersucht. Dabei konnte durch Deletion des *rogB3*- Gens eine erniedrigte Adhärenz der Bakterien an humane Lungenepithelzellen nachgewiesen werden, wohingegen die Bindung an humanes Fibrinogen unbeeinflusst blieb. Der beobachtete Effekt konnte durch das Einbringen eines Plasmid codierten *rogB3*- Gens aufgehoben werden. Mittels quantitativer Real-time PCR Experimente konnte kein Einfluss von RogB3 auf die Expression des *fbsA*- Gens festgestellt werden. Somit ist davon auszugehen, dass RogB3 über einen noch unbekannten Mechanismus die Adhärenz von *S. agalactiae* 6313 an humane Epithelzellen beeinflusst. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen bereits initiale Untersuchungen zur Bedeutung des Regulators RogB2 für die Virulenz von *S. agalactiae* vor. Hierbei wurde ein Einfluss von RogB2 auf die Expression der Gene *srr1*, *sapA* und *fbsA* postuliert. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels `Electrophoretic mobility shift assays´ (EMSAs) eine direkte Interaktion des gereinigten RogB2- Proteins mit den Promoterregionen der Gene *sapA* und *fbsA* nachgewiesen werden. Somit ist davon auszugehen, dass RogB2 direkt die Expression der beiden Gene beeinflusst. Für das *srr1*- Gens konnte keine direkte Interaktion des RogB2- Proteins mit der Promoterregion gezeigt werden, so dass die Vermutung nahe liegt, dass RogB2 indirekt Einfluss auf die Expression des *srr1*- Gens hat. Neben den hier beschriebenen Regulatoren spielen Oberflächenproteine wie FbsB eine zentrale Rolle bei Pathogenität von *S. agalactiae*. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von FbsB4 aus *S. agalactiae* Gi7 näher untersucht. Dabei führte die Deletion des *fbsB4*- Gens zu einer verringerten Invasion der Bakterien in humane Lungenepithelzellen. Dieser Effekt konnte durch Einbringen eines Plasmid codierten *fbsB4*- Gens wieder behoben werden. Somit ist davon auszugehen, dass FbsB4 an der Vermittlung der Invasion von *S. agalactiae* Gi7 in eukaryotische Zellen beteiligt ist.

Insgesamt konnte die vorliegende Arbeit einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Pathogenitätsmechanismen von *S. agalactiae* leisten und bildet die Grundlage weiterführender Studien bezüglich der Virulenz und deren Regulation in *S. agalactiae*.

VI. Summary

Streptococcus agalactiae naturally colonizes the human urogenital and gastrointestinal tract and is furthermore the leading cause for sepsis, meningitis and pneumonia in newborns. It also emerges to play a major role in infections of immunocompromised adults. Although *S. agalactiae* infections are of high medical importance the virulence mechanisms of these bacteria are not completely understood. Therefore, it is important to gain a deeper insight into the virulence mechanisms of these bacteria.

In the present work the importance of the putative regulator Rgg3 for the virulence of *S. agalactiae* 6313 was examined. The deletion of the *rgg3* gene resulted in an increased binding of the bacteria to human fibrinogen and to an increased adherence of the bacteria to human epithelial cells. This effect could be restored by introducing a plasmid carrying the *rgg3* gene. Since the FbsA protein is the main fibrinogen receptor and mediates adherence to epithelial cells, quantitative real-time PCR experiments were performed with the *fbsA* gene in the *S. agalactiae* strains 6313 wt und 6313 Δ*rgg3*. There was no difference in the amount of *fbsA* transcript between wildtype and *rgg3* mutant. In addition, reporter gene studies using a promoterless ß- galactosidase gene revealed no significant difference between the *fbsA* promoter activity in the wildtype compared to the *rgg3* mutant. These results indicate that Rgg3 has no influence on the expression of *fbsA* on transcriptional level. In addition the FbsA protein was detected on the surface of *S. agalactiae* 6313 wt and 6313 Δ*rgg3* via immunogold labeling and analysis under the electron microscope. There was more FbsA protein detectable on the surface of the *rgg3* deficient mutant compared to the wildtype. These findings lead to the conclusion that Rgg3 exerts an influence on the exposure of FbsA on the surface of *S. agalactiae* by using an unknown mechanism. Furthermore the influence of Rgg3 on the expression of other surface proteins and virulence genes was determined using quantitative real-time PCR experiments. There was no significant difference in the expression of the examined genes between wildtype and *rgg3* mutant. This leads to the presumption that Rgg3 has no influence on the expression of the tested genes. In further quantitative real-time PCR experiments a growth phase dependent expression of the *rgg3* gene was detected. While there is a peak of expression in the late exponential phase the expression decreased in the stationary phase. This suggests that Rgg3

is relevant for *S. agalactiae* in the late exponential phase. In addition to Rgg3 the influence of the putative regulator RogB3 on virulence of *S. agalactiae* was investigated in the present study. The deletion of the *rogB3* gene in *S. agalactiae* resulted in a decreased bacterial adherence to epithelial cells without affecting the binding of the bacteria to human fibrinogen. This effect could be restored by introducing a plasmid carrying the *rogB3* gene. In quantitative real-time PCR experiments no influence of RogB3 on the expression of *fbsA* could be detected. This indicates that RogB3 controls the adherence of *S. agalactiae* by mechanisms which are presently not known. At the beginning of the present study the role of the regulator RogB2 in *S. agalactiae* had been initially investigated, and it had been found that RogB2 controls the expression of the genes *srr1*, *sapA* and *fbsA* in the bacteria. In the present work the direct interaction between the purified RogB2 protein and the promoter regions of these three genes was examined via electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). A direct binding of RogB2 to the promoter regions of *sapA* and *fbsA* was detected. This suggests that RogB2 directly regulates the expression of these two genes. Contrary there was no direct binding of RogB2 to the promoter region of *srr1* which indicates that RogB2 indirectly controls the expression of *srr1*. Beside the described regulators, surface proteins like FbsB play an important role in the virulence of *S. agalactiae*. In the present study the importance of the surface protein FbsB4 for the virulence of *S. agalactiae* Gi7 was examined. The deletion of the *fbsB4* gene resulted in a decreased invasion of the bacteria into lung epithelial cells. This effect could be restored by introducing a plasmid carrying the *fbsB4* gene. This suggests that FbsB4 participates in mediating invasion of *S. agalactiae* Gi7 of epithelial cells.

Taken together this work provides a more detailed insight into the virulence mechanisms of *S. agalactiae* and can be used for further investigation of the pathogenicity of *S. agalactiae*.

VII. Literaturverzeichnis

Adderson E.E., Takahashi S., Wang Y., Armstrong J., Miller D.V., Bohnsack J.F. 2003. Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III Group B *Streptococcus agalactiae*. Infect Immun. 72 (12):6857-6863.

Almengor A., McIver K. 2004. Transcriptional activation of *sclA* by Mga requires a distal binding site in *Streptococcus pyogenes.* J Bac. 186 (23): 7847-7857.

Ajdic D., McShan W.M., McLaughlin R.E., Savic G., Chang J., Carson M.B., Primeaux C., Tian R., Kenton S., Jia H., Lin S., Qian Y., Li S., Zhu H., Njasr F., Lai H., White J., Roe B.A., Feretti J.J. 2002. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc Natl Acad Sci USA. 99 (22): 14434-14439.

Apgar BS, Greenberg G, Yen G. 2005. Prevention of streptococcal desease in the newborn. Am Fam Physician. 71 (5):903-10.

Baltimore D., Dulbecco R., Temin H.M. 1975. www.nobelprize.org

Baker C.J., Barett FF. 1974. Group B streptococcal infections in infants: the importance of the various serotypes. JAMA 230(8):1158-60.

Baker C.J., Edwards M.S. 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.

Baker J.R., Yu H., Morrison K., Averett F., Pritchard D.G. 1997. Specificity of the hyaluronate lyase of group-B streptococcus toward unsulphated regions of chondroidin sulphate. Biochem J. 327:65-71

Baker J.R., Pritchard D.G. 2000. Action pattern and substrate specificity of the hyaluronan lyase from group B streptococci. Biochem J. 348:465-471.

Barnett T.C., Bugrysheva J.V., Scott J.R. 2007. Role of mRNA stability in growth phase regulation of gene expression in the Group A *streptococcus*. J Bac. 189 (5):1866-1873.

Baron M.J., Kasper D.L. 2005. Anchors away: contribution of a glycolipid anchor to bacterial invasion of host cells. J clin invest. 115 (9): 2325-2327.

Baron S. 1996. Medical Microbiology. Addison-Wesley Publishing Company

Barton L.L., Feigin R.D., Lins R. 1973. Group B beta hemolytic streptococcal meningitis in infants. J Pediatr. 82 (4): 719-23.

Beckert S., Kreikemeyer B., Podbielski A. 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., Waggoner J.D., Harris T.O., Tamura G.S., Rubens C.E. 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.

Beres S.B., Richter E.W., Nagiec M., Sumby P., Porcella S.F., DeLeo F.R., Musser J.M. 2006. Molecular genetic anatomy of inter- and intraserotype variation in the human bacterial pathogen group A *Streptococcus*. PNAS. 103 (18):7059-7064.

Bergqvist G., Hurvell B., Malmborg A.S., Rylander M., Tunell R. 1971. Neonatal infections caused by group B streptococci. Scand J Infect Dis. 3 (2): 157-62.

Beyer-Sehlmeyer G., Kreikemeyer B., Hörster A., Podbielski A. 2005. Analysis of the growth phase – associated transcriptome of *Streptococcus pyogenes*. Int J Med Microb. 295(3):161-77.

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

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

Bohnsack J.F., Zhou X.N., Gustin J.N., Rubens C.E., Parker C.J., Hill H.R. 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., Baron M.J., Gravekamp C., Lachenauer C.S., Madoff L.C. 2002. The alpha C protein mediates internalization of group B *Streptococcus* within human cervical epithelial cells. Cellular Microbiology. 4: 751-758.

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

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:348-54

Brimil N., Barthell E., Heindrichs U., Kuhn M., Lütticken R., Spellerberg B. 2006. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. Int J Med Microbiol. 296(1):39-44.

Broughton R.A., Baker C.J.. 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 hemolytic streptococci. J Bacteriol. 37: 133-144.

Bröker G., Spellerberg B. 2004. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and horizontal gene transfer. Int J Med Microb. 294 (2-3):269-75.

Buist G., Ridder A.N.J., Kok J., Kuipers O.P. 2006. Different subcellular locations of secretome components of Gram- positive bacteria. Microbiology. 152:2867-2874.

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

Burnham C.A., Shokoples S.E., Tyrell G.J. 2007. Rac1, RhoA, and Cdc42 participate in HELa cell invasion by group B *streptococcus*. FEMS Microbiol lett. 272(1):8-14.

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

Caparon M.G., Stephens D.S., Olsen A., Scott J.R. 1991. Role of M Protein in adherence of group A streptococci. Infect Immun. 59(5):1811-1817.

Carlsson F., Stalhammar-Carlemalm M., Sandin C., Carlemalm E., Lindahl G. 2006. Signal sequence directs localized secretion of bacterial surface proteins. Nature 442 (7105):943-6.

Center of decease and prevention. 2007.Perinatal Group B streptococcal decease after universal screening recommendations

Chatfield C.H., Koo H., Quivey R.G. 2005. The putative autolysin regulator LytR in *Streptococcus mutans* plays a role in cell division and is growth-phase regulated. Microbiology. 151:625-631.

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

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

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

Chaussee M.S., Sylva G.L., Sturdevant D.E., Smoot L.M., Graham M.R., Watson R.O., Musser J.M. 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., Somerville G.A., Reitzer L., Musser J.M. 2003. Rgg coordinates virulence factor synthesis and metabolism in *Streptococcus pyogenes*. J Bac. 185: 6016-6024.

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

Chhatwal G.S., Dutra I.S., Blobel H. 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.

Chiang C., Wang C.H., Tsai P.J., Chuang W.J., Lin Y.S., Lin M.T., Liu C.C., Wu J.J. Streptococcal pyrogenic exotoxin B causes mitochondria damage to polymorphonuclear cells preventing phagocytosis of group A *Streptococcus*. Med Microbiol Immunol. 195(2):55-63.

Chieslewicz M.J., Kasper D.L., Wang Y., Wessels M.R. 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.

Christner R., Li Z., Raeder R., Podbielski A., Boyle M.D. 1997. Identification of key gene products required for acquisition of plasmin-like enzymatic activity by group A streptococci. J Infect Dis. 175(5):1115-20.

Churchward G. 2007. The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. Mol Microbiol. 64(1):34-41.

Civlijak R., Lisic M., Begovac J., Maretic T., Planinc D. 2001. Meningitis and Endocarditis caused by group B *Streptococcus* in a human immunodeficiency Virus (HIV) infected patient, CMJ. 42(5):572-575.

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

Collin M., Svensson M.D., Sjöholm A.G., Jensenius J.C., Sjöbring U., Olsen A. 2002. EndoS and SpeB from *Streptococcus pyogenes* inhibit immunoglobulin-mediated opsonophagocytosis. Infect Immun. 70 (12):6646-6651.

Collin M., Olsen A. 2001. Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. Infect Immun. 69 (11):7187-7189.

Comfort D., Clubb R.T. 2004. A comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in Gram-positive bacteria. Infect Immun. 72(5):2710-2722.

Courtney H.S., Hasty D.L., Dale J.B. 2002. Molecular mechanisms of adhesion, colonization and invasion of group A streptococci. Ann Med. 34(2):77-87.

Courtney H.S., Liu S., Dale J.B., Hasty D.L. 1997. Conversion of M serotype 24 of *Streptococcus pyogenes* to M Serotype 5 and 18: Effect on resistance to phagocytosis and adhesion to host cells. Infect Immun. 65 (6):2472-2474.

Courtney H.S., Li Y., Dale J.B., Hasty D.L. 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., Dombek P.E., Lam H., Cleary P.P. 1998. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. Infect Immun. 66: 4593-4601.

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

Desvaux M., Dumas E., Chafsey I., Hebraud M. 2006. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. FEMS Microbiol. Lett. 256(1):1-15.

DiRita V.J., Engleberg N.C., Health A., Miller A., Crawford J.A., Yu R. 2000. Virulence gene regulation inside and outside. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 355:657-665.

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

Dmitriev A.V., McDowell E.J., Kappeler K.V., Chaussee M.A., Rieck L.D., Chaussee M.S. 2006. The Rgg regulator of *Streptococcus pyogenes* influences utilization of nonglucose carbohydrates, prophage induction and expression of the NAD- Glycohydrolase virulence operon. J. Bac. 188(20):7230-7241.

Doran K.S., Chang J.C., Benoit V.M., Eckmann I., Nizet V. 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.

Doran K.S., Liu G.Y., Nizet V. 2003. Group B streptococcal β- hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of mengingitis. J Clin Invest. 112(5):736-744.

Doran K.S., Nizet V. 2004. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. Mol. Microbiol. 54 (1):23-31.

Doran K.S., Engelson E.J., Khosravi A., Maise H.C., Fedtke I., Equils O., Michelsen K.S., Arditi M., Peschel A., Nizet V. 2005. Blood-brain barrier invasion by group B *streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichonic acid. J Clin Invest. 115 (9):2499-2507.

Dramsi S., Trieu-Cuot P., Bierne H. 2005. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. Res Microbiol. 156(3):289-97.

Edward M.S., Rench M.A., Palazzi D.L., Baker C.J. 2005. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in healthy elderly persons. Clin Infect Dis. 40(3):352-7.

Edward M.S., Baker C.J. 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. Clin Infect Dis. 41(6):839-47.

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

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

Ellen R.P., Gibbons R.J. 1972. M- Protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: Prerequisite for virulence. Infect Immun. 5 (5):826-830.

Eriksson A., Norgren M. 2003. Cleavage of Antigen-bound Immunoglobulin G by SpeB contributes to streptococcal persistence in opsonizing blood. Infect Immun. 71(1):211-217.

Facklan R. 2002. What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev. 15(4):613-630.

Farley M.M., Harvey R.C., Stull T., Smith J.D., Schuchat A., Wenger J.D., Stephens D.S. 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.

Farley M.M. 2001. Group B streptococcus disease in nonpregnant adults. Clin. Infect. Dis. 33:556-561

Federle M.J., Scott J.R. 2002. Identification of binding sites for the group A streptococcal global regulator CovR. Mol Microbiology. 43(5):1161-1172.

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

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

Fluegge K., Siedler A., Heinrich B., Schulte-Moenting J., Moenning M.J., Bartels D.B., Dammann O., von Kries R., Berner R. 2006. Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. Pediatrics. 117(6):1138-1146**.**

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 a gamma delta-based shuttle mutagenesis strategy in *Streptococcus pyogenes*. Mol Microbiol. 11: 671-684.

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

Franciosi R.A., Knostman J.D., Zimmerman R.A. 1973. Group B streptococcal neonatal and infant infections. J Pediatr. 82(4):707-18.

Franken C., Haase G., Brandt C., Weber-Heynemann J., Martin S., Lämmler C., Podbielski A., Lütticken R., Spellerberg B. 2001. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-hemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpP* and *lmb*. Mol Microbiol. 41(4):925-35.

Fry R.M. 1938. Fatal infections by hemolytic *Streptococcus* Group B. Lancet 1:199-201.

Fuss C., Palmaz J.C., Sprague E.A. 2001. Fibrinogen: Structure, function and surface interactions. J Vasc. Interv. Radiol. 12(6):677-82.

Gaillot O., Poyart C., Berche P., Trieu-Cuot P. 1997. Molecular characterization and expression analysis of the superoxide dismutase gene from *Streptococcus agalactiae*. Gene. 204: 213-218.

Galask R.P., Varner M.W., Petzold C.R., Wilbur S.L. 1984. Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. Am j Obstet Gynecol. 148(7):915-28.

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

Gibson R.L., Nizet V. Rubens C.E. 1999. Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. Pediatr Res. 45(5):626-34.

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

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

Goldschmidt J.C., Panos C. 1984. Teichonic acids of *Streptococcus agalactiae*: Chemistry, cytotoxicity and effect on bacterial adherence to human cells in tissue culture. Infect Immun. 43(2):670-677.

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

Guerin J.M., Mofredj A., Leibinger F., Ehherian J.M., Raskine L. 2000. Group B *Streptococcus* meningitis in an HIV-positive adult: case report and review. Scand J Infect Dis. 32(2): 215-7.

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

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

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

Haggar A., Hussain M., Lonnies H., Hermann M., Norrby-Tegland A., Flock J.I. 2003. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. Infect Immun. 71:2310-2317

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

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Mol Biol. 166(4):557-80.

Hanley J. 2006. Neonatal infection: group B *Streptococcus*. Clin. Evid. 15:476-9.

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

Hasty D.L., Ofel I., Courtney H.S., Doyle R.J. 1992. Multiple adhesins of streptococci. Infect Immun. 60(6):2147-2152.

Harlander S.K., McKay L.L. 1984. Transformation of *Streptococcus sanguis* Challis with *Streptococcus lactis* Plasmid DNA. App Env Microb. 48(2):342-346.

Hava D.L., Camilli A. 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumonia*e virulence factors. Mol Microbiology. 45(5):1389-1405.

Hava D.L., Hemsley C.J., Camilli A. 2003. Transcriptional regulation in the *Streptococcus pneumoniae rlrA* pathogenicity island. J Bac. 185(2):423-421.

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

Heinz P. 2006. Funktionelle Charakterisierung des Regulators MsmR aus *Streptococcus agalactiae*. Diplomarbeit an der Universität Ulm.

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

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

Holyoak A.L., Fraser T.A. 2007. Group B streptococcal meningitis in a middle-aged woman. Crit Care Resusc. 9(2):181-3.

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

Hu P., Bian Z., Fan M., Zhang P. 2007. Sec translocase and sortase A are colocalized in a locus in the cytoplasmic membrane of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol.

Huang P.Y., Lee M.H., Yang C.C., Leu H.S. 2006. Group B streptococcal bacteremia in non-pegnant adults. J Microbiol Immunol Infect. 39(3):237-41.

Hytönen J., Haataja S., Gerlach D., Podbielski A., Finne J. 2001. The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes* , a multifunctional secreted and cell surface molecule with strepadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. Mol Microbiology. 39(2):512-519.

Hytönen J., Haataja S., Finne J. 2003. *Streptococcus pyogenes* glycoprotein-binding Strepadhesin activity is mediated by a surface-associated carbohydrate-degrading enzyme, pullulanase. Infect Immun. 71(2):784-793.

Hytönen J., Haataja S., Finne J. 2006. Use of flow cytometry fort he adhesion analysis of *Streptococcus pyogenes* mutant strains to epithelial cells: investigation of the possible role of surface pullulanase and cysteine protease and the transcriptional regulator Rgg. BMC Microbiology. 6:18.

Jackson L.A., Hilsdon R., Farley M.M., Harrison L.H., Reingold A.L., Plikaytis B.D., Wenger J.D., Schuchat A. 1995. Risc factors for group B streptococcal disease in adults. Ann Intern Med. 123:415-420

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

Jadoun J., Eyal O., Sela S. 2002. Role of CsrR, hyaluronic acid and SpeB in the internalization of *Streptococcus pyogenes* M Type 3 strain by epithelial cells. Infect Immun. 70(2):462-469.

Jadoun J., Ozeri V., Burstein E., Skutelsky E., Hanski E., Sela S. 1998. Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells. J Infect Dis. 178:147-158

Jelinkova J., Grabovskaya K.B., Ryk M., Bulgakova T.N. Totolian A.A. 1986. Adherence of vagina and pharyngeal strains of group B streptococci to human vaginal and pharyngeal epithelial cells. Zentr Bak. Mikrobiol. 262(4):492-9.

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

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

Johnson D.R., Ferrieri P. 1984. Group B streptococcal Ibc protein antigen: distribution of two determinants in wild-type strains of common serotypes. J Clin Microb. 19(4):506-510.

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

Jones F.S. 1918. Studies in bovine mastitis. JEM. 28:721-733.

Jonsson I.M., Pietrocola G., Speziale P., Vergrangh M., Tarkowski A. 2005. Role of fibrinogen-binding adhesin expression in septic arthritis and septicemia caused by *Streptococcus agalactiae*. J Infect Dis. 192(8):1456-64.

Jürgens D., Strerzik B., Fehrenbach F.J. 1987. Unspecific binding of group B streptococcal cytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. J Exp Med. 165(3):720-32.

Kallman J., Schollin J., Häkansson S., Andersson A., Kihlström E. 1993. Adherence of group B streptococci to human endothelial cells in vitro. APMIS. 101(5):403-8.

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

Karunasagar I., Senghaas B., Krohne G., Goebel W. 1994. Ultrastructural study of *Listera monocytogenes* entry into cultured human colonic epithelial cells. Infect Immun. 62(8):3554-3558

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

Kim Y.S., Sheldon R.A., Elliott B.R., Liu Q., Ferriero D.M., Täuber M.G. 1995. Brain injury in experimental neonatal meningitis due to group G streptococci. J Neuropathol Exp Neurol. 54(4):531-9.

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

Koskiniemi S., Sellin M., Norgran M. 1998. Identification of two genes, *cpsX* and *cpsY*, with putative regulatory function on capsule expression in group B streptococci. FEMS Med Microbiol. 21(2):159-68.

Kostrzynska M., Paulsson M., Schmidt K.H., Wadström T. 1992. Comparative studies on binding of vitronectin to groups A and C streptococci. Microbios. 71(288-289):179-92.

Kreikemeyer B., Boyle M.D.P., Buttaro B.A., Heinemann M., Podbielski A. 2001. Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. Mol Micobiology. 39(2):392-406.

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

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

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

Kwinn L.A., Khosravi A., Aziz R.K., Timmer A.M., Doran K.S., Kotb M., Nizet V. 2007. Genetic characterization and virulence role of the RALP3/LSA locus upstream of the streptolysin O operon in invasive M1T1 group A *Streptococcus*. 189(4):1322-1329.

Kwon H.Y., Ogunniyi D., Choi M.H., Pyo S.M., Rhee D.K., Paton J.C. 2004. The ClpP protease of *Streptococcus pneumonia*e modulates virulence gene expression and protects against fatal pneumococcal challenge. Infect Immun. 72(10):5646-5653.

Lang S., Palmer M. 2003. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. J Bac Chem. 278(40):38167-38173.

Lalioui L., Pellegrini E., Dramsi S., Baptista M., Bourgeois N., Doucet-Popuaire F., Rusniok C., Zouine M., Glaser P., Kunst F., Poyard C., Trieu-Cuot P. 2005. The SrtA sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells and for colonization of the mouse intestine. Infect Immun. 73(6):3342-3350.

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

Lämmler C., Chhatwal G.S., Blobel H. 1983. Binding of human fibrinogen and its polypeptide chains to group B streptococci. Med Microbiol Immunol. 172(3)149-53.

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

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

Lim D.V., Morales W.J., Walsh A.F., Kazanis D. 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., Stalhammar-Carlemalm M., Areschoug T. 2005. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin Microbiol Rev. 18: 102-127.

Liu G.Y., Nizet V. 2004. Extracellular virulence factors of group B streptococci. Front Biosci. 9:1794-802

Lottspeich F., Zorbas H. 1998. Bioanalytik. 1. Auflage Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg

Loughman J.A., Caparon M.G. 2007. Contribution of invariant residues to the function of Rgg Family transcription regulators. J Bac. 189(2):650-655.

Loughman J.A., Caparon M.G. 2006. A novel adaptation of aldolase regulates virulence in *Streptococcus pyogenes*. EMBO. 25(22):5414-22.

Loughman J.A., Caparon M.G. 2006. Regulation of SpeB in *Streptococcus pyogenes* by pH and NaCl: a model for in vivo gene expression. J Bac. 188(2):399-408.

Lucht J.M, Dersch P, Kempf B., Bremer J. 1994. Interactions of the nucleotid-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.

Lübeck A. 2005. Molekularbiologische Analyse des Fibrinogenrezeptors FbsA aus *Streptococcus agalactiae*. Diplomarbeit an der Universität Ulm

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.

Lukomski S., Montgomery C.A., Rurangirwa J., Geske R.S., Barrish J.P., Adams G.J., Musser J.M. 1999. Extracellular cysteine protease produced in *Streptococcus pyogenes* participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice. Infect Immun. 67(4):1779-1788.

Lyon W.R., Gibson C.M., Caparon M.G. 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.

Maguin E., Duwat P., Hege T., Ehrlich D., Gruss A. 1992. New thermosensitive plasmid for Gram-positive bacteria. J Bac. 174:5633-5638.

Maisey H.C., Hensler M., Nizet V., Doran K.S. 2007. Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. J Bac. 189(4):1464-1467.

Mamo W, Fröman G., Sundas A., Wadström T. 1987. Binding of fibronectin, fibrinogen and type II collagen to streptococci isolated from bovine mastitis. Microb Pathg. 2(6):417-24.

Manning S.D., Neighbors K., Tallman P.A., Gillespie B., Marrs C.F., Borchardt S.M., Baker C.J., Pearlman M.D., Foxman B. 2004. Prevalence of group B *Streptococcus* colonization and potential for transmission by casual contact in healthy young men and women. Clin Infect Dis. 39(3):380-8.

Maraffini L.A., DeDent A.C., Schneewind O. 2006.Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. Mic Mol Biol Rev. 70(1):192-221.

Marchlewicz B.A., Duncan J.L. 1980. Properties of a hemolysin produced by Group B streptococci. Infect Immun. 30(3):805-813.

Marchlewicz B.A., Duncan J.L. 1981. Lysis of Erythrocytes by a hemolysin produced by a group B *Streptococcus* sp. Infect Immun. 34(3):787-794.

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

Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. 2007. The regulatory network controlling *Vibrio cholera* virulence gene expression. Infect Immun.

McIver K.S., Heath A.S., Green B.D., Scott J.R. 1995. Specific binding of the activator Mga to promoter sequences of the *emm* and *scpA* genes in the group A streptococcus. J Bac. 177(22):6619-6624.

McIver K.S., Scott J.R. 1997. Role of *mga* in growth phase regulation of virulence genes of the group A *Streptococcus*. J Bac. 179(16):5178-5187.

McIver K.S., Thurman A.S., Scott J.R. 1999. Regulation of *mga* transcription in the group A *Streptococcus*: Specific binding of Mga within its own promoter and evidence for a negative regulator. J Bac. 181(17):5373-5383.

McIver K.S., Myles R.L. 2002. Two DNA-binding domains of Mga are required for virulence gene activation in the group A *Streptococcus*. Mol Microbiology. 43(6):1591-1601.

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

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

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

Molinari G., Chhatwal G.S. 1999. Role played by fibronectin-binding protein SfbI (Protein F1) of *Streptococcus pyogenes* in bacterial internalization by epithelial cells. J Infect Dis. 179(4):1049-50.

Mosesson M.W. 2005. Fibrinogen and fibrin structure and functions. J Thromb Haema. 3:1894-1904.

Mosesson M.W., Siebenlist K.R., Meh D.A. 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.

Munoz P., Llancaqueo A., Rodrigues-Creixems M., Pelaez T., Martin L., Bouza E. 1997. Group B *Streptococcus* bacteremia in nonpregnant adults. Arch Intern Med. 157(2):213-6.

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

NCBI Taxonomy browser. www.ncbi.nih.gov/Taxonomy/

Nealon T.J., Mattingly S.J. 1984. Role of cellular lipoteichoic 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.

Nealon T.J., Mattingly S.J. 1985. Kinetic and chemical analyses of the biologic significance of lipoteichoic acids in mediating adherence of serotype III group B streptococci. Infect Immun. 50(1):107-115.

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

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

Nielson H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Prot Engineering. 10(1):1-6.

Nitsche-Schmitz D.P., Rohde M., Chhatwal G.S. 2007. Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. Throm Haemost. 98(3):488-96.

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

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

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

Nolla J.M., Gomez-Vaquero C., Corbella X., Ordonez S., Garcia-Gomez C., Perez A., Cabo J., Valverde J., Ariza J. 2003. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*) pyogenic arthritis in nonpregnant adults. Medicine. 82(2):119-28.

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

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

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

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

Ozeri V., Rosenshine I., Mosher D.F., Fässler R., Hanski E. 1998. Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. Mol Microbiology. 30(3):625-637.

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

Pass M.A., Gray B.M., Khare S., Dillon H.C. 1979. Prospective studies of group B streptococcal infections in infants. J Pediatr. 95(3):437-43.

Paterson G.K., Blue C.E., Mitchell T.J. 2006. Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. J Med Microbiol. 55:355-363.

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

Pearlman M.D., Pierson C.L., Faix R.G. 1998. Frequent resistance of clinical group B streptococci isolates to clandamycin and erythromycin. Obstet Gynecol. 92(2):258-61.

Perch B., Kjems E., Henrichsen J. 1979. New serotype of GBS isolated from human source. J Clin Microbiol. 10:109.

Pietrocola G., Visai l, Valttulina V., Vignati E., Rindi S., Arciola C.R., Piazza R., Speziale P. 2006. Multiple interactions of FbsA, a surface protein from *Streptococcus agalactiae*, with fibrinogen: affinity, stoichiometry, and structural characterization. Biochem. 45(42):12840-52.

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

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

Poirier T.P., Hehoe A., Whitnack E., Dockter M.E., Beachey E.H. 1989. Fibrinogen binding and resistance to phagocytosis of *Streptococcus sanguis* cloned M Protein of *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun. 57(1):29-35.

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

Poyart C., Trieu-Cuot P. 1997. A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Lett. 156(2):193-8

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

Podbielski A., Woischnik M., Leonard B. A. B., Schmidt K.H. 1999. Characterization of *nra*, a global negative regulator gene in group A streptococci. Mol Microbiology. 31(4):1051-1064.

Podbielski A., Blankenstein O., Lüttiken R. 1994. Molecular characterization of the *cfb* gene encoding group B streptococcal CAMP-factor. Med Microbiol Immunol. 183(5):239-56.

Prichard D.G., Lin B., Willingham T.R., Baker J.R. 1994. Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. Arch Biochem Biophys. 315(2):431-7.

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

Pritzlaff C.A., Chang J.C.W., Kuo S.P., Tamura G.S., Rubens C.E., Nizet V. 2001. Genetic basis for the β-hemolytic/cytolytic activity of group B *Streptococcus*. Mol. Microbiology. 29(2):236-247.

Que Yok-Ai, Haefliger J., Francioli P., Moreillon P. 2000. Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using a new shuttle vector. Infect Immun. 68:3516-3522.

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

Rantz L.A. 1942. The serological typing of haemolytic streptococci of the Lancefield Group A. J Clin Invest. 2182):217-27.

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

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

Ribardo D.A., McIver K.S. 2006. Defining the Mga regulon: comparative transcriptome analysis reveals both direct and indirect regulation by Mga in the group A *Streptococcus*. Mol Microbiology. 62(2):491-508.

Ringdahl U., Svensson H.G, Kotarsky H., Gustafsson M., Weineisen M. 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.

Rivera J., Vannakambadi G., Höök M., Speziale P. 2007. Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. Thromb Haemost. 98(3):503-11.

Rosenau A., Martins K., Amor S., Gannier F., Lenotte P., van der Mee-Marquet N., Mereghetti L., Quentin R. 2007. Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimen to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the *fbsA* and *fbsB* genes. Infect Immun. 75(3):1310-1317.

Rojagopal L., Vo A., Silvetroni A., Rubens C.E. 2006. Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signaling mechanism in *Streptococcus agalactiae*. Mol Microbiology. 62(4):941-57.

Rojagopal L., Vo A., Silvetroni A., Rubens C.E. 2005. Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. Mol Microbiology. 56(5):1329-46.

Rojagopal L., Clancy A., Rubens C.E. 2003. A Eukaryotic Type serin/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation and virulence. J Biol Chem. 278(16):14429-14441.

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

Rubens C.E., Raff H.V., Jackson J.C., Chi E.Y., Bielitzki J.T., Hillier S.L. 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., Smith S., Hulse M., Chi E.Y., van Belle G. 1992. Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. Infect Immun. 60: 5157-5163.

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

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

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

Samen U. 2005. Charakterisierung des Regulators RovS und Identifizierung potentieller Virulenzfaktoren in *Streptococcus agalactiae*. Dissertation an der Universität Ulm.

Samen U.M., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J., 2006. The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes. Infect Immun. 74(10):5625-5635.

Samen U.M., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J., Borges F. 2007. The surface protein Srr-1 of *Streptococcus agalactiae* binds to human keratin 4 and promotes adherence to epithelial HEp-2 cells. Infect Immun. 75(11):5404-14.

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

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Nat Acad Sci USA 74(12):5463-7.

Santi I., Scarselli M., Mariani M., Pezzicolli A., Masignati V., Taddei A., Grandi G., Telford J.L., Soriani M. 2007. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesion contributing to group B streptococcus survival in human blood. Mol Microbiology. 63(3):754-67.

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

Schubert A., Zakikhany K., Schreiner M., Frank R., Spellerberg B., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J. 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, Zakikhany K., Pietrocola G., Meinke A., Speziale P., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J. 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.

Schwarz-Linek U., Höök M., Potts J.R. 2006. Fibronectin-binding proteins of Gram-positive cocci. Microbes Infect. 8(8):2291-8.

Scott J.R., Barnett T.C. 2006. Surface proteins of Gram-positive bacteria and how they get there. Annu Rev Microbiol. 60:397-423.

Severin M.J., Wiley J.L. 1976. Change in susceptibility of group B streptococci to penicillin G from 1968 through 1975. Antimicrob Agents Chemot. 10(2): 380-381.

Shelburne S.A., Granville C., Tokuyama M., Sitkiewicz I., Patel P., Musser J.M. 2005. Growth characteristics of and virulence factor production by group A *Streptococcus* during cultivation in human saliva. Infect Immun. 73(8):4723-4731.

Shelver D., Rajagopal L., Harris T.O., Rubens C.E. 2003. MtaR, a regulator of methionine transport is critical for survival of group B streptococcus in vivo. J Bac. 185(22):6592-6599.

Shenkman B., Rubinstein E., Tamarin I., Dardik R., Savion N., Varon D. 2000. *Staphylococcus aureus* adherence to thrombin-treated endothelial cells is mediated by fibrinogen but not by platelets. J Lab Clin Med. 135:43-51

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

Skalka M., Smola J. 1981. Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor. A new finding about diffusible exosubstances of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. Zentralbl. Bakeriol A. 249(2):190-4.

Soriani M., Santi I., Taddei A., Rappuoli R., Grandi G., Telford J.L. 2006. Group B *Streptococcus* crosses human epithelial cells by a paracellular route. J Infect Dis. 193(2):241-50.

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

Spellerberg B., Rozdzinski E., Martin S., Weber-Heynemann J., Schnitzler N., Lütticken R., Podbielski A. 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., Pohl B., Haase G., Martin S., Weber-Heynemann J., Lütticken R.. 1999. Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by ISS1 transposition. J Bac. 181: 3212-3219.

Spellerberg B. 2000. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. Mircobes Infect. 2(14):1733-42.

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

Stalhammar-Carlemalm M., Stenberg L, Lindahl G. 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., Tardif G., Clewell D.B. 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., Clewell D.B. 1996. Rgg is a positive transcriptional regulator of the *Streptococcus gordonii gtfG* gene. J Bacteriol. 178: 5826-5830.

Talay S.R., Valentin-Weigand P., Jerlström P.G., Timmis K.N., Chhatwal G.S. 1992. Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: Sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. Infect immune. 60(9):3837-3844.

Talay S.R., Valentin-Weigand P., Timmis K.N., Chhatwal G.S. 1992. Domain structure and conserved epitopes of Sfb protein, the fibronectin-binding adhesin of *Streptococcus pyogenes*. Mol Microbiology 13(3):531-9.

Talay S.R., Zock A., Rohde M., Molinari G., Oggioni M., Pozzi G., Guzman C.A., Chhatwal G.S.. 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., Kuypers J.M., Smith S., Raff H., Rubens C.E. 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., Rubens C.E. 1995. Group B streptococci adhere to a variant of fibronectin attached to a solid phase. Mol Microbiol. 15: 581-589.

Tamura G.S., Herndon M., Przekwas J., Rubens C.E., Ferrieri P., Hillier S.L. 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., Nittayajarn A., Schoentag D.L.2002. A glutamine transport gene, *glnQ,* is required for Fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. Infect Immun. 70(6):2877-2885.

Tapsall J.W., Phillips E.A. 1991. The hemolytic and cytolytic activity of group B streptococcal hemolysin and its possible role in early onset group B streptococcal disease. Pathology. 23(2):139-44

Tenenbaum T., Bloier C., Adam R., Reinscheid D.J., Schroten H. 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.

Tenenbaum T., Spellerberg B., Adam R., Vogel M., Kim K.S., Schroten H. *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. Microbes Infect. 9(6):714-20.

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

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

Tettelin H., Masignani V., Cieslewicz M.J., Donati C., Medini D., Ward N.L., Angiuoli S.V., Crabtree J., Jones A.L., Durkin S., DeBoy R.T., Davidson T.M., Mora M., Scarselli M., y Ros I.M., Peterson J.D., Hauser C.R., Sundaram J.P., Nelson W.C., Madupu R., Brinkac L.M., Dodson R.J., Rosovitz M.J., Sullivan S.A., Daugherty S.C., Haft D.H., Selengut J., Gwinn M.L., Zhou L., Zafar N., Khouri H., Radune D., Dimitrov G., Watkins K., O´Connor K.J.B., Smith S., Utterback T.R., White O., Rubens C.E., Grandi G., Madoff L.C., Kasper D.L., Telford J.L., Wessels M.R., Rappuoli R., Fraser C.M. 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial “pan-genome”. PNAS. 102(39):13950-13955.

Thern A., Wästfelt M., Przekwas J., Lindahl G. 1998. Expression of two different antiphagocytic M proteins by *Streptococcus pyogenes* of the OF^+ lineage. J Immunol. 160:860-869.

Tjalsma H., Bolhuis A., Jongbloed J.D.H., Bron S., van Dijl J.M. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. Micobiol Mol Biol Rev. 64(3):515-547.

Ton-That H., Liu G., Mazmanian S.K., Faull K.F., Schneewind O. 1999. Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPGTG Motif. PNAS. 96(22):12424-12429.

Ton-That H. Maraffini L.A., Schneewind O. 2004. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. Biochim Biophys Acta. 1694(1-3):269-78.

Tsai P.J., Kuo C.F., Lin K.Y., Lin Y.S., Lei H.Y., Chen F.F., Wang J.R., Wu J.J. 1998. Effect of group A streptococcal cysteine protease on invasion of epithelial cells. Infect Immun. 66(4):1460-1466.

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

Ulett G.C., Bohnsack J.F., Armstrong J., Adderson E.E. 2003. Beta-hemolysin-independent induction of apoptosis of macrophages infected with serotype III group B *Streptococcus*. J Infect Dis. 188(7):1049-53

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

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

Van Bueren A.L., Higgins M., Wang D., Burke R.D., Boraston A.B. Identification and structural basis of binding to host lung glycogen by streptococcal virulence factors. Nat Struc Mol Biol. 14(1):76-84.

VanHeyningen T., Fogg G., Yates D., Hanski E., Caparon M. 1993. Adherence and fibronectin binding are environmentally regulated in the group A streptococci. Mol Microbiology. 9(6):1213-22.

Vanier G., Sekizaki T., Dominguez-Punaro M.C., Esgleas M., Osaki M., Takamatsu D., Segura M., Gottschalk M. 2007. Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. Vet Microbiol.

Van Wely K.H.M., Swaving J., Freudl R., Driessen A.J.M. 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Rev. 25:437-454.

Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraboty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Mircobiol Rev. 14(3):584-640.

Verghese A., Berk S.L., Boelen L.J., Smith J.K. 1982. Group B streptococcal pneumonia in the elderly. Arch Intern Med. 142(9):1642-5.

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

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

Wang J.R., Stinson M.W. 1994. M Protein mediates streptococcal adhesion to HEp-2 cells. Infect Immun. 62(2):442-448.

Wei L., Pandiripally V., Gregory E., Clymer M., Cue D. 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.

Wessels M.R. 1997. Biology of streptococcal capsular polysaccharides. Soc Appl Bacterial Symp Ser. 26: 20S-31S.

Wessels M.R., Rubens C.E., Benedi V.J., Kasper D.L. 1989. Definition of a bacterial virulence factor: Sialylation of the group B streptococcal capsule. Proc Natl Acad Sci. 86:8983-8987.

Whitnack E., Beachey E.H. 1985. Degradation products of fibrinogen and fibrin prevent opsonization of group A streptococci. Trans Assoc Am Physicians 98:392-398.

Whitnack E., Beachey E.H. 1982. Antiopsonic activity of fibrinogen bound to M protein on the surface of group A streptococci. J Clin Invest. 69:1042-1045.

Winram S.B., Jonas M., Chi E., Rubens C.E. 1998. Characterization of group B streptococcal invasion of human chorion and amnion epithelial cells in vitro. Infect Immun. 66: 4932-4941.

Yakhnin H., Pandit P., Petty T.J., Baker C.S., Romeo T., Babitzke P. 2007. CsrA of *Bacillus subtilis* regulates translation initiation of thee gene encoding the flagellin protein (*hag*) by blocking ribosome binding. Mol Microbiology. 64(6): 1605-20.

Yamamoto Y., Poyart C., Trieu-Cuot P., Lamberet G., Gruss A., Gaudu P. 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.

Zawaneh S.M., Elia M.A., Baer H., Cruz A.C., Spellacy W.N. 1979. Factors influencing adherence of group B streptococci to human vaginal epithelial cells. Infect Immun. 26: 441-447.

VIII. Anhang

1. DNA- und Proteinsequenzen

Startcodon

Stoppcodon

Helix- turn- Helix - Motiv

1.1. DNA- Sequenz des codierenden Bereichs von *rgg3* aus *S. agalactiae* 6313

```
TGTTTTCCAAATGCTTGGTGGCATTCGCTCTGGTATGGGATATGTAGGTGCAGCGAACAT     60
AAAAGAACTTCATGATAATGCTCAATTTGTTGAAATGTCAGGAGCTGGCTTGAAAGAAAG    120
CCATCCCCATGATGTTCAAATTACAAATGAGGCACCAAATTATTCAGTACACTAAAATAA    180
GGGCAAAAAGCATCCCCTATGAGGATGCTTTTTGTTGCATAAAAGAAACAAATATAGTAA    240
AGTTTTTGTATGAAAAATTATGGAAAAATTTTAAAAGAGTTGAGAGAGGACAAAGGTATA    300
TCCCTAAGTTCTCTAGCCAAAAGTGCTCAATTATCAAAATCAACTCTATCACGTTTTGAA    360
AATGGTGAGACACAAATAGGTATTGATAAATTTATTAAAGCTTTACAAACGTTGGAGGTT    420
GGGGTAACTATCAATGAAGTATCCATTCTAGATTCAAAAGTTAAGGCTGGAACTTCTAAT    480
ACTGATTTAGAGCAATTAACTTTACTGGAATCTTATCGAGATAATGAAGATATCATGAGA    540
ATTTTCAGTTTCCAAAAACAACAATCCTGTGATAGAATAGAAAGCAATGTTCTCAAAATA    600
TTGGCTAAACTTTTTATTTCAAATTTAGGGTTAAATATGAGGCTGCCTCAAGATGAGATT    660
AACCTGGTAGTTACTTATCTGAATGGTGTGACACAGTACAATGATTTTTATTTCAAAGTC    720
ATCTGCTATTTTCAAGATATTTTACCTGAAGATGTTATTTTAAATAAGATTAGTAATATG    780
ACTAAAGAACAGTTACCTTATTCTAAATCACTGGTCAATTTATTGATAAAACAAGTCATT    840
ATAGCTTTGGAAAAAGATAGTGTTGATAAAGCTATAGTATTTGCTGATCTTGCTAATAAA    900
GTTAGTCAATAGATTCTCTAGGATTGAAAATAGGTAATACTTAATATTCCATTGTAAGGA    960
GAAAGAATTGGAAGGTTTACTTATTGCATTGATTCCCATGTTTGCGTGGGGAAGTATTGG   1020
ATTTGTTAGTAATAAAATTGGAGGACGTCCAAATCAACAAACATTTGGAATGACTTTAGG   1080
AGCATTGCTATTTGCGATTATCGTATGGTTATTTAAACAGCCAGAGATGACTGCCTCATT   1140
GTGGATTTTTGGTATCTTAGGTGGTATCCTATGGTCAGTCGGCCAAAATGGTCAATTCCA   1200
```

1.1. DNA- Sequenz des codierenden Bereichs von *rogB3* aus *S. agalactiae* 6313

```
ACAACCAGATCAGTTAACCATAAAAATTCAGGATGGCCCAGAATTTTTAGAGTACCATCT     60
TGATTTAGATACCCAAGACATCGGTCGTGTTATCGGCAAAAAGGGTCGTACAATTACAGC    120
GATAAGGTCGATTGTCTATTCGGTACCAACACAAGGGAAAAAAGTAAGACTCATCATTGA    180
TGAGAAAGAATAATTTATTCTAAAAGATAGGAACTTCCTGTCTTTTTTGTTATATCTACA    240
CAAAAATTGTGAGTTTTTTAGTCTTTTAGAATATAATGGATGTGAAAGGGAATTTTCTGA    300
TTTTTTATTAAGGAGGATAAGATATTGCTATTTGATTTTCTCGAAGAAAAAATAAAACTG    360
AAAGCATACCTGATGACCGCCTTACTTGATGATGGAGAAATTAACCTTGATCACTTTAAA    420
ACAGAATATGCTTTGAGTGAAAAGATTTTACAAGGTCTTATTTCGGAACTACAAATACTT    480
TATTCTGATTTCTACCTTGTTGTCAAAAGTAGAACAATGGTATTGTTCCATTACGAAACA    540
CTTTCTAAGCTAGAGACTTTGCATACCATTTATCGAGAGTCTAATACGTTACAGTTTTTG    600
GCATATTTTATTGCTCCTCAAAATGTCAGTTTTTCTGAATTCACGGCTAAGAAATTCATA    660
TCCGTCGCAAGTGCCTACCGAATAAAGAAAAACTGTAAACTTTATTTGGAGAGTGTTAAG    720
TTATCAATACAAAAAAATAAAGTGACAGGTCCAGAATATCAGATTAGGCTGCTGATTGCT    780
TTGTTACAGTATCATTTTGGTTTTATTATTTATCCTTTTGATGCTACAAGTGAGGTAATG    840
ATAAGGGATTTTATTGAATACTCGAATTTTAAAGGGTGTGACTACGACCTTAAAGACTTA    900
TCTGAAGAATATTACTATTTTTATATTTTGGTGAATTTAGTTTGGAAAAGAAAAGAATAT    960
AAAGTAGAAATTCCTCAAACAGAATCCTTTAATCAACTAAAAAAATCTATTCTCTACATG   1020
GAGTTATCCAAAGCAGCTCAAAAGAGTATTGCTATACATCTTGGTATAGAGTTGAATGAA   1080
GGTTTACTTGATTATCTATATTTAGTGTTTTGTATTAGTGATGGTCCTCTATTTAGCAAT   1140
CGAGATGATATCAATATCAACGAAGAATTTATTTTTGCTTCTTATAAGATATCAAAGTCT   1200
AAAGCCTTTAAGAATTTTTGTGGTCGATTATTGGGTAGAGAATTTATTGACTCGCAGCAT   1260
TTTAAAGATATTAATGCCTATTTTTTGAGACATTTTATTTGTTATTGTTATTATTTTATT   1320
CCTGATTTTTATTTTTTAAATACATCAAGGCTGAGCTATTCTAAGGATTTATATCACCTA   1380
TTAGATAAAGGTCTGGCTGATATTTTTAACCTTAAAGGAGGGAATTTAACTTTTTCAAAA   1440
CATGAGACAGTGCTACTAACAATGCAATTATCTAACTTAATAGAGACTTTCTTAGCTCCT   1500
CTTTCTGTATATGTAATTTCATCTAGTAATATTAGATTACAAACCTATCAAGTAATGTTA   1560
AACCAATATTTTACATCTAAGATAGCGGAATTCTTTTTTGTAAACTATCAAACGACTCAG   1620
ATAGATGAAAAATTACTAAAAAAAGCAGATATCATTATTGCTGAGAGACGCTATATATCT   1680
TCTTTAAAAAATGACTCAGGTGTGGCTATACAAGATATATTAGAAATTGGGATGAATAAT   1740
AAGCAGTACCATGAACTACTTTTACAAGCTATTATCGAAAAAAGGGACCAAAAAGTTTTT   1800
GAATATATTTCAAAAATGAAACATAAAATACTTTGATAGACTCTATATGAGCTTTATTAA   1860
AAGGGATAAAATCGAAATTTAAAATTTAATTCGAAAAGATATTGACAGTAATCTAGAATT   1920
TCGATATACTAGATTTTGTCTTTTGGGGTATAGCCAAGCGGTAAGGCAAGGGACTTTGAC   1980
TCCCTCATGCGTTGGTTCGAATCCAGCTACCCCAGTTTCACATGGTCCGTTGGTCAAGGG   2040
GTTAAGACACCGCCTTTTCACGGCGGTAACACGGGTTCGAATCCCGTACGGACTATCGTG   2100
GCCAGTTGCATTTTAGCGGCTGGTTTTTCTTTTATTTTCAAAAATATCGGAGTTACTATG   2160
```

1.3. Proteinsequenz von Rgg3

```
MKNYGKILKELREDKGISLSSLAKSAQLSKSTLSRFENGETQIGIDKFIKALQTLEVGVT   60
INEVSILDSKVKAGTSNTDLEQLTLLESYRDNEDIMRIFSFQKQQSCDRIESNVLKILAK  120
LFISNLGLNMRLPQDEINLVVTYLNGVTQYNDFYFKVICYFQDILPEDVILNKISNMTKE  180
QLPYSKSLVNLLIKQVIIALEKDSVDKAIVFADLANKVSQ                      120
```

1.4. Proteinsequenz von RogB3

```
LLFDFLEEKIKLKAYLMTALLDDGEINLDHFKTEYALSEKILQGLISELQILYSDFYLVV   60
KSRTMVLFHYETLSKLETLHTIYRESNTLQFLAYFIAPQNVSFSEFTAKKFISVASAYRI  120
KKNCKLYLESVKLSIQKNKVTGPEYQIRLLIALLQYHFGFIIYPFDATSEVMIRDFIEYS  180
NFKGCDYDLKDLSEEYYYFYILVNLVWKRKEYKVEIPQTESFNQLKKSILYMELSKAAQK  240
SIAIHLGIELNEGLLDYLYLVFCISDGPLFSNRDDININEEFIFASYKISKSKAFKNFCG  300
RLLGREFIDSQHFKDINAYFLRHFICYCYYFIPDFYFLNTSRLSYSKDLYHLLDKGLADI  360
FNLKGGNLTFSKHETVLLTMQLSNLIETFLAPLSVYYVISSSNIRLQTYQVMLNQYFTSKI  420
AEFFFVNYQTTQIDEKLLKKADIIIAERRYISSLKNDSGVAIQDILEIGMNNKQYHELLL  480
QAIIEKRDQKVFEYISKMKHKIL                                        503
```

2. Chemikalien, Geräte und Materialien

2.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind nachfolgend alphabetisch aufgelistet:

Aceton	Merck AG; Darmstadt
Acrylamidmix (38,66 % Acrylamid, 1,33 % Bisacrylamid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Gibco Life Technologies, Inc.; Eggenstein
Ammoniumsulfat	Merck AG; Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck AG; Darmstadt
Ampicillin	Merck AG; Darmstadt
Amylose- Resin	New England Biolabs; Frankfurt
Antibiotika- Mix (Zellkultur)	Gibco Life Technologies, Inc.; Eggenstein
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
Columbia Agar Base	Oxoid; Wesel
Coomassie Brillant Blue G250	Serva Feinbiochemika; Heidelberg
CSPD® - Lösung (Chemilumineszenz-Substrat)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Desoxynukleotidtriphosphat – 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
ECL- Kit	GE Healthcare, München
Eisessig	Merck AG; Darmstadt
Erythromycin	Sigma - Aldrich Chemie GmbH; Steinheim

Ethanol abs., unvergällt	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Ethanol abs., vergällt	Merck Eurolab GmbH
Ethidiumbromid	GE Healthcare, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka - Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Fibrinogen	Sigma - Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Ficoll TM-400	GE Healthcare, München
Fluoresceinisothiocyanat	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
L- Glutamat	Gibco Life Technologies, Inc.; Eggenstein
Glycerin (99 %, wasserfrei)	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Glycin	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Größenstandards	
- 1 kb-DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH; St. Leon – Rot
- Page Ruler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas GmbH; St. Leon – Rot
Heringssperma - DNA	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Imidazol	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Isoamylalkohol (IAA)	Merck AG; Darmstadt
Isopropanol	Merck AG; Darmstadt
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck AG; Darmstadt
Kaliumchlorid	Applichem GmbH; Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Merck AG; Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck AG; Darmstadt
di - Kaliumhydrogenphosphat	Merck AG; Darmstadt
Kanamycin	Merck AG; Darmstadt
Lithiumchlorid	Merck AG; Darmstadt
Magnesiumchlorid x 6 H_2O	Merck AG; Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H_2O	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen

Maleinsäure	Merck AG; Darmstadt
Maltose	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Mangansulfat	Serva Feinbiochemika; Heidelberg
MEM	Gibco Life Technologies, Inc., Eggenstein
ß- Methanol	Merck AG; Darmstadt
Mercaptoethanol	Serva Feinbiochemika; Heidelberg
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
oNPG	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Phenol / saures Phenol	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Phenolrot	Merck AG; Darmstadt
Phosphorsäure (H_3PO_4)	Merck AG; Darmstadt
Poly[d(I-C)]	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Polyvinylpyrrolidone	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
RPMI	Gibco Life Technologies, Inc., Eggenstein
Salzsäure (32 % und 37 %)	Merck AG; Darmstadt
Schafsblut, defibriniert (SR0051D)	Oxoid; Wesel
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen

TEMED	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Todd Hewitt Broth (THB)	Oxoid; Wesel
Toluol	Sigma - Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma - Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Trinatriumcitrat	Merck AG; Darmstadt
Tris - Base	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom KG, Berlin
Trypsin/ EDTA	Gibco Life Technologies, Inc.; Eggenstein
Tween 20	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen
Tween 80	Fluka - Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen

2.2. Geräte und Materialien

Alle in dieser Arbeit benutzten Geräte und Materialien sind nachfolgend alphabetisch geordnet aufgeführt:

Agarose - Gelelektrophorese - Kammer (Horizon™ 11.14 und Modell H5)	Gibco Life Technologies, Inc; Eggenstein
Autoklav	H + P Labortechnik GmbH
Autoklav	ZIRBUS
Brutschrank (37 °C)	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
Brutschrank (39 °C)	Memmert GmbH & Co.KG; Schwabach
Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2, BB16)	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
Brutschrank (37 °C, 5 % CO2; BB6220)	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
Cellophan-Papier	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Säule, 2,5 ml, 10 µl Porengröße	MoBiTek, Göttingen
Cytofluor II	PerSeptive Biosys., Inc.; Framingham, USA
Dialysefilter	Millipore GmbH; Eschborn
Dialyseschlauch (Viskings®-dialysis tubing 20/32)	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Einmalspritzen, 20 ml	Ersta, Røgby
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Labor Schubert und Weiss GmbH; München
Elektrophoresis Power Supply EPS 300	GE Healthcare, München
Elektroporationsgerät Gene - Pulser II	Bio – Rad Laboratories; Hercules, USA

Blue Flash™ Semy dry Blotter	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Fotodokumentationsanlage	MWG Biotech GmbH; Ebersberg
FrenchPress	SLM instruments, Inc.; New York, USA
PerfectBlue Doppelgelsystem	PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen
Geltrocknungsrahmen	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Glasperlen (0,2 mm)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Glasbeads	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Heizblock	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg
(Thermostat 5320, Thermomixer compact)	
Hybridisierungsofen Biometra OV2	Biometra GmbH; Göttingen
Hyperfilm ECL (18 x 24 cm)	GE Healthcare, München
Inkubationsschüttler:	
- Certomat MO	B. Braun Biotech International
- G 24 environmental incubator shaker	New Brunswick Scientific Inc.; USA
Kühlschrank	Liebherr; Ochsenhausen
Küvetten	GE Healthcare, München
- Black Quarz Pathlength 10 mm, 50µl	GE Healthcare, München
- Einmalküvetten	Ratiolab GmbH; Dreieich-Bucheck
- Elektroporationsküvetten	EQUIBIO
- Quarzglasküvetten	SUPRASIL
Lightcyler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikroskop	Olympus; Japan
Mikroskop Telaval 31	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Esslingen
Mikrowellengerät OPTIQUICK	Moulinex
Mullbinde	Apotheke
Nitrocellulosemembran	Machery-Nagel GmbH & Co.KG; Düren
Nylonmembran (positiv geladen)	Boehringer, Appligene oncor
PCR - Mastercycler 5330	Eppendorf AG; Hamburg
PCR- Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Petrischalen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
PD10- Säulen	GE Healthcare; München
pH - Meter (WTW pH 521)	Wissenschaftl.-Techn.Werkstätten Weilheim
Photometer Ultrospec™ 3000	GE Healthcare, München
Photometer Ultrospec™ 2100	GE Healthcare, München
Reaktionsgefäße	
- 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf AG; Hamburg
- 15 ml, 50 ml	Falcon
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´	GE Healthcare, München
- `Vacu Gene pump´	GE Healthcare, München
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schüll
Sterilwerkbank (Lamin Air® HA 2448 GS)	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
Terasaki Platten	Nunc, Wiesbaden
Tiefkühlschrank	
- -20°C	Liebherr; Ochsenhausen
- -70°C	Heraeus Instruments GmbH; Fellbach
Ultraschallgerät (Branson Sonifier 450)	Heinemann; Schwäbisch Gmünd
Ultraviolett - Crosslinker	GE Healthcare, München
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
Whatmanpapier	Whatman Int. Ltd. Maidstone; England
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

3. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut, 100%
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
A. dest.	destilliertes Wasser
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp^R	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	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
DTT	Dithiothreitol
ECL	`enhanced chemiluminescence´

E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ery	Erythromycin
Em^R	Erythromycinresistenz
et al	´et alii` (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	Foetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAS	Gruppe A Streptokokken
GBS	Gruppe B Streptokokken
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H_2O	Wasser
H_3PO_4	Phosphorsäure
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
k	kilo - (1×10^3)
Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
Km^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilo - Basenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
mbar	Millibar
Mbp	Maltose- binde Protein
MCS	Multiple Cloning Site
µF	Mikro-Farad
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)

mind.	mindestens
µJ	Mikrojoule
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mU	Milliunit
N	Normal (Anzahl Mole Äquivalentteilchen pro Liter)
NaCl	Natriumchlorid
Na_2CO_3	Dinatriumcarbonat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEAAs	Non essential Aminoacids
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
N-Terminus	Amino-Terminus
oNPG	Ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
Ω	Ohm
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
ori	origin, Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PBST	Phosphat bepufferte Saline mit Tween
PCR	´Polymerase Chain Reaction`
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	Picomol
RBS	Ribosomen - Bindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S. agalactiae	*Streptococcus agalactiae*

SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sec	Sekunde(n)
SSC	Standard - Saline - Citrat
Sol	Solution
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

Publikationsliste und Wissenschaftliche Beiträge

Wissenschaftliche Beiträge auf nationalen Tagungen

Posterpräsentationen

Schaller B., Gutekunst H., Schubert A., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J.
The fibrinogen- binding protein FbsB of different *Streptococcus agalactiae* strains controls the bacterial adherence or invasion of human epithelial cells.
2. Gemeinsamer Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Göttingen (2005)

Schaller B., Schubert A., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J.
Analysis of RogB3 controlled adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells.
33. Jahrestagung der VAAM in Jena (2006)

Schaller B., Schubert A., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J.
Analysis of RogB3 controlled adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells.
Tagung der Fachgruppe „Mikrobielle Pathogenität“ in Bad Urach (2006)

Schaller B, Tautzenberger A., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J., Borges F.
The transcriptional regulator Rgg3 controls fibrinogen-binding of *Streptococcus agalactiae* and bacterial adherence to epithelial cells.
59. Jahrestagung der DGHM in Göttingen, 2007

Kurzvortrag

Heike Gutekunst, Beate Schaller, Bernhard Eikmanns, Dieter Reinscheid
Bedeutung des Fibrinogen-bindenden Proteins FbsB für die Invasion von *Streptococcus agalactiae*
Tagung der Fachgruppe „Mikrobielle Pathogenität“ in Bad Urach (2004)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns möchte ich ganz herzlich danken, dass ich unter seiner Obhut meine Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie anfertigen durfte. Insbesondere gilt mein Dank der Unterstützung jeglicher Art, das stets offene Ohr und der Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Dieter J. Reinscheid möchte ich für die Bereitschaft zur fachlichen Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Auch wenn die Entfernung nicht immer leicht zu überwinden war, konnte ich dennoch stets auf seine Unterstützung zählen. Ein besonderer Dank gilt dem Korrekturlesen und der Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Peter Dürre möchte ich ganz herzlich für das Zustandekommen des guten Arbeitsklimas am Institut danken. Der Unterstützung in allen Fragen des wissenschaftlichen Alltags und der Übernahme des Koreferats gilt ein besonderer Dank.

Einen herzlichen Dank möchte ich meinen lieben Mitstreitern und Kollegen aussprechen, welche mich stets unterstützt haben und in diversen Kaffeepausen den Alltag nicht langweilig werden ließen. Insbesondere möchte ich mich bedanken bei Denise Emer für die offenen Gespräche, bei Frederic Borges `for being Fred´, bei Dominik Meisohle für die Streifzüge durch die Welt des *Homo Sapiens*, bei Marc Auchter für sein stets offenes Ohr, bei Niklas Nold und Steffi Würfl für die schönen Mittagspausen und die netten Abende, bei Anke Lübeck für die gegenseitigen Aufbaumaßnahmen, bei Annette Arndt für die heiteren Gespräche, bei Marita Gleinser für die gemeinsame musikalische Umrahmung der Laborarbeit und bei Andrea Tautzenberger für eine sehr angenehme Praktikumszeit. Weiterhin bedanke ich mich bei Christian Hagmann, Simone Lederle, Sonja Brehm, Thomas Rimpf, den Jungs vom `vorderen Labor´ und alle, die ich jetzt vergessen habe für die tolle Arbeitsatmosphäre. Den Ehemaligen Annette Cramer, Gerd Seibold, Ulrike Samen, Sabrina Lachenmaier, Axel Schubert und besonders Heike Gutekunst danke ich für die schönen Stunden, die ich mit Euch verbringen dürfte.
Einen besonderen Dank spreche ich für das Engangement der guten Seelen der Abteilung Brigitte Zickner, Brigitte Ehrler, Petra Dangel, Iris Steiner und Annerose Frank aus. Ihr habt wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen und meinen Alltag positiv geprägt.

Meinen lieben Eltern möchte ich dafür danken, dass ich auf jede Unterstützung bauen konnte und dafür, dass sie mir all das möglich gemacht haben. Ohne Euch wäre ich nicht das was ich bin. Vielen Dank auch meinen Geschwistern Rainer, Christian und Manuela und all meinen Freunden für die stets willkommene Ablenkung vom Unialltag.

Zuletzt möchte ich meinen lieben Freund Philipp danken, der mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen ist und dabei immer an mich geglaubt hat. Unsere gemeinsamen Stunden haben mir sehr viel Kraft gegeben und mich das Ziel nie aus den Augen verlieren lassen.

Unterstützung durch universitäre und nicht universitäre Einrichtungen

Universität Ulm, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene unter Leitung von Prof. Dr. S. Stenger:

Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der sterilen Zellkultur, Nutzung und Bereitstellung des Cytofluors, Lagerung von S2- Organismen

Universität Ulm, Institut für Virologie unter Leitung von Prof. Dr. T. Mertens:

Nutzung des Light Cyclers

Universität Ulm, Zentrale Einrichtung Elektronenmikroskopie unter der Leitung von Prof. Dr. P. Walther:

Probenaufarbeitung und Nutzung des Rasterelektronenmikroskops

Landesgraduiertenförderungskolleg:

Bewilligung eines Promotionsstipendiums