

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der  
Universität Ulm

Prof. Dr. med. Steffen Stenger

**Regulatorische DNA-Sequenzen in der Promoterregion des  
*Streptococcus agalactiae* Hämolysin-Genclusters**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.) der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von  
**Katharina Appel**  
geboren in Karlsruhe

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Barbara Spellerberg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth

Tag der Promotion: 08.12.2011

**Für meine Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Bakterienstämme .....	10
2.1.2 Plasmide .....	10
2.1.3 Oligonukleotide .....	11
<b>2.2 Chemikalien, Kits und Enzyme.....</b>	<b>14</b>
2.2.1. Kits .....	14
2.2.2 Enzyme .....	14
<b>2.3 Stammhaltung, Kultivierungsbedingungen und Nährmedien .....</b>	<b>14</b>
2.3.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	14
2.3.2 Kultivierung von <i>S. agalactiae</i> .....	16
<b>2.4 Isolierung von DNA .....</b>	<b>17</b>
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	17
2.4.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus Streptokokken.....	18
<b>2.5 Phenolextraktion und Ethanol-fällung .....</b>	<b>19</b>
<b>2.6 Amplifikation, Modifikation und Analyse von DNA.....</b>	<b>20</b>
2.6.1 Polymerasekettenreaktion.....	20
2.6.2 Agarosegelelektrophorese .....	21
2.6.3 Restriktion von DNA.....	22
2.6.4 Ligation.....	23
2.6.5 Sequenzierung von DNA.....	23
<b>2.7 Transformationstechniken.....</b>	<b>25</b>
2.7.1 Transformation von <i>E. coli</i> .....	25
2.7.2 Transformation von <i>S. agalactiae</i> .....	26
<b>2.8 Untersuchungen zur Hämolyse von <i>S. agalactiae</i> .....</b>	<b>27</b>
2.8.1 Überstempelungen .....	27
2.8.2 Hämolysinassay .....	27
<b>2.9. Statistik.....</b>	<b>29</b>
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>30</b>

---

<b>3.1 Herstellung von Vektorkonstrukten und Transformation in O90R.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Einfluss der Promoterregion auf das Hämolyseverhalten.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3 Herstellung von Deletionsmutanten.....</b>	<b>35</b>
<b>3.4 Einfluss der Promoterregion auf die Pigmentierung .....</b>	<b>38</b>
<b>3.5 Hämolysinassays .....</b>	<b>44</b>
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>57</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>58</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>68</b>
<b>Chemikalien .....</b>	<b>68</b>
<b>Geräte .....</b>	<b>69</b>
<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>70</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>72</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>73</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC-Transporter	ATP binding cassette-Transporter
A. bidest	Aqua bidest
abs.	absolut
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ad	an, bei, zu
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DH5α	Wildtypstamm von <i>Escherichia coli</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DMF	Dimethylformamid
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
F	Faraday
FCS	Foetal Calf Serum
fwd	forward
g	Gramm
G	Guanin
GBS	Gruppe B Streptokokken
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff (in Wasser gelöst: Salzsäure)

---

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
<i>lacZ</i>	Gen, welches für das Enzym β-Galactosidase codiert
LB	Luria-Bertani (Medium)
LD <sub>50</sub>	letale Dosis für 50% der Population
log	Logarithmen
LV	Leervektor
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MCS	multiple cloning site
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute(n)
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MTHB	Modifizierter Todd-Hewitt-Broth (Medium)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
Ω	Ohm
O90R	Wildtypstamm von <i>Streptococcus agalactiae</i>
OD <sub>540</sub>	Optische Dichte bei 540 nm
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
<i>oriR</i>	origin of replication
<i>oriT</i>	origin of transfer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

---

pmol	Picomol
rev	reverse
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
<i>spc</i>	Gen, welches für Spectinomycinresistenz codiert
T	Thymin
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-HCl-EDTA-Natriumacetat (Pufferlösung)
TCS	two-component system (Zweikomponentensystem)
TE	Tris-EDTA (Pufferlösung)
TENS	Tris-EDTA-NaOH-SDS (Pufferlösung)
TES	Tris-EDTA-NaCl (Pufferlösung)
THB	Todd Hewitt Broth (Medium)
THY	THB mit Hefe (Medium)
TRIS	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
µl	Mikroliter
u	und
U	Enzymeinheit (1 U = Enzymmenge, die 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt)
ÜN-Kultur	Übernacht-Kultur
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
vs.	versus (gegen, gegenüber gestellt)
Vol.	Volumenanteil
(v/v)	volume per volume (Volumen pro Volumen)
(w/v)	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (Substrat für das Enzym β-Galactosidase)



## 1 Einleitung

Streptokokken werden zusammen mit Laktokokken in die Familie der Streptococcae eingeordnet. (Garrity et al., 2007). Die Gattung *Streptococcus* umfasst dabei gram-positive, sphärisch bis ovale, nicht sporulierende und unbewegliche Zellen, die sich bevorzugt in Ketten oder Paaren zusammenlagern (Hahn et al., 2005 a).

Eine erste Einteilung der Streptokokken erfolgte Anfang des 20. Jahrhunderts aufgrund ihres Hämolyseverhaltens auf Blutagarplatten (Brown, 1920). Bis heute werden 3 Hämolyseformen unterschieden: Bei der  $\alpha$ -Hämolyse handelt es sich um einen unvollständigen Abbau der Erythrozyten, welcher eine grünliche Verfärbung des Agars um die Kolonien zur Folge hat. Bei diesem auch als Vergrünung bezeichneten Effekt, wird das Hämoglobin der Erythrozyten durch das von den Bakterien ausgeschiedenen  $H_2O_2$  zu Methämoglobin oxidiert. Die  $\beta$ -Hämolyse zeichnet sich durch eine vollständige Lyse der Erythrozyten und kompletten Abbau des Hämoglobins aus. Die Kolonien auf den Blutagarplatten sind daher von einem klaren, durchscheinenden Lysehof umgeben.  $\gamma$ -hämolytische Streptokokken schließlich sind nicht zur Lyse von Erythrozyten befähigt und werden daher auch als nicht-hämolisierende Streptokokken bezeichnet.

Für die Klasse der  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken, zu denen auch *Streptococcus agalactiae* zählt, wurde 1933 von Rebecca Lancefield ein weiteres Klassifizierungsschema etabliert. Es beruht auf der Präsenz verschiedener Polysaccharidantigene in der Zellwand der Streptokokken und ermöglichte eine Einteilung der Streptokokken in die Serogruppen A-E (Lancefield, 1933). *S. agalactiae* ist als einziger Vertreter der Serogruppe B bekannt, was zur synonymen Verwendung der Namen *S. agalactiae* und Gruppe B Streptokokken (GBS) führte.

Basierend auf typenspezifischen Kapselpolysacchariden wird *S. agalactiae* in verschiedene Serotypen eingeteilt: lange Zeit waren mit Ia, Ib und II-VIII insgesamt 9 Serotypen bekannt (Cieslewicz et al., 2005); kürzlich wurde nun zusätzlich Serotyp IX beschrieben (Slotved et al., 2007). Innerhalb der letzten Jahre wurde *S. agalactiae* zudem mittels Multilocus Sequence Typing in mehrere Sequenztypen eingeteilt. Bei dieser Methode werden 7 sogenannte „house keeping“-Gene sequenziert und verschiedene Allele nummeriert. Ein Sequenztyp ist durch eine festgelegte Abfolge dieser Allele definiert (Jones et al., 2003).

Im Jahre 1887 wurde *S. agalactiae* als Verursacher einer Mastitis bei Rindern identifiziert (Nocard u. Mollereau, 1887) und galt danach lange Zeit als ausschließlich tierpathogener Keim. 1937 wurde *S. agalactiae* erstmals als Verursacher des Kindbettfiebers beschrieben (Colebrook u. Purdie, 1937) und 1939 von Brown als Auslöser einer Sepsis dokumentiert (Brown, 1939). Seit Mitte der 60er Jahre ist *S. agalactiae* als humanpathogener Erreger anerkannt und gilt seit 1973 als Hauptverursacher schwerer perinataler Infektionen in der Neugeborenenperiode (Wilkinson et al., 1973).

Klinisch werden hierbei zwei Verlaufsformen unterschieden: die sogenannte „early-onset disease“ mit einem Krankheitsbeginn innerhalb der ersten 6 Lebenstage des Neugeborenen, sowie die „late-onset disease“ mit einer systemischen Infektion des Säuglings 1 Woche bis zu 3 Monate nach der Geburt. Die early-onset disease, welche sich meistens bereits innerhalb der ersten 24 Stunden entwickelt, ist dabei mit circa 80% der Fälle die häufigere Verlaufsform (Neto, 2008; Andersen et al., 2004).

Das klinische Erscheinungsbild der early-onset disease ist von Pneumonie und Sepsis geprägt (Rajagopal, 2009). Seltener kann es zum Auftreten einer Meningitis, Osteomyelitis oder Arthritis kommen (Koenig u. Keenan, 2009). Insgesamt dominieren respiratorische Symptome, die bei bis zu 72 % der infizierten Säuglinge initial beobachtet werden (Andersen et al., 2004).

Bei der late-onset Verlaufsform herrschen neben Symptome einer Bakteriämie bis Sepsis neurologische Symptome im Rahmen einer Meningitis vor, die bei bis zu ca. 60 % der Fälle vorkommt (Maisey et al., 2008; Fluegge et al., 2006). Ein nicht unerheblicher Anteil der betroffenen Kinder erleidet Spätschäden in Form von chronischen Anfallsleiden oder eines Hydrocephalus (Levent et al. 2010).

In den USA liegen die aktuellen Inzidenzen für perinatale *S. agalactiae* – Infektionen bei 0,32-0,40 Fällen pro 1000 Lebendgeburten (van Dyke et al., 2009; CDC 2009). In verschiedenen europäischen Länder treten pro 1000 Lebendgeborene 0,4 bis 0,74 *S. agalactiae*-Infektionen auf (Bergseng et al. 2008; Ekelund u. Konradsen, 2004; Weisner et al., 2004). Die Mortalitätsrate, insbesondere bei einer early-onset Erkrankung, wird dabei mit bis zu 20 % angegeben. Die jüngsten Zahlen aus Deutschland geben eine Inzidenz von 0,47 *S. agalactiae*-Infektionen pro 1000 Lebendgeburten an, wobei 60 % der Neugeborenen an der early-onset und 40 % an der late-onset Verlaufsform erkrankten. Die Gesamtmortalitätsrate lag bei 4,3 % (Fluegge et al., 2006).

Bei der early-onset Erkrankung verläuft die Übertragung von *S. agalactiae* auf das Neugeborene in bis zu 97 % vertikal über die im Vaginaltrakt kolonisierte Mutter (Hickman et al., 1999). Der Säugling infiziert sich dabei im Mutterleib durch Aspiration von kontaminierter Amnionflüssigkeit oder während des Geburtsvorgangs (Rajagopal, 2009; Maisey et al., 2008). Die Kolonisationsrate von schwangeren Frauen mit *S. agalactiae* im Urogenital- und unteren Gastrointestinaltrakt wird in verschiedenen Arbeiten zwischen 6,5 und 36 % angegeben (Barcaite et al. 2008; Brimil et al., 2006; Hansen et al., 2004).

Der genaue Übertragungsweg bei der late-onset Verlaufsform einer *S. agalactiae*-Infektion ist bis heute unklar. In nur 50 % der Fälle werden bei Mutter und Kind der gleiche Serotyp gefunden (Schuchat, 1998). Die Bakterienübertragung scheint zumindest teilweise über Schmierinfektion durch Personen im engeren Umfeld des Säuglings (Mutter, Pflegepersonal, andere Säuglinge) zu erfolgen (MacFarquhar et al; 2010; Trager et al., 1996).

Für das Auftreten einer early-onset Infektion gibt es verschiedene Risikofaktoren. Vor allem Frühgeborene erkranken an dem durch respiratorische Dysfunktion geprägtem Krankheitsbild, was sich pathophysiologisch am Surfactant-Mangel und der unzureichend ausgeprägten Immunkompetenz der Säuglinge erklären lässt. Weitere Risikofaktoren wie ein frühzeitiger Blasensprung und ein Zeitfenster zwischen Blasensprung und Geburt > 18h verlängern die mögliche Kontaktzeit zwischen Keim und Kind, was ebenfalls die Wahrscheinlichkeit für eine nachfolgende Infektion erhöht (Adair et al., 2003; Schrag et al. 2002). Ferner ist eine starke Besiedlung der Mutter mit *S. agalactiae* als Risikofaktor zu nennen. Diese ist in der Regel asymptomatisch, kann sich aber durch aufsteigende Infektionen wie Harnwegsinfekt, Chorioamnionitis oder Endometritis klinisch bemerkbar machen (Ulett et al., 2009; Winn, 2007). Auch für das Auftreten einer late-onset Infektion konnte Frühgeburtlichkeit als Hauptrisikofaktor nachgewiesen werden (Lin et al., 2003).

In den letzten Jahren haben außerdem die Erkrankungen von nicht-schwangeren Erwachsenen an *S. agalactiae*-Infektionen drastisch zugenommen: Zahlen aus den USA von 2007 dokumentieren eine Verdopplung der Inzidenz auf 7,3 Erkrankungen pro 100.000 Personen im Zeitraum 1990-2007 (Skoff et al., 2009). Betroffen sind vor allem ältere und multimorbide Patienten. So bestehen bei 81-92 % der an einer *S. agalactiae*-Infektion erkrankten Patienten Grunderkrankungen wie maligne Neoplasien, Diabetes

mellitus oder chronische Lebererkrankungen (Huang et al., 2006; Blancas et al., 2004; Farley, 2001).

Das Spektrum der auftretenden Krankheitsbilder bei Infektion im Erwachsenenalter ist breit gefächert und reicht von lokalen Befunden zu schweren systemischen Infektionen. Unter anderem werden Abszesse, Arthritiden, Harnwegsinfekte, Pneumonien und Endokarditiden beschrieben (Binard et al., 2006; Falagas et al., 2006, Edwards u. Baker, 2005). Haut- und Weichteilinfektionen bilden dabei die häufigste klinische Erscheinungsform und gleichzeitig die Haupteintrittspforte für eine nachfolgende Bakteriämie/Sepsis (Sendi et al., 2008; Ho et al., 2006). Entsprechend der Bandbreite der auftretenden Krankheitsbilder variieren die veröffentlichten Zahlen zur Mortalität zwischen 6,8 und 20,2 % (Kothari, 2009; Huang et al., 2006).

Nach Einführung eines routinemäßigen Screenings von Schwangeren auf *S. agalactiae* und einer zunehmenden Verwendung von Antibiotikaprophylaxen intrapartum konnte in den letzten Jahren insgesamt ein Rückgang der auftretenden Neugeboreneninfektionen durch *S. agalactiae* beobachtet werden (Puopolo u. Eichenwald, 2010; Phares et al., 2008). Speziell die Rate an late-onset Erkrankungen konnte mit diesem Vorgehen aber nicht verringert werden. Im jüngsten Bericht der amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention (CDC) von 2009 konnte außerdem ein erneuter Anstieg der Inzidenz für early-onset Infektionen bemerkt werden (CDC 2009). Des Weiteren zeigen die steigenden Inzidenzen von *S. agalactiae*-Infektionen im Erwachsenenalter beunruhigende Tendenzen auf. Neue Strategien, wie z.B. die Entwicklung eines Impfstoffes, eröffnen diesbezüglich neue Perspektiven, haben sich bis heute aber als sehr schwierig zu realisieren erwiesen. Die genaue Charakterisierung wichtiger Virulenzfaktoren von *S. agalactiae* sowie Pathomechanismen bei der Infektion sind daher von großer wissenschaftlicher und medizinischer Bedeutung.

Zytolytische Toxine sind allgemein wichtige Virulenzfaktoren bei pathogenen Bakterien. Häufig werden diese zellschädigenden Toxine auch Hämolsine genannt, obwohl sie nicht nur Erythrozyten angreifen (Mims et al., 2006). Basierend auf ihre Wirkungsweise werden Zytolysine in 3 Gruppen unterteilt (Rowe u. Welch, 1994): (i) Zytolysine, die durch enzymatische Zerstörung der Wirtszellmembran zur Lyse der Zielzelle führen, (ii) Hämolsine, die als Detergenzien auf Wirtszellmembranen wirken und (iii) porenbildende Zytolysine, die Poren in die Zellmembran der Wirtszelle inserieren.

Die meisten Zytolysine sind porenbildende Proteine. Beispiele hierfür sind das  $\alpha$ -Hämolysin von *E. coli*, das  $\alpha$ -Toxin von *S. aureus* und das Streptolysin O von *S. pyogenes* (Bhakdi et al., 1996). Die Porenbildung erlaubt die freie Passage von kleinen Molekülen, was die Zerstörung des transmembranösen Protonengradienten und schließlich die Zelllyse zur Folge hat. Eine enzymatische Zerstörung der Zellmembran wird in der Regel durch Abbau von Phospholipiden herbeigeführt. Typische Beispiele für enzymatische Zytolysine sind die Phospholipase C von *Clostridium perfringens* und *Pseudomonas aeruginosa* (Hahn et al., 2005 b)

Auch bei *S. agalactiae* stellt die Fähigkeit zur Hämolyse einen wichtigen Virulenzfaktor dar. Dennoch ist wenig über das diese Eigenschaft vermittelnde Hämolysin und sein exakte molekulare Wirkungsweise bekannt. Erstmals wurde das Hämolysin von *S. agalactiae* 1934 von Todd beschrieben (Todd, 1934). Weitere Untersuchungen in den 80er Jahren konnten aufzeigen, dass es sich bei dem  $\beta$ -Hämolysin um ein oberflächenassoziiertes Molekül zu handeln scheint (Platt, 1995), welches nur mit Hilfe von hochmolekularen Carriermolekülen wie Stärke oder Albumin extrahiert werden kann (Marchlewicz u. Duncan, 1980). Zudem konnte das  $\beta$ -Hämolysin in solchen Ansätze durch die Zugabe von Proteinasen desaktiviert werden, was die Vermutung nahelegte, dass es sich um ein Protein handle (Marchlewicz u. Duncan, 1981). Auch die Zugabe von Phospholipiden, dem Hauptbestandteil des menschlichen Surfactant, konnte die hämolytische Aktivität in diesen Versuchsreihen inhibieren.

Versuche das  $\beta$ -Hämolysin in seiner Reinform zu isolieren haben sich bis heute als ausgesprochen schwierig erwiesen, da es sich um ein sehr labiles Molekül handelt und Bakterienkulturen schnell ihre hämolytische Fähigkeit verlieren. Auch Versuche das Hämolysin mittels Antikörper oder Gelelektrophorese weiter zu charakterisieren, sind bis heute erfolglos geblieben (Dal u. Monteil, 1983).

Das Hämolysin von *S. agalactiae* zeigt ausgesprochen zytotoxische Effekte auf ein großes Spektrum von Wirtszellen. Dies konnte neben Erythrozyten so direkt für humane Lungenepithelzellen, Gehirndothelien, Trophoblasten der Plazenta sowie Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Hensler et al., 2008; Kaplan et al., 2008; Doran et al., 2003; Nizet et al., 1996). Das  $\beta$ -Hämolysin ist daher mit einem Zytolysin gleichzusetzen. Korrelierend zeigte sich in Tierversuchen eine erhöhte Mortalität bei

Infektion mit hyperhämolysierenden Mutanten von *S. agalactiae* (Ring et al. 2002; Puliti et al., 2000).

Auch für Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Neutrophile) konnte ein direkt toxischer Effekt von  $\beta$ -Hämolyin durch Induktion von Apoptose und Zytolyse gezeigt werden (Liu et al, 2004). In der gleichen Arbeit wurde nachgewiesen, dass das rötliche Pigment von *S. agalactiae* als Oxidanzschutz fungiert und so ein längeres Überleben in den Phagolysosomen der Makrophagen ermöglicht. Zudem aktiviert das Hämolyin von *S. agalactiae* Entzündungskaskaden durch Stimulation der Interleukin-8-Freisetzung mit folgender chemotaktischer Rekrutierung von Neutrophilen. Dies konnte sowohl für Lungenepithelien als auch Gehirnendothelien nachgewiesen werden (Doran et al., 2003 und 2002).

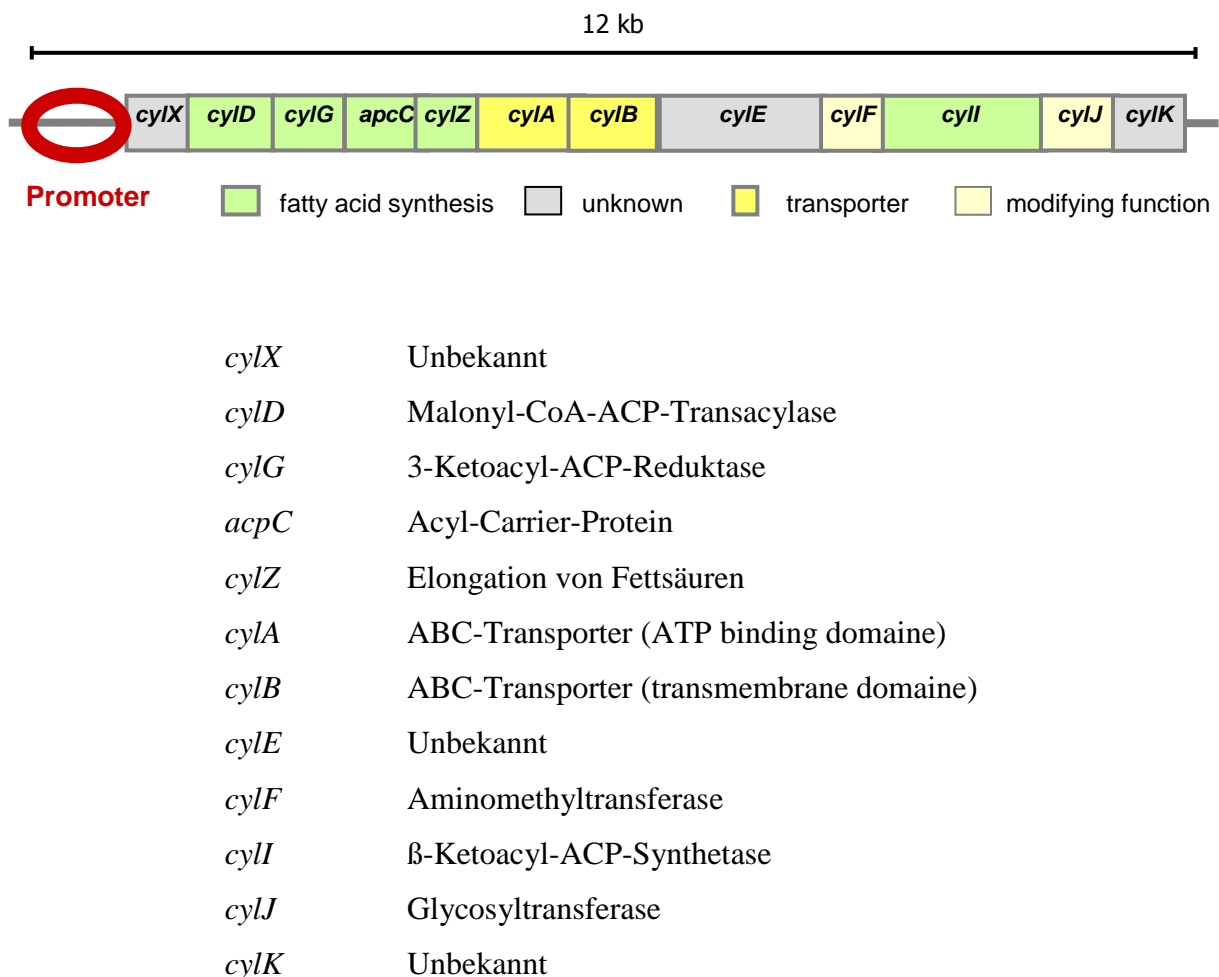
1999 konnten Spellerberg et al. erstmals die Gene, welche für die Hämolysinexpression in *S. agalactiae* verantwortlich sind, identifizieren (Spellerberg et al., 1999). Es handelt sich hierbei um ein Gencluster mit insgesamt 12 offenen Leserahmen, welche als *cyl*-Gene bezeichnet wurden. Insgesamt hat die beschriebene Region eine Länge von ca. 12 kb. Bakterienstämme mit Mutationen in diesem Bereich fielen durch den Verlust ihrer hämolytischen Aktivität und Pigmentierung auf. In weiteren Arbeiten konnten die verschiedenen *cyl*-Gene genauer charakterisiert werden:

So zeigen die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *cylD*, *cylG*, *apcC*, *cylZ* und *cylI* Homologien zu bekannten Enzymen der prokaryontischen Fettsäuresynthese. *CylD*, *cylG* und *cylZ* scheinen dabei eine Rolle bei der Elongation von Fettsäureketten zu spielen; *apcC* codiert höchstwahrscheinlich für ein Acyl-Carrier-Protein (Spellerberg et al., 1999). Für das Hämolyin von *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass die Acetylierung für die Hämolysinproduktion essentiell ist (Stanley et al., 1998).

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *cylA* und *cylB* zeigen signifikante Ähnlichkeit mit einem typischen Multidrug-Resistance-Transporter vom ABC (ATP binding cassette)-Typ. Es wird angenommen, dass dieser für den Export von Hämolyin aus der Zelle nötig ist (Gottschalk et al., 2006). *CylF* und *cylJ* schließlich codieren für Enzyme, denen eine modifizierende Funktion in der Hämolysinproduktion zugeschrieben wird (Forquin et al., 2007; Spellerberg et al., 2000).

Die genauen Funktionen von *cylX*, *cylE* und *cylK* sind bis dato unbekannt. *CylE*, welches für ein 78 kDa Protein codiert, wurde in einer Arbeit als strukturelles Gen für das Hämolyin von *S. agalactiae* vorgeschlagen (Pritzlaff et al., 2001). Diese Annahme ist aber

stark umstritten. Zum einen sprechen die fehlgeschlagenen Versuche, Antikörper gegen das Hämolysin zu konstruieren, gegen ein solch großes Protein. Zum anderen fehlen Homologien des abgeleiteten Proteins zu anderen bekannten Hämolysinmolekülen. Die vorliegenden Daten lassen jedoch auf eine Beteiligung von *cylE* an der Hämolysinproduktion schließen (Gottschalk et al., 2006).



**Abbildung 1:** Anordnung der *cyl*-Gene mit deren vermuteten Funktion.

(ABC: ATP binding cassette, ACP: Acyl-Carrier-Protein, ATP: Adenosintriphosphat, kb: Kilo-Basenpaare)

Bereits seit den 80er Jahren war eine enge genetische Verknüpfung zwischen hämolytischer Aktivität und Pigmentierung von *S. agalactiae* postuliert worden, da beide Merkmale stark miteinander korrelieren (Tapsall, 1986). Die Untersuchungen von Spellerberg et al., in denen eine Mutation innerhalb der *cyl*-Gene immer zu einem Verlust beider Merkmale führte, legten die Annahme nahe, dass die *cyl*-Gene gemeinsam für

Hämolysin und Pigment codieren. Umgekehrt war es nicht möglich einen Stamm zu isolieren, der nur eines der beiden Merkmale exprimiert (Spellerberg et al., 2000). Eine Erklärung hierfür liefert die Hypothese, dass es sich bei Hämolysin und Pigment um dasselbe Molekül, ein pigmentiertes Hämolysin, handelt. Dies ist z.B. für das Hämolysin von *Legionella pneumophila* vorbeschrieben (Wintermeyer et al., 1991).

Die *cyl*-Gene werden upstream von einer 631 bp langen Region flankiert, in der die dem *cyl*-Gencluster zugehörige Promoterregion vermutet wird. Grundlage für diese Vermutung bildeten Beobachtungen, dass *S. agalactiae*-Stämme mit Mutationen in diesem Bereich stark hämolysierende Phänotypen aufweisen. Außerdem beinhaltet diese Region Variationen von TATA-Box-Motiven, die im Allgemeinen bei der Transkription als Erkennungsstelle für die RNA-Polymerase fungieren (Pribnow, 1975; Schaller et al., 1975).

Die Regulation der Expression vieler Virulenzgene unterliegt in Prokaryonten sogenannten Zweikomponentensystemen (Two-Component System, TCS). Diese bestehen aus einer membranständigen Histidinkinase, die ein zugehöriges Regulatorprotein in der Regel an einem Aspartatrest phosphorylieren kann. Dies geschieht in Abhängigkeit von Umgebungsbedingungen wie z.B. Temperatur oder pH (Beier u. Gross, 2006). Durch die Phosphorylierung wird in der Regel die Bindungsaffinität des Regulatorproteins an spezifischen DNA-Bindungsstellen verändert. Dies aktiviert oder hemmt die Transkription von Genen (Unden, 2007).

Die Sequenzierung des Genoms von *S. agalactiae* enthüllte das Vorliegen von 17-20 TCS (Tettlin et al., 2005 und 2002; Glaser et al., 2002). Eines davon ist der CovS/CovR-Regulator, wobei CovS die Histidinkinase und CovR das an die DNA bindende Regulatorprotein repräsentiert. Dieses TCS ist aus *Streptococcus pyogenes* bekannt. Hier inhibiert es Gene, die für multiple Virulenzfaktoren wie die Hyaluronsäurekapsel, Streptolysin S und Streptokinase codieren (Federle et al., 1999; Heath et al., 1999). Insgesamt werden 15 % der chromosomalen Gene von *S. pyogenes* direkt oder indirekt von CovR inhibiert (Graham et al., 2002).

Lamy et al. und Jiang et al. konnten 2004 bzw. 2005 das CovS/CovR-Regulatorsystem auch in *S. agalactiae* nachweisen. Die Tatsache, dass *covSR*-Deletionsmutanten einen hyperhämolytischen Phänotyp aufwiesen, führte zu der Annahme, dass CovS/CovR in *S.*



*agalactiae* die Expression der *cyl*-Gene inhibiert. Auch für andere Virulenzfaktoren wie den CAMP-Faktor oder die Adhärenz an menschlichen Epithelzellen konnte in *S. agalactiae* eine Regulation durch CovS/CovR nachgewiesen werden (Lamy et al., 2004; Jiang et al., 2005). Die große Bedeutung dieses Zweikomponentensystems für die Virulenz von *S. agalactiae* bestätigte sich auch im Tierversuch mit neugeborenen Ratten: covSR-Deletionsmutanten präsentierten hier eine verminderte Virulenz mit einem Anstieg der LD<sub>50</sub> über 3 log im Vergleich zum Wildtyp (Lamy et al., 2004). Lamy et al. konnten in ihrer Arbeit zudem nachweisen, dass CovR direkt an die unmittelbar upstream der *cyl*-Gene gelegene Region bindet.

Diese Region war auch Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit. Rekombinante *S. agalactiae*-Klone, die diese mutmaßliche Promoterregion in multiplen Kopien auf Plasmiden enthielten, fielen durch einen hyperhämolytischen Phänotyp auf. Unsere Hypothese war, dass durch die multiplen Kopien der Promoterregion Repressormoleküle abgefangen werden und so weniger an die chromosomale DNA der Klone binden können. Dies gestattet eine vermehrte Transkription der *cyl*-Gene und hat so einen hyperhämolytischen Phänotyp der entsprechenden Klone zur Folge.

Ziel dieser Arbeit war es, die aktiven Regionen innerhalb der Promoterregion der *cyl*-Gene zu definieren und regulatorische Mechanismen der Hämolysinexpression in *S. agalactiae* weiter zu charakterisieren.

## 2 Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Geräte und Materialien sind, soweit nicht speziell im Text erwähnt, dem Anhang zu entnehmen.

### 2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Verwendete Bakterienstämme

ATCC: American Type Culture Collection (Sammlung von Bakterienstämmen)

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	apathogenes Derivat des Wildtypstamms K-12	Woodcock et al., 1989
<i>S. agalactiae</i> 090R	kapsellose Mutante eines Serotyp Ia-Stammes	ATCC 12386

#### 2.1.2 Plasmide

Das in dieser Arbeit eingesetzte Plasmid pAT28 ist in Tabelle 2 beschrieben.

**Tabelle 2:** Verwendetes Plasmid

kB: Kilo-Basenpaare; *oriR*: origin of replication; *oriT*: origin of transfer; *lacZ*: Gen, welches für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase codiert; *spc*: Gen, welches für Spectinomycinresistenz codiert

Name	Größe	Eigenschaften	Referenz
pAT28	6,7 kB	<i>oriR</i> pUC, <i>oriR</i> pAM $\beta$ 1, <i>oriT</i> RK2, <i>lacZ</i> , <i>spc</i>	Trieu-Cuot et al., 1990

### 2.1.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron GmbH, Ulm bezogen. Sie wurden mit 10 mM TRIS (pH 7,6) auf eine Konzentration von 195 mg/ml eingestellt und bei – 4 °C gelagert. Oligonukleotide, die nicht als PCR-Primer sondern direkt in die Ligation eingesetzt wurden, wurden auf eine Endkonzentration von 100 pmol/µl gemäß den Herstellerangaben eingestellt.

Die Oligonukleotide wurden zur Herstellung von Vektorkonstrukten verwendet, die Teilsequenzen der mutmaßlichen Promotorregion enthalten. Im Folgenden sind alle Oligonukleotide mit Bezeichnung der generierten rekombinanten DH5α-Stämme (in der Regel 2 Isolate) aufgeführt. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind dabei umrandet und das entsprechende Restriktionsenzym am Ende der Zeile aufgeführt.

Oligonukleotide, die als PCR-Primer verwendet wurden:

#### Stämme 163+164

cyl P4: 5'-GGCGGC	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">GAGCTC</span>	GGTGAAGAGGGACTATTAGTG-3'	<i>Sac I</i>
cyl P5: 5'-GGCGGC	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">GGATCC</span>	AAATCATGAGTAAAACACTGC-3'	<i>Bam HI</i>

#### Stämme 174+175

cyl P6: 5'-GGCGCC	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">GAGCTC</span>	GCAGATGTCATTTATGAAAGT-3'	<i>Sac I</i>
cyl P5: siehe oben			

#### Stämme 176+177

cyl P4: 5'-GGCGGC	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">GAGCTC</span>	GGTGAAGAGGGACTATTAGTG-3'	<i>Sac I</i>
cyl P7: 5'-GGCGGC	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">GGATCC</span>	CACTTTCATAAATGACATCTGC	<i>Bam HI</i>

#### Stämme 209+210

cyl P6: 5'-GGCGGC	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">GAGCTC</span>	GCAGATGTCATTTATGAAAGTG-3'	<i>Sac I</i>
cyl P10: 5'-GGCGGC	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">GGATCC</span>	TAATTATAAATTCACACTCT-3'	<i>Bam HI</i>

**Stämme 211+212**

cyl P11: 5'-GGCGGC GAGCTC AATGATATTTTAATTAGAGTGTG-3' *Sac I*

cyl P5: siehe oben

**Stamm 213**

cyl P3: 5'-GGCGGC GAGCTC GAGTGTTTAGAAGTTTTAGGC-3' *Sac I*

cyl P2: 5'-GGCGGC CTCGAG CCTTCAACTAATCATCTTCGCTC-3' *Xho I*

**Stämme 375+376**

cyl P6: siehe oben

cyl P9/2:

5'-GGCGGC GGATCC AATAGTAACAAAGTATTCATCTTTGTCAA-3' *Bam HI*

**Stämme 377+378**

cyl P8/2:

5'-GGCGGC GAGCTC TTGACAAAGATGAAATACTTTGTTACTATT-3' *Sac I*

cyl P10: siehe oben

**Stamm 408**

cyl P2: siehe oben

cyl P16: 5'-GGCGGC GGATCC TCATTATTATGTAAAATAGT *Bam HI*

cyl P17: 5'-GGCGGC GGATCC TAGAGTGTGAATTTATAATTA *Bam HI*

cyl P3: siehe oben

Einige Oligonukleotide wurden direkt in die Ligation eingesetzt. Sie sind komplementär, so dass ein doppelsträngiges DNA-Fragment mit überhängenden Enden entsteht. Sie sind nachfolgend ebenfalls mit Bezeichnung der entstandenen DH5 $\alpha$ -Stämme aufgelistet. Die komplementären Sequenzen sind dabei farbig unterlegt.

**Stämme 189+190**

cyl P8: 5'-C TTGACAAAGATGAAATACTTTGTTACTATT G-3'

cyl P9: 5'-GATCC AATAGTAACAAAGTATTCATCTTTGTCA AAGAGCT-3'

**Stämme 365+366**

cyl P11/2:

5'-CAATGATATTTTAATTAGAGTGTGAATTTATAATTAG-3'

cyl P10/2:

5'-GATCCTAATTATAAATTCACACTCTAATTAATAATATCATTGAGCT-3'

Zur Herstellung der folgenden rekombinanten DH5 $\alpha$ -Klone fanden Oligonukleotide sowohl im direkten Einsatz als Insert als auch als PCR-Primer Verwendung:

**Stämme 421+422**

cylP13:

5'-GATCCTTAACATAATAATGATATTTTAATTAGAGTGTGAATTTATAATTAT-3'

cyl P15:

5'-CTAGATAATTATAAATTCACACTCTAATTAATAATATCATTATTATGTAAAG-3'

zusammen mit PCR-Primern

cyl P11: siehe oben

cyl P2: 5'-GGCGGCCTCGAGCCTTCAACTAATCATCTTCGCTC-3' *Bam HI***Stamm 423**

cyl P13: siehe oben

cyl P15: siehe oben

zusammen mit PCR-Primern

cyl P4: siehe oben

cyl P7: siehe oben

Folgende Oligonukleotide wurden zudem für eine Kontroll-PCR zur Überprüfung der rekombinanten DH5 $\alpha$ -Klone sowie für die Sequenzierung der Vektorkonstrukte verwendet:

pat 28-3: 5'-GTTGTGTGGAATTGTGAGCGG-3'

pat 28-2: 5'-CTCTTCGCTATTACGCCAGCT-3'

## **2.2 Chemikalien, Kits und Enzyme**

### **2.2.1. Kits**

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Kits wurden zur Isolierung von Plasmid-DNA, zur Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen sowie für Sequenzierungen verwendet.

QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt

### **2.2.2 Enzyme**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie die entsprechenden Puffer wurden von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim bezogen.

Weitere verwendete Enzyme sind nachfolgend aufgelistet:

Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Mutanolysin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteinkinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNAse	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNAse	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4-Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

## **2.3 Stammhaltung, Kultivierungsbedingungen und Nährmedien**

### **2.3.1 Kultivierung von *E. coli***

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  wurde ausschließlich in LB (Luria-Bertani)- Komplexmedium kultiviert. Dieses Medium wird wie folgt hergestellt:

**LB-Medium**

Trypton	15 g/l
NaCl	5 g/l
Hefeextrakt	5 g/l

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Komplexmedium vor dem Autoklavieren 15 g Bacto-Agar pro Liter hinzugefügt. Sämtliche Medien wurden bei 120 °C für 20 min autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurde dem Medium zur Selektion rekombinanter Stämme zudem sterilfiltrierte Spectinomycin-Stocklösung zugegeben. Die Endkonzentration an Spectinomycin im Agar betrug 833 µg/ml.

Ein abgewandeltes LB-Medium diente zudem als Indikatormedium für DH5α-Klone direkt nach Transformation des pAT28-Plasmids. Hierbei werden dem Komplexmedium neben Spectinomycin folgende Lösungen zugesetzt:

0,1 M IPTG	1 ml/l
X-GAL (2 % in DMF)	2 ml/l

Diese beiden Reagenzien sind Substrat für eine Indikatorreaktion. Trägt der Zellklon ein Plasmid mit Insert, erfolgt eine Inaktivierung des Gens, welches für das Enzym der Indikatorreaktion codiert. Die entsprechenden Kolonien erscheinen auf den Agarplatten dann weiß. Im Gegensatz dazu zeigen die Klone, die ein Plasmid ohne Insert beherbergen, einen blauen Phänotyp, was eine leichte erste Unterscheidung ermöglicht.

Die Anzucht von *E.coli* auf Agarplatten erfolgte stets bei 37 °C im Brutschrank unter aeroben Bedingungen. Zur Kultivierung in Flüssigmedium wurde DH5α bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler mit 1500 rpm inkubiert. Dabei wurden die Zellen für eine 5 ml Übernachtskultur in einem 15 ml Falconröhrchen, größere 50 ml Kulturen zur Herstellung kompetenter Zellen in einer 100 ml Schottflasche angezüchtet.

*E.coli* wurde auf den Agarplatten bis zu 4 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Stämme in Glycerinkulturen aufgenommen und bei -70 °C eingefroren.

### 2.3.2 Kultivierung von *S. agalactiae*

Der in dieser Arbeit verwendete *S. agalactiae*-Stamm O90R wurde in THY (Todd Hewitt Broth Fertigmischung von Oxoid mit zugesetztem Hefeextrakt) angezüchtet. Dieses Komplexmedium setzt sich folgendermaßen zusammen:

#### **THY-Medium**

Todd Hewitt Broth	36,4 g/l
Hefeextrakt	5 g/l

Wie beim LB-Medium wurden zur Herstellung von Agarplatten vor dem Autoklavieren 15 g Bacto-Agar pro Liter zugegeben. Zur Selektion rekombinanter O90R-Klone wurde zudem sterilfiltrierte Spectinomycin-Stocklösung hinzugefügt mit einer resultierenden Endkonzentration im Agar von 1 ml/l.

Auf THY-Agarplatten wurden transformierte O90R-Klone sowohl unter aeroben Bedingungen im 37 °C Brutschrank als auch unter anaeroben Bedingungen im 39 °C Brutschrank angezüchtet. Die Kultivierung von O90R in THY-Flüssigmedium erfolgte stehend im 37 °C Brutschrank.

Zur Beurteilung der Hämolyse wurden die Klone zudem auf Columbiakomplexmedium (Fertigmischung von Oxoid) mit zugesetztem Schafsblut angezüchtet. Dieses Festmedium setzt sich wie folgt zusammen:

#### **Blut-Agar**

Columbia	39 g/l
Bacto-Agar	15 g/l
Schafsblut	50 ml/l

Das Blut wurde dabei erst nach dem Autoklavieren und Abkühlung auf ca. 25 °C zugesetzt. Die Platten wurden dann mit einer 25 ml Stabpipette standardisiert auf 20 ml Medium pro Petrischale gegossen. Auch hier wurde zuvor sterilfiltrierte Spectinomycin-Stocklösung hinzugefügt. Die Endkonzentration im Agar betrug ebenfalls 1 ml/l. Auf Blutagarplatten wurde O90R im 37 °C Brutschrank unter aeroben Bedingungen angezüchtet.



*S. agalactiae* wurde insgesamt bis zu 3 Wochen auf THY-Agarplatten und 1 Woche auf Blutagarplatten aufbewahrt. Zur längerfristigen Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Zur quantitativen Untersuchung der hämolytischen Aktivität im Hämolysinassay wurde O90R außerdem in einem modifizierten THB-Medium angezüchtet. Dieses Flüssigmedium setzt sich wie folgt zusammen:

### **MTHB-Medium**

Todd Hewitt Broth	36,4 g/l
Proteosepepton No. 3	10 g/l

Zudem wurde dem Medium lösliche Stärke zugesetzt. Die verwendeten Konzentrationen betragen dabei 0,5 %, 1 % und 2 % (w/v). Auch fetales Kälberserum (FCS) fand als Zusatz zum MTHB-Medium Verwendung, wobei die Konzentrationen zwischen 1-5 % variierten. Sowohl Stärke als auch FCS dienten dabei als Verstärker der hämolytischen Aktivität und erleichterten so deren Beurteilung.

Das MTHB-Medium wurde ebenfalls bei  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  autoklaviert. O90R wurde in MTHB im  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  Brutschrank mit 5 %  $\text{CO}_2$ -Anteil stehend kultiviert.

## **2.4 Isolierung von DNA**

### **2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse wurde erstmals von Birnboim beschrieben (Birnboim, 1979). In dieser Arbeit wurde die Methode in abgewandelter Form vor allem zur Überprüfung rekombinanter *E. coli*-Klone nach Transformation verwendet. Folgende Lösungen werden hierfür benötigt:

<b>TENS</b>		<b>Birnboim-Acetat</b>	
TRIS (pH 7,6)	10 mM	Kaliumacetat	29,4 g
EDTA (pH 8,0)	1 mM	Ameisensäure	5 ml
NaOH	0,1 M	ad 100 ml A. bidest	
SDS	0,5 % (w/v)		

**TRIS/RNase-Lösung**

TRIS (10 mM) 1 ml

RNase (10 mg/ml) 10 µl

Zunächst wurde eine Impföse Keimmaterial von einer frisch bewachsenen LB-Agarplatte in 500 µl NaCl in Lösung gebracht. Nach Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min und Abkippen des Überstandes konnte das Pellet durch Inkubation auf einem Rüttler für 3-4 min in der restlichen NaCl-Lösung gelöst werden. Anschließend wurde das Pellet in 300µl TENS gelöst und auf dem Vortexer durchmischt. Dabei bedingt SDS die Lyse der Bakterienzelle und NaOH die alkalische Denaturierung der DNA und der Proteine. Im nächsten Schritt wurde dem Ansatz 150 µl Birnboim-Acetat zugesetzt, wodurch sich der pH wieder in den neutralen Bereich verschiebt. Dabei findet eine Renaturierung der DNA und der Proteine statt, bei der allerdings nur die niedermolekularen Plasmide in ihren ursprünglichen, organisierten Konformitätszustand zurückfinden und wieder in Lösung gehen. Der gesamte Ansatz wurde auf dem Vortexer kurz durchmischt und bei 13.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand, welcher die renaturierte Plasmid-DNA enthält, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Zum Ausfällen der Plasmid-DNA wurde das Reaktionsgefäß anschließend komplett mit 70 %-igem EtOH (-20 °C) aufgefüllt und bei maximaler Umdrehungszahl für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Folgenden abpipettiert und das Pellet im Heizblock bei 37 °C getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 30 µl TRIS/RNase-Lösung resuspendiert. Die RNase dient dabei der Inaktivierung kleiner RNA-Moleküle.

**2.4.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus Streptokokken**

Die Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. agalactiae* erfolgte nach einer modifizierten Methode von Vriesema et al. (Vriesema et al., 1996). Folgende Pufferlösungen wurden hierfür verwendet:

**TE (pH 7,6)**

TRIS 100 mM

EDTA 10 mM

**TES (pH 8,15)**

TRIS 50 mM

EDTA 5 mM

NaCl 100 mM

Zunächst wurde eine 5 ml ÜN-Kultur von *S. agalactiae* in THY-Medium bei 3000 rpm und Raumtemperatur 10 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml TE resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min wurde das Pellet nach Entfernen des Überstands in 300 µl TES gelöst. Zum Verdau der bakteriellen Zellwand wurden 100 µl Lysozym (2 mg/ml) und 10 ml Mutanolysin (5000 U/ml) zugesetzt und der gesamte Ansatz für 2 Stunden im 37 °C Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurden 22 µl 10 % SDS und 15 µl Proteinkinase K beigefügt und der Ansatz unter gelegentlichem Schwenken für 2-3 Stunden im 39 °C Wasserbad inkubiert. Dabei bedingt SDS die Lyse der Zelle und Proteinkinase K den Abbau von Proteinen. Im Anschluß wurde dem Ansatz 100 µl gesättigte NaCl-Lösung zugegeben, wodurch nach kurzem Schütteln Proteine und Zellwandbestandteile ausfallen und sich ein feiner weißlicher Niederschlag bildet. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm unter Raumtemperatur wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Zum Entfernen restliche Proteine wurde eine Phenol/Chloroformextraktion angewendet. Die DNA wurde daraufhin durch Zugabe von eiskaltem (-20 °C) absolutem Ethanol ausgefällt und nach Abzentrifugation bei 13.000 rpm und Abpipettieren des Überstands luftgetrocknet. Anschließend wurde sie in 100 µl 10mM TRIS gelöst und bei -4 °C aufbewahrt.

### **2.5 Phenolextraktion und Ethanol-fällung**

Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion handelt es sich um eine Methode zur Abtrennung von Proteinen und somit Aufreinigung und Konzentrierung von DNA aus einem Nukleinsäure-Proteingemisch.

DNA-haltige Lösungen wurden hierfür mit 1 Vol. Phenol/Chloroform versetzt und für ca. 2 min geschüttelt. Die Behandlung mit Phenol bewirkt dabei eine Denaturierung bzw. Inaktivierung der Proteine. Zur Phasentrennung wurde das Reaktionsgemisch für 4 min bei Raumtemperatur und maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Die Proteine befinden sich anschließend als weißer Niederschlag zwischen der oberen wässrigen und unteren organischen Phase. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde im Folgenden vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und die Phenol-Chloroform-Extraktion je nach Verunreinigung der Lösung mit Proteinen mehrmals wiederholt.

Zur Entfernung möglicher Phenolreste wurde dem Ansatz schließlich 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol beigefügt, wobei das Gemisch erneut für 2 min geschüttelt und zur Ausbildung der beiden Phase zentrifugiert wird. Auch hier wird die DNA-haltige,

wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, und der Vorgang gegebenenfalls nochmals wiederholt.

Um die DNA aus der wässrigen Lösung anzukonzentrieren, wurde eine alkoholische Fällung durchgeführt. Hierzu wurde der proteinfreien Lösung 2,5 Vol. absolutes Ethanol (-20 °C) zugefügt und der Ansatz gut durchmischt. Nach anschließender Sedimentierung der DNA durch Zentrifugation wurde das Pellet im Heizblock (37 °C) getrocknet und in 10 mM TRIS (pH 7,6) oder A. bidest resuspendiert. Die DNA-Ausbeute wurde abschließend photometrisch bestimmt.

## **2.6 Amplifikation, Modifikation und Analyse von DNA**

### **2.6.1 Polymerasekettenreaktion**

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur Vermehrung von in Sequenz und Länge definierter Genomabschnitte, die erstmals von Saiki et al. beschrieben wurde (Saiki et al., 1988). Hierzu werden Oligonukleotide (Primer) synthetisiert, die komplementär zu den flankierenden Abschnitten der zu amplifizierenden DNA sind.

Im ersten Schritt wird die DNA denaturiert. In zweiten Schritt lagern sich die Primer entsprechend ihrer Sequenzhomologie bei definierter Annealingtemperatur jeweils einem Einzelstrang an, so dass kurze doppelsträngige Stücke entstehen. An diese wiederum kann sich die DNA-Polymerase anlagern und mit Hilfe der in dem Ansatz enthaltenen Nucleosidtriphosphate die Primer in 3'-Richtung verlängern. Anschließend wird erneut denaturiert und der Zyklus wiederholt. Bei einer Anzahl von n Zyklen können so im Idealfall  $2^n$  Kopien der von den Primern eingerahmten Sequenzen hergestellt werden.

Der PCR-Reaktionsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

10x Reaktionspuffer	5 µl
DNA/Matrize	2 µl Plasmid- bzw. 1 µl chromosomale DNA
dNTP Mix (jeweils 2 mM)	8 µl
Primer A fwd (195 µg/ml)	5 µl
Primer B rev (195 µg/ml)	5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl
ad 50 µl A. bidest	

Die Ansätze wurden stets auf Eis pipettiert und direkt vor Ablauf des PCR-Programms nochmals kurz abzentrifugiert.

Das Standard-PCR-Programm ist nachfolgend aufgeführt:

Vorabdenaturierung	94 °C	2 min
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	50-68 °C	30 s
Extension	72 °C	60 s/1000 bp
Endextension	72 °C	4 min

Nach Ablauf des Programms wurde je 5 µl PCR-Ansatz auf einem 1 bis 2 %-igem Agarosegel kontrolliert.

### 2.6.2 Agarosegelelektrophorese

Mithilfe von Agarosegelen lässt sich durch Anlegen eines elektrischen Feldes DNA nach ihrer Größe auftrennen. Aufgrund der Phosphatgruppen sind DNA-Moleküle bei den verwendeten pH-Werten negativ geladen und wandern daher zur Anode. Eine elektrisch neutral geladene Gelmatrix (Agarose) fungiert dabei als Sieb, so dass kleinere DNA-Fragmente schneller wandern als große.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gelelektrophorese zur Größenbestimmung und Mengenabschätzung von DNA-Fragmenten und Plasmiden, sowie zur Überprüfung von Restriktionsansätzen und PCR-Produkten verwendet. Dabei wurden 1 %-ige Gele zur Auftrennung von Fragmenten > 600 bp und 2 %-ige Agarosegele zur Auftrennung von Fragmenten < 600 bp verwendet.

Folgende Lösungen wurden hierbei benötigt:

#### 50x TAE-Puffer

TRIS/HCl (pH 8,0)	2 M
EDTA	50 mM
Natriumacetat	500 mM

#### 5x Ladepuffer

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

Die in 1x TAE-Puffer eingewogene Agarose wurde in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 60 °C in die Gelgießvorrichtung gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in die entsprechende Gelkammer gelegt und mit 1x TAE-Puffer, welcher ebenfalls als Laufpuffer dient, überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Vol. Ladebuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Der Gellauf erfolgte bei 70-90 V, wobei eine 1 kb-DNA-Leiter als Größenstandard mit aufgetrennt wurde.

Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Gel für 5-20 min im Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend kurz gewässert. Die DNA-Banden wurden dann mittels UV-Licht ( $\mu = 312 \text{ nm}$ ), durch welche das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid fluoresziert, sichtbar gemacht und mit einer Photodokumentationsanlage fotografiert.

### **2.6.3 Restriktion von DNA**

Die Spaltung von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt, die DNA an einer spezifischen Stelle innerhalb ihrer Erkennungssequenz spalten. Für die Reaktion wurde den Enzymen ein vom Hersteller empfohlener Puffer zugegeben, um eine optimale Aktivität zu erhalten. Bei Restriktionsansätzen mit zwei Puffern war darauf zu achten, dass beide Enzyme zu mindestens 75 % in einem gemeinsamen Puffer aktiv sind. War dies nicht möglich wurde zuerst mit einem Enzym verdaut, der gesamte Ansatz mit Ethanol gefällt, und die einfach geschnittene DNA danach mit dem zweiten Enzym inkubiert. Für die Reihenfolge waren hierbei die Puffer ausschlaggebend, wobei zuerst mit dem Puffer mit geringerer Salzkonzentration verdaut wurde.

#### Präparativer Verdau

Für Ligationszwecke wurden zur Linearisierung des benötigten Vektors sowie zum Schneiden des zu klonierenden PCR-Fragments präparative Restriktionen durchgeführt. Es wurden hierfür ca. 8-10  $\mu\text{g}$  DNA in einem Gesamtansatzvolumen von 60  $\mu\text{l}$  mit 1/10 Vol. 10x Puffer und 1,5  $\mu\text{l}$  Enzym inkubiert. Nach Inkubation über Nacht im 37 °C Heizblock wurde erneut 1  $\mu\text{l}$  Enzym zugegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde inkubiert.

#### Analytischer Verdau

Für analytische Restriktionen, die vor allem der Kontrolle rekombinanter Plasmide dienen, wurden geringere Mengen DNA verdaut. So wurde ca. 1  $\mu\text{g}$  DNA in einem Gesamtansatzvolumen von 10  $\mu\text{l}$  geschnitten. Neben 1/10 Vol. an Restriktionspuffer

wurde maximal 1  $\mu\text{l}$  an Enzymen zugegeben. Ein analytischer Restriktionansatz wurde bei 37 °C im Heizblock für mindestens 1 h inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert.

#### **2.6.4 Ligation**

Alle Ligationen wurden mit der T4-Ligase durchgeführt. Diese Enzym verknüpft in Anwesenheit von ATP doppelsträngige DNA-Moleküle durch Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3'-OH- und 5'-Phosphat-Gruppen.

Für die Ligation eines geschnittenen Plasmids mit dem gewünschten Insert wurden Plasmid- und Insert-DNA in einem Mengenverhältnis von ungefähr 1:3 eingesetzt. Bei einem Gesamtansatzvolumen von ca. 20  $\mu\text{l}$  wurde der DNA 2  $\mu\text{l}$  10x Ligationspuffer und 1  $\mu\text{l}$  T4-Ligase beigelegt.

In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem spezifischen Ligationen durchgeführt, bei denen Oligonukleotide ohne vorherige PCR direkt in die Ligation eingesetzt wurden. Hierbei lagern sich zwei komplementäre Oligonukleotide zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment zusammen. Die Sequenzen der Oligonukleotide waren dabei so gewählt worden, dass das Insert nach Zusammenlagerung überhängende Enden aufwies, die denen nach Verdau mit einem Restriktionsenzym glichen. In diesem Fall wurde in die Ligation 300 ng geschnittener Vektor und jeweils 0,2 pmol der entsprechenden Oligonukleotide eingesetzt. Das Gesamtansatzvolumen betrug auch hier 20  $\mu\text{l}$  mit 2  $\mu\text{l}$  10x Ligationspuffer und 1  $\mu\text{l}$  T4-Ligase.

Die Inkubation erfolgte in beiden Fällen über Nacht im 16 °C Heizblock.

#### **2.6.5 Sequenzierung von DNA**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sequenzierungsmethode wurde von Sanger et al. entwickelt und basiert auf einem Kettenabbruchprinzip (Sanger et al., 1977). Hierbei werden der DNA-Polymerase in dem Sequenzierungsansatz neben dNTPs auch ddNTPs (Didesoxynukleotide) für die Synthese eines Komplementärstranges angeboten. ddNTPs besitzen am 3'-Ende keine OH-Gruppe, wodurch sie nach Einbau in die wachsende Kette zu einem Abbruch der Synthese führen. Durch unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der jeweiligen ddNTPs kann man nach Auftrennung der erhaltenen Fragmente in einem Polyacrylamidgel auf die Sequenz der DNA rückschließen.

In dieser Arbeit wurden Sequenzierungen zur Kontrolle der Plasmide von rekombinanten Klonen verwendet. Zunächst wurde die zu untersuchende Sequenz innerhalb des Plasmids amplifiziert. Dazu wurde eine PCR mit der isolierten Plasmid-DNA und den Primern pAT28-2 und pAT28-3 durchgeführt. Diese beiden Primer flankieren die Multiple Cloning Site des pAT28-Vektors, wodurch genau die inserierende Sequenz vervielfältigt werden kann.

Im Folgenden ist der genaue PCR-Ansatz aufgeführt:

10x Reaktionspuffer	10 µl
Plasmid-DNA	1 µl
dNTPs	5 µl
Primer pAT28-2	5 µl der 1:20 Verdünnung (5 µl der 195 µg/ml Primerlösung ad 100 µl A. bidest)
Primer pAT28-3	5 µl der 1:20 Verdünnung (5 µl der 195 µg/ml Primerlösung ad 100 µl A. bidest)
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
ad 100µl A. bidest	

Die PCR lief in folgendem Programm:

Vorabdenaturierung	96 °C	1 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	96 °C	15 s	
Annealing	50 °C	15 s	
Extension	60 °C	4 min	

Anschließend wurde die PCR in einem 1 %-igen Agarosegel kontrolliert. Vor Einsatz in die Sequenzierungsreaktion wurde das PCR-Produkt mit dem PCR-Purification-Kit von QIAGEN aufgereinigt.

Die Sequenzierungsreaktion wurde mittels des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems angesetzt. In den 20 µl Ansatz wurden dabei 5 µl des gereinigten PCR-Produkts eingesetzt. Als Primer wurde entweder pAT28-2 oder pAT28-3 verwendet.



Der gesamte Ansatz unterlief dann folgendes PCR-Programm:

96 °C	30 sec	} 25 Zyklen
50 °C	15 s	
60 °C	4 min	

Im Anschluss wurde das Sequenzierprodukt aufgereinigt. Dazu wurde dem 20 µl PCR-Ansatz 10 µl 3M Natriumacetat, 250 µl 100 % EtOH und 80 µl Dextranblau-Verdünnung (10 µl in 1,5 ml A.bidest) zugegeben und der gesamte Ansatz auf einem Vortexer ganz kurz gemischt. Danach folgte eine 10-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 25 min bei maximaler Umdrehungszahl abzentrifugiert, und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Dem Pellet wurde daraufhin 500 µl 70 % EtOH beigelegt und der Ansatz ohne Lösen des Pellets kurz gemischt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min mit anschließendem Verwerfen des Überstands. Das Pellet wurde schließlich in 25 µl HiDi Formamid gelöst. Von diesem Ansatz wurden wiederum 5 µl in frischem 20 µl HiDi Formamid gelöst und in ein Sequenzierungseppi pipettiert. Dieser wurde mit einem Gummiseptum abgedichtet und die Sequenzierung nach Standardprotokoll im Sequenzierer durchgeführt.

## **2.7 Transformationstechniken**

### **2.7.1 Transformation von *E. coli***

#### **Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Für die Transformation von Fremd-DNA müssen *E. coli*-Zellen speziell vorbereitet werden, da sie keine natürliche Kompetenz aufweisen. Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine 50 ml LB-Kultur mit 1 ml einer über Nacht angewachsenen DH5α-Kultur angeimpft und für 2 h auf dem Schüttler bei 37 °C und 15.000 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in ein gekühltes Falconröhrchen umgefüllt und bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und erneut bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Im Anschluß wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> gelöst und bis zur Transformation für mind. 30 min weiterhin auf Eis inkubiert.

### Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Für die Hitzeschocktransformation wurden 200 ml kompetenter DH5 $\alpha$ -Zellen und 10  $\mu$ l Fremd-DNA in ein gekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Bei der Fremd-DNA handelte es sich dabei in der Regel um einen frischen Ligationsansatz. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für höchstens 2 min im 42 °C Wasserbad inkubiert, um danach sofort wieder für 3 min auf Eis inkubiert zu werden. Dieser Schritt stellt den Hitzeschock dar, welche eine erhöhte Durchlässigkeit der Zellwand zur Folge hat und so die Aufnahme der Fremd-DNA ermöglicht. Die transformierten Zellen wurden im Anschluss zur Regeneration und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz in 800  $\mu$ l LB-Medium aufgenommen und für 1 h im 37 °C Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 100 und 150  $\mu$ l der Zellsuspension auf LB-ITPG/X-Gal-Indikatorplatten mit Spectinomycin ausplattiert und über Nacht im 37 °C Brutschrank angezüchtet.

### **2.7.2 Transformation von *S. agalactiae***

#### Herstellung elektrokompetenter *S. agalactiae*-Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter *Streptococcus agalactiae*-Zellen erfolgte nach der Methode von Ricci et al. (Ricci et al., 1994). Dabei durchlaufen die Bakterien mehrere Waschschrte, um die Salzkonzentration und die Konzentration an geladenen Molekülen in der Zellhülle zu verringern und so die Aufnahme von Fremd-DNA zu ermöglichen.

100 ml THY-Medium wurden hierfür mit 2 ml einer O90R ÜN-Kultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,2 im 37 °C Brutschrank herangezüchtet. Die Kultur wurde anschließend in zwei gekühlten Falconröhrchen für 10 min auf Eis inkubiert und bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im gleichen Volumen (50 ml) eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Der Ansatz wurde erneut bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde im Folgenden sukzessiv mit ½ Vol., ¼ Vol. und 1/8 Vol. 10 % (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in ein gekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde bei 13.000 rpm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 Vol. (ca. 25  $\mu$ l) 20 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension mit dem resultierenden Volumen von ca. 100  $\mu$ l wurde schließlich in 4 Fraktionen à 25  $\mu$ l aufgeteilt, die bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt wurden.

### Elektrotransformation von *S. agalactiae*

Bei der Transformation durch Elektroporation wird die elektrische Ladung der Bakterienzellwand durch Anlegen einer Spannung so verändert, dass die Zellen kurzzeitig in der Lage sind Fremdmoleküle wie DNA aufzunehmen. Zur Elektroporation von *S. agalactiae* wurden 25 µl kompetente O90R-Zellen mit einem Vol. eiskalten 10 % (v/v) Glycerin versetzt, wobei der gesamte Ansatz stets auf Eis gehalten wurde. Es wurden 3 µl Plasmid-DNA zugegeben und das gesamte Gemisch in eine vorgekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette überführt. Es erfolgte eine Pulsgabe von 100 Ω, 25 µF und 2000 V. Nach der Elektroporation wurden die transformierten Zellen in 1 ml THY-Medium ohne Antibiotikazusatz aufgenommen und zur Regeneration für 1 h auf dem 37 °C Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in verschiedenen Konzentrationen auf THY-Platten mit Spectinomycin ausplattiert und über Nacht im 37 °C Brutschrank angezüchtet.

## **2.8 Untersuchungen zur Hämolyse von *S. agalactiae***

### **2.8.1 Überstempelungen**

Zur qualitativen Beurteilung der hämolytischen Aktivität der rekombinanten O90R-Klone wurden die Kolonien auf Blut-Agarplatten überstempelt. Dazu wurden sowohl die bewachsenen THY-Agarplatten als auch die sterilen Blut-Agarplatten zunächst für mind. 30 min mit leicht geöffnetem Deckel unter der sterilen Arbeitsbank luftgetrocknet. Anschließend wurden die Kolonien der THY-Platte mit Hilfe des Replica Plating Apparatus Stempelsets in analoger Gruppierung auf die Blutplatte übertragen. Die Platten wurden dann über Nacht im 37 °C Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag mit den Originalplatten sowie untereinander verglichen. Die Ergebnisse wurden mittels Digitalkamera dokumentiert, wobei die Agarplatten umgedreht mit geöffnetem Deckel auf einer Lichtbox fotografiert wurden.

### **2.8.2 Hämolysinassay**

Zur quantitativen Beurteilung der hämolytischen Aktivität der rekombinanten O90R-Stämme wurde ein Hämolysinassay nach einer modifizierten Methode von Marchelwicz et al. durchgeführt (Marchelwicz u. Duncan, 1981). Die rekombinanten O90R-Klone sowie der Wildtyp wurden hierzu in MTHB-Flüssigmedium mit verschiedenen

Stärkekonzentrationen angezüchtet. Teilweise wurden zudem noch verschiedenen Mengen an FCS (Foetal Calf Serum) beigefügt. Sowohl die Stärke als auch das FCS dienten dabei als Verstärker der hämolytischen Aktivität, was eine bessere Beurteilung dieser Eigenschaft ermöglichte. Folgenden Lösungen wurden außerdem im Hämolysinassay verwendet:

**Hämolysinextraktpuffer**

PBS (mit $Mg^{2+}$ und $Ca^{2+}$ )	100 ml
1 % Glucose (w/v)	1 g
1 % lösliche Stärke (w/v)	1 g
3 % Tween 80 (v/v)	3 ml

**10x PBS-Puffer**

KCl	2 g
$KH_2PO_4$	2 g
NaCl	80 g
$Na_2HPO_4 \times 7 H_2O$	21,6 g

**Erythrozytenlösung** (frisch angesetzt)

PBS	1 ml
humanes Vollblut	300 $\mu$ l

(mehrmals mit PBS gewaschen)

Zunächst wurden 15 ml MTHB + Stärke (+FCS) mit 300  $\mu$ l einer über Nacht gewachsenen THY-Kultur der rekombinanten Klone bzw. des Wildtyps angeimpft und für 6 h im 37 °C Brutschrank mit 5 %-igem CO<sub>2</sub> Anteil inkubiert. Danach wurden die Kulturen bei 3000 rpm für 10 min abzentrifugiert und die Pellets in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die OD<sub>600</sub> der einzelnen Kulturen bestimmt und die Volumina der Zellsuspensionen daraufhin so angeglichen, dass alle Ansätze ungefähr die gleiche Anzahl an Bakterienzellen aufwiesen. Die Ansätze wurden dann bei 8000 rpm für 1 min abzentrifugiert, bevor die Zellen mit jeweils 600  $\mu$ l Hämolysinextraktpuffer versetzt wurden. Die Funktion dieses Puffers ist die Freisetzung von zellgebundenem Hämolysin aus den Streptokokken. Dazu wurden die Ansätze für 5 min auf dem 37 °C Schüttler inkubiert, die Reaktion im Folgenden durch eine 1-minütige Inkubation auf Eis unterbrochen und die Zellen schließlich durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min sedimentiert. Anschließend wurden jeweils 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l und 40  $\mu$ l des Überstandes, welcher das Hämolysin enthält, ad 500  $\mu$ l PBS pipettiert. Diese Ansätze wurden nun jeweils mit 500  $\mu$ l Erythrozytenlösung für 15 min im 37 °C Heizblock inkubiert. Die Erythrozytenlösung war zuvor aus 1 ml PBS und 300  $\mu$ l humanem Vollblut, welches zum Entfernen beschädigter Erythrozyten mehrmals mit PBS gewaschen wurde, frisch angesetzt worden.

Die hämolytische Reaktion wurde durch schonende 1-minütige Zentrifugation der Zellsuspensionen bei 4000 rpm abgebrochen, und der Überstand zur photometrischen Bestimmung vorsichtig in Küvetten überführt. Die Stärke der entstandenen Verfärbung des Überstands wurde durch Messung der  $OD_{540}$  quantifiziert und war proportional der lysierten Erythrozyten. Es wurden zudem eine Negativ- und Positivkontrolle mitbestimmt. Für die Positivkontrolle wurde 500  $\mu$ l Erythrozytenlösung mit 500  $\mu$ l A. bidest gemischt, was eine komplette Lyse der Erythrozyten zur Folge hat. Die Negativkontrolle setzte sich aus 600  $\mu$ l Hämolysinextraktpuffer und 500  $\mu$ l Erythrozytenlösung zusammen.

### **2.9. Statistik**

Im ersten Teil der hier durchgeführten Experimente erfolgte eine qualitative Beschreibung der Merkmale Hämolyse- und Pigmentierungsverhalten der hergestellten O90R-Mutanten. Es handelt sich hierbei um eine rein deskriptive Bewertung, so dass keine statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte.

Im zweiten Teil erfolgte mittels der Hämolysinassays der Versuch einer quantitativen Auswertung des Hämolyseverhaltens. Drei der hergestellten rekombinanten O90R-Stämme (213, 174 und 175) wurden hierbei gegen den Leervektor und den Wildtyp verglichen. Für jeden der Stämme wurde der endgültige Hämolysinassays insgesamt mindestens 5x durchgeführt und anschließend der arithmetische Mittelwert bestimmt. Leider fanden sich hier keine schlüssigen, reproduzierbaren Ergebnisse, so dass eine weitere statistische Auswertung mittels Streuungsmaßen oder Signifikanztests nicht sinnvoll war.

## 3 Ergebnisse

Die Fähigkeit zur Hämolyse stellt einen wichtigen Virulenzfaktor von *S. agalactiae* dar. Spellerberg et al. konnten 1999 den für die Hämolyse codierenden Genabschnitt, das *cyl*-Operon, identifizieren (Spellerberg et al., 1999). Dies wird upstream von einer insgesamt 631 bp langen Region flankiert, in der sich die mutmaßliche Promotorregion der *cyl*-Gene befindet.

*S. agalactiae*-Klone, die diesen DNA-Abschnitt in multiplen Kopien auf Plasmiden enthielten, fielen durch einen ausgeprägt hyperhämolytischen Phänotyp auf. Daraus ergab sich unsere Arbeitshypothese: Die Expression der *cyl*-Gene inhibierende Regulatoren werden durch die multiplen Kopien ihrer Bindungsstellen auf den Plasmiden abgefangen, so dass der im eigentlichen Genom des Prokaryonten liegende Abschnitt vermehrt transkribiert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es die aktiven Regionen innerhalb der Promotorregion der *cyl*-Gene genauer zu definieren.

### **3.1 Herstellung von Vektorkonstrukten und Transformation in O90R**

Zunächst wurden unterschiedliche Fragmente der potentiellen Promotorregion aus chromosomaler DNA des *S. agalactiae*-Stammes O90R mittels PCR mit verschiedenen Primerpaaren hergestellt. Die Primer und damit Länge der hergestellten Stücke waren dabei nach folgenden Prinzipien ausgewählt: Zum einen wurden Abschnitte mit potentiellen TATA-Box-Motiven amplifiziert, zum anderen wurde die mutmaßliche Promotorregion immer weiter verkleinert, um die kleinsten aktiven Regionen zu definieren.

Die PCR-Produkte wurden im Folgenden verdaut und in den ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten *E.coli*/*Streptococcus* Shuttle-Vektor pAT28 (Trieu-Cuot et al., 1990) ligiert. Der Vektor wurde anschließend zunächst in den *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  kloniert. Rekombinante Stämme wurden mittels Spectinomycin-haltigem LB-IPTG/X-Gal-Indikatormedium selektiert und die isolierten Plasmide durch analytischen Verdau und Sequenzierung überprüft.

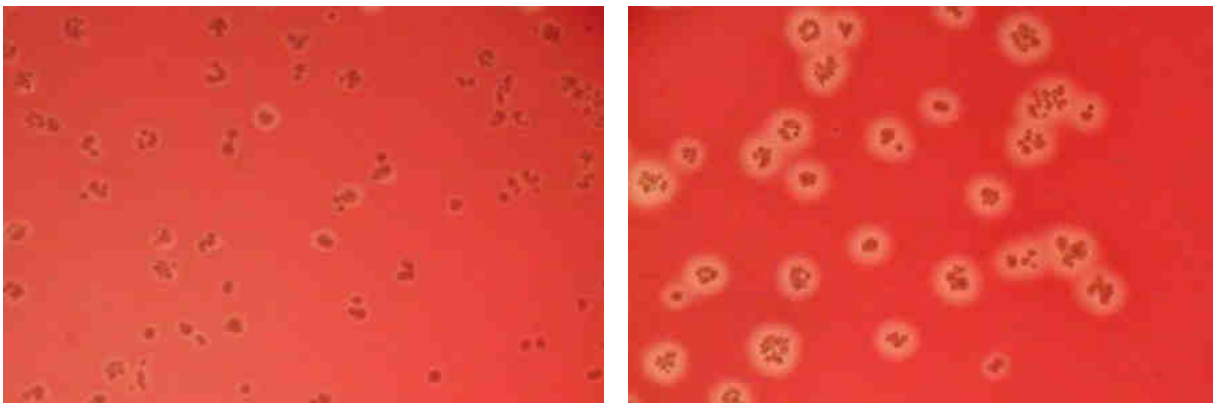
Im nächsten Schritt wurden die Vektorkonstrukte in den *S. agalactiae*-Stamm O90R kloniert. Die transformierten Zellen wurden zunächst auf THY-Agarplatten mit zugesetztem Spectinomycin selektiert und danach auf Blutagarplatten überstempelt. Als

Negativkontrolle wurde ein leerer pAT28-Vektor ohne Insert in O90R kloniert. Die rekombinanten O90R-Klone wurden anschließend gegen den Leervektor verglichen und sowohl die Pigmentierung als auch das Hämolyseverhalten beurteilt. Die Ergebnisse wurden dabei mittels einer Digitalkamera dokumentiert. Die Benennung der rekombinanten O90R-Klone und der entsprechenden Inserts erfolgte nach fortlaufenden Nummern analog unseres Stammregisters.

Um die Reproduzierbarkeit und eine bessere Validierung unserer Ergebnisse zu gewährleisten, wurden dabei zu jedem klonierten Abschnitt 2 rekombinante Stämme angelegt. Da sich für beide identische Plasmide tragende Klone bezüglich hämolytischer Aktivität und Pigmentierung stets gleiche Ergebnisse fanden, wird im Folgenden beispielhaft in der Regel nur einer der beiden Stämme genannt werden.

### **3.2 Einfluss der Promoterregion auf das Hämolyseverhalten**

Zur Auswertung des Hämolyseverhaltens wurden die Anzahl der hyperhämolysierenden Kolonien auf den Blutagarplatten bestimmt. Hyperhämolysierende Kolonien sind dabei durch einen überproportional großen Lysehof im Verhältnis zur Koloniegröße zu erkennen. Abbildung 2 zeigt exemplarisch normal hämolyisierende Kolonien des Wildtyps im Vergleich zu hyperhämolysierenden Kolonien des rekombinanten Stamms 213.



**Abbildung 2:** *Streptococcus agalactiae* auf Blutagarplatten.

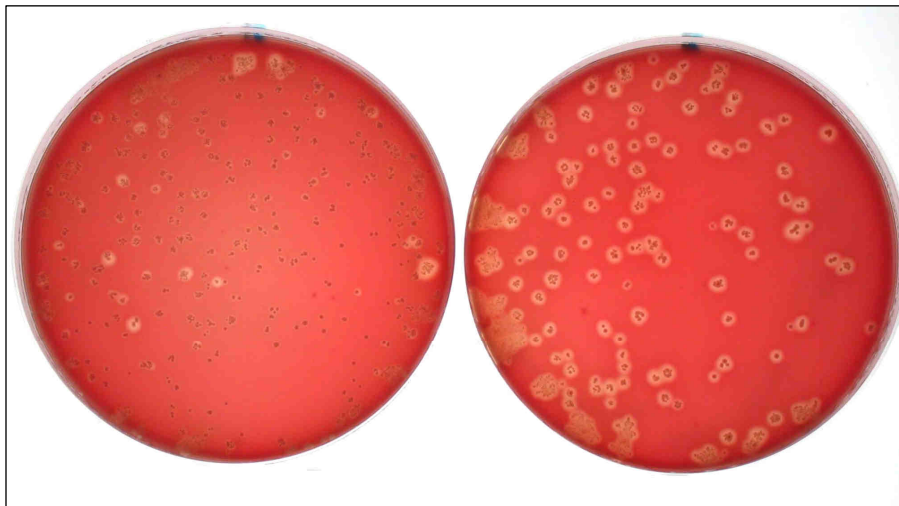
Links: normal hämolyisierende Kolonien des Wildtypstamms O90R .

Rechts: hyperhämolyisierende Kolonien des rekombinanten Stamms 213.

Die rekombinanten Klone und der Leervektor wurden anschließend je nach Anteil der hyperhämolyisierenden Kolonien an der Gesamtkoloniezahl mithilfe eines vierstufigen Auswertungsschemas beurteilt:

0-25% hyperhämolyisierende Kolonien:	+
25-50% hyperhämolyisierende Kolonien:	++
50-75% hyperhämolyisierende Kolonien:	+++
75-100% hyperhämolyisierende Kolonien:	++++

Zur Verdeutlichung des angewandten Bewertungssystems zeigt Abbildung 3 beispielhaft Bilder des auf Blutagar überstempelten rekombinanten Stamms 174 und des Leervektors mit nachfolgender Auswertung. Dabei ist zu bemerken, dass der Leervektor in allen Fällen mit + bewertet wurde, da auch er einige hyperhämolyisierende Kolonien aufwies. Dieser beim Wildtyp in der Regel selten auftretende Effekt ist höchstwahrscheinlich einer unspezifischen Reaktion der Erreger auf die Elektrotransformation zuzuschreiben. Das Zusammenlaufen von Kolonien am Rand der Agarplatten ist durch die Überstempelung der Kolonien mittels eines Stempelkissens bedingt.



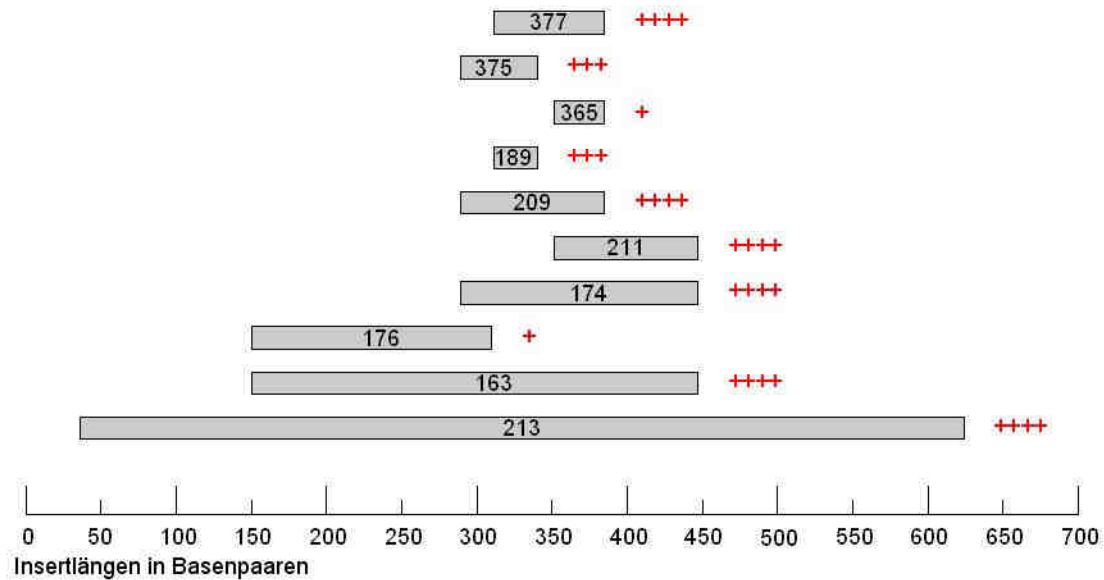
**Abbildung 3:** auf Blutagarplatten überstempelte Kolonien von *Streptococcus agalactiae*.

Links: Leervektor mit einer hämolytische Aktivität von +.

Rechts: Stamm 174 mit einer hämolytischen Aktivität von ++++.



Abbildung 4 zeigt die Auswertung der in der ersten Versuchsreihe klonierten Abschnitte der potentiellen Promotorregion. Dem Schaubild sind dabei neben der hämolytischen Aktivität auch die ungefähre Länge der klonierten Fragmente in Basenpaaren sowie ihre Lage zueinander zu entnehmen. Die Inserts tragen dabei die Namen der entstandenen rekombinanten O90R Stämme.



**Abbildung 4:** Länge der Inserts in Basenpaaren. Hinter den Balken steht in rot markierten Pluszeichen die Ausprägung der hämolytischen Aktivität.

Im Folgenden sollen die einzelnen Inserts und die Ausprägung der hämolytischen Aktivität der sie in multiplen Kopien tragenden Klone im Detail besprochen werden:

Das längste Fragment 213 enthält bei einer Länge von 624 bp die komplette mutmaßliche *cyl*-Promoterregion. Der entstandene rekombinante O90R-Stamm 213 zeigte einen auffällig hyperhämolytischen Phänotyp, der mit + + + + bewertet wurde. Auch das nächst kleinere Insert 163, welches dem mittleren Anteil der zu untersuchenden Region entspricht, verlieh dem entsprechenden rekombinanten O90R-Stamm eine ausgesprochen hyperhämolytische Aktivität (+ + + +).

Im nächsten Schritt wurde das Fragment 163 in 2 Abschnitte aufgeteilt: Die nachfolgend entstandenen Inserts 176 und 174 haben eine Länge von 191 und 159 bp und entsprechen dem upstream und downstream Anteil von 163. Diese Aufteilung erbrachte einen ersten Unterschied bei der Beurteilung der hämolytischen Aktivität: Während der Insert 174 tragende O90R-Stamm weiterhin eine deutliche Hyperhämolyse (+ + + +) demonstrierte,

konnte bei dem rekombinanten O90R-Stamm, welcher Insert 176 trug, kein Unterschied zum Leervektor festgestellt werden (+).

Daraufhin wurden 2 Inserts generiert, die einer Aufteilung von Fragment 174 in zwei 97 bp lange Teile entsprechen. Die entstandenen O90R-Klone 209 und 211 zeigten beide eine stark hyperhämolytische Aktivität, die mit + + + + bewertet wurde.

Bei der Auswahl der nächsten Fragmente wurden nun 2 Ansätze verfolgt: zum einen wurde ein 30 bp großes Fragment, welches die an TATA-Box-Motiv erinnernden Sequenzen TTGACA und TACTAT enthält, in O90R kloniert. Der dieses Insert beherbergende Stamm 189 zeigte ebenfalls eine Verstärkung der hämolytischen Aktivität, die mit + + + allerdings etwas schwächer als bei den vorherigen, größere Inserts ausgeprägt war.

Zum anderen wurde die Überlappungsregion von 209 und 211 in O90R kloniert. Beide Stämme hatten zuvor einen ausgesprochen hyperhämolytischen Phänotyp demonstriert. Das 35 bp große, der Überlappungsregion entsprechende Insert hatte überraschenderweise jedoch keinen Effekt auf die hämolytische Aktivität: der es tragende rekombinante Stamm 365 zeigte bezüglich der Hämolyse keinen Unterschied zum Leervektor (+).

Dies führte zu dem Schluss, dass mehrere aktive Regionen in der Promoterregion der *cyl*-Gene vorliegen müssen. Die potentiellen Regulatorbindungsstellen liessen sich dabei sowohl upstream als auch downstream der Überlappungsregion vermuten.

Die nächsten Schritte galten nun der genaueren Identifizierung der upstream gelegenen aktiven Region. Die in diesem Bereich liegenden, an TATA-Box-Motive erinnernden Sequenzen hatten einen ungefähren Anhaltspunkt vorgegeben.

Insert 209 wurde dazu in ein upstream und downstream Fragment aufgeteilt. Die neu entstandene Inserts 375 (52 bp) und 377 (75 bp) enthalten dabei beide die potentiellen TATA-Box-Motive, die auch Insert 189 enthält. Sie entsprechen einer upstream und downstream Verlängerung dieser Sequenz.

Der das weiter upstream liegende Insert 375 beherbergende Stamm zeigte dabei keine Veränderung der hämolytischen Aktivität im Vergleich zum rekombinanten Stamm 189: in beiden Fällen wurde die Hyperhämolyse mit + + + bewertet.

Das weiter downstream liegende Fragment 377, welches neben den TATA-Box-Motiven auch die oben beschriebene Überlappungsregion (Insert 356) enthält, verlieh dem es tragenden rekombinanten Stamm wiederum eine ausgeprägte Hyperhämolyse von + + + +.

### **3.3 Herstellung von Deletionsmutanten**

Zur Bestätigung der in der ersten Versuchsreihe erlangten Ergebnisse wurden im Anschluss Deletionsmutanten konstruiert. Dabei wurden die potentiellen Regulatorbindungsstellen innerhalb der Promoterregion auf den Plasmidkonstrukten deletiert. Die deletierten Inserts wurden analog den Inserts der ersten Versuchsreihe in multiplen Kopien mithilfe des Shuttle-Vektors pAT28 zunächst in *E.coli* DH5 $\alpha$  und anschließend in *S. agalactiae* O90R kloniert. Auch die Beurteilung der hämolytischen Aktivität erfolgte mittels des gleichen Schemas.

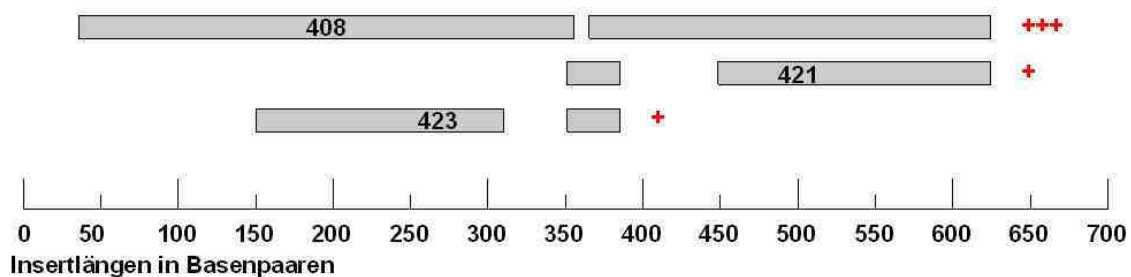
Insert 213, welches die komplette mutmaßliche *cyl*-Promoterregion enthält, diente dabei als Vorlage: aus dem 624 bp langem Fragment wurden 3 verschiedene Fragmente jeweils deletiert und die entstandenen Inserts anschließend gegen einen Leervektor verglichen. Auf Blutagar ausplattiert hatte der rekombinante Stamm 213 in unseren ersten Versuchsreihen einen stark hyperhämolytischen Phänotyp gezeigt.

Bereits bei den vorausgegangenen Versuchen ergab sich die Vermutung, dass es mehrere aktive Regionen im Sinne potentielle Regulatorbindungsstellen in der Promoterregion des *cyl*-Operons geben muss. Dies hatte sich vor allem durch die fehlende Hyperhämolyse von Stamm 365, der Überlappungsregion zweier stark hämolysierender Inserts, herauskristallisiert.

Es wurde so zum einen ein 40 bp langes Fragment upstream dieser Region dilatiert, welches dem TATA-Box-Motive enthaltendem Insert 189 mit einer downstream Verlängerung um 10 bp entspricht. Im vorherigen Schritt hatte diese Region - jeweils upstream und downstream verlängert - zur Entstehung hyperhämolytischer Mutanten geführt (377, 375). Der das deletierte Insert tragende Stamm 423 wies keine hyperhämolytische Aktivität im Vergleich zum Leervektor auf (beide +).

Des Weiteren erfolgte die Deletion eines 62 bp langen Fragments weiter downstream. Alle diesen Abschnitt enthaltende Klone (213, 163, 174, 212) hatten in der ersten Versuchsreihe einen ausgeprägt hyperhämolytischen Phänotyp gezeigt. Die resultierende Deletionsmutante (Stamm 421) zeigte bezüglich des Hämolyseverhaltens keinen Unterschied zum Leervektor (beide +).

Im Folgenden wurde ein 9 bp großes Fragment mit der Sequenz TATTTAAT deletiert. Für das CovR-Regulatorprotein des Zweikomponentensystems CovS/CovR konnte eine Bindung an diese Nukleotidsequenz nachgewiesen werden (Lamy et al, 2004). Die Sequenz liegt dabei zwischen dem 356. und 365. Basenpaar des insgesamt 631 bp langen, die komplette mutmaßliche Promoterregion enthaltenden DNA-Abschnitts oberhalb der *cyl*-Gene. In den meisten der zuvor klonierten Inserts war sie enthalten (213, 163, 174, 212, 209, 365, 377). Der entstandene rekombinante Stamm 408 zeigte eine hyperhämolytische Aktivität von + + +. Damit besteht eine Abschwächung der Hämolyse im Vergleich zu dem das komplette Insert tragenden Stamm 213 (+ + + +), jedoch kein so ausgeprägter Effekt wie bei der Deletion der beiden anderen Fragmente. Abbildung 5 veranschaulicht die Länge und Lage der deletierten Fragmente sowie deren Einfluss auf das Hämolyseverhalten der entstandenen rekombinanten Stämme.



**Abbildung 5:** Insertlänge der Deletionsmutanten in Basenpaaren. Hinter den Balken steht in rot markierten Pluszeichen die Ausprägung der hämolytischen Aktivität.

Diese Ergebnisse bestätigten den Verdacht, dass mehrere Regionen an der Regulation des *cyl*-Operons partizipieren, darunter die deletierten Abschnitte von 40 und 62 bp Länge. Die bei Stamm 408 beobachtete Abschwächung des hyperhämolytischen Phänotyps von + + + + auf + + + im Vergleich mit dem die ganze Promoterregion beherbergenden Stamm 213 spricht aber für eine Beteiligung des deletierten Abschnittes an der Regulation der Hämolyse. Abbildung 6 zeigt die Sequenzen der deletierten Abschnitte innerhalb der mutmaßlichen Promoterregion.

```

1  ttcttgatta gtaaggcaag ccattaatth ttttgagtgt ttagaagttt taggcttact
61  aacttagctt tgtagtgat gatatactcc ccttatagtg tctagtgaat ttttgthttt
121 ttactgtcca ctataagggg agtatatcag gtgaagaggg actattagtg ttgagaataa
181 tgtccctcat agaacaataa ttaccatatac tttaccaaaa taaagthaaa aacgctctta
241 gatgtgcttt ctaagagcgt tttttggtct ataaaaggta agcaaaaagc agatgthatt
301 tatgaaagtg ttgacaaaaga tgaaatactt tgthactatt ttaacataat aatgathattt
361 taathtagagt gtgaatthtat aattaattht tataatgtht atththaaatt taaactaatg
421 thtatagcag thththactc atgaththtgt gaattcaaca cttaagthcat gacctcattt
481 taaagagtht cagacgacac agaaaggaag aaaacataag aaaggcaatg cacggcttht
541 ccatagthag thththaaagta gatgththtaga aataththttht ththcacaag thctgathatc
601 agagcgaaga thgathththt aaggtgataa athgggacgt thctaatatht thgathththt
661 tgaacaatht thctgathaatc aatgthggctt gtathaaaacg cggctthaaag athaagththt

```

→ **Beginn *cyl*-Gene (*cyl X*)**

**Abbildung 6:** Sequenz des die mutmaßliche Promoterregion enthaltenden DNA-Abschnitts oberhalb der *cyl*-Gene. Die deletierten Abschnitte sind farbig markiert; der Beginn der *cyl*-Gene ist **schwarz** markiert.

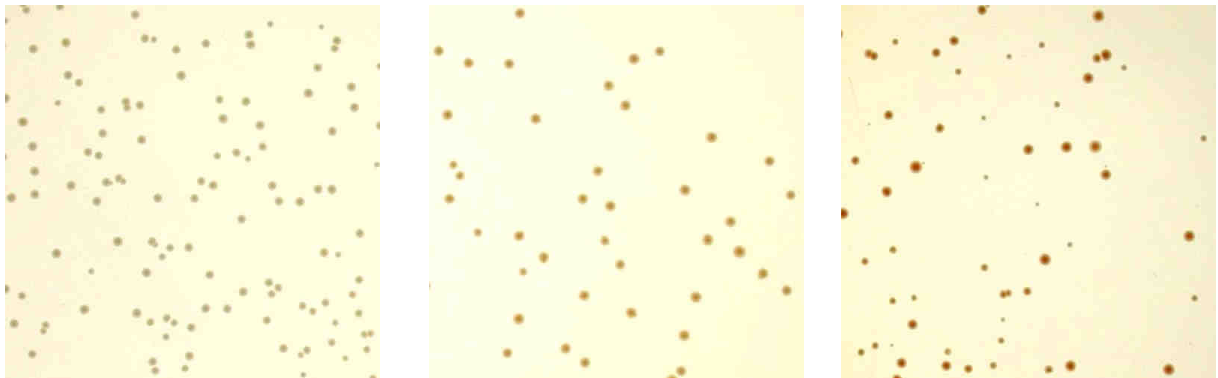
1. deletierter Abschnitt 311-350 **blau**
2. deletierter Abschnitt 356-364 (CovR-Bindungsstelle) **rot**
3. deletierter Abschnitt 386-447 **grün**

(A: Adenin, C: Cytosin, DNA: Desoxyribonukleinsäure, G: Guanin, T: Thymin)

### **3.4 Einfluss der Promoterregion auf die Pigmentierung**

Bei der Entdeckung der *cyl*-Gene war bereits eine enge genetische Verknüpfung des Pigmentierungs- und Hämolyseverhaltens postuliert worden.

Von allen oben beschriebenen Klonen wurde deshalb ebenfalls das Pigmentierungsverhalten ausgewertet. Die rekombinanten Stämme wurden hierzu auf spectomycinhaltige THY-Platten ausplattiert und fotografiert. Die Stärke der Pigmentierung wurde in 3 Stufen von + bis + + + bewertet, wobei Stufe + der normalen, dezent rötlichen Pigmentierung des Wildtyps, Stufe + + einer mittelstarken und Stufe + + + einer auffällig roten Pigmentierung entsprechen. Abbildung 7 zeigt Beispiele für die jeweiligen Pigmentierungsstufen.



**Abbildung 7:** *Streptococcus agalactiae* auf THY-Platten.

Links: Leervektor mit der Pigmentierungsstufe 1.

Mitte: Stamm 209 mit der Pigmentierungsstufe 2.

Rechts: Stamm 163 mit der Pigmentierungsstufe 3.

(THY: Todd-Hewitt-Broth mit zugesetzter Hefe)

Da ein ausplattierter Stamm auch mehrere Pigmentierungsstufen aufweisen kann wurde neben der Pigmentierungsstärke auch die Anzahl der Kolonien in der jeweiligen Pigmentierungsstufe berücksichtigt. Hierbei wurden entsprechend der Kolonienanzahl für jede Pigmentierungsstufe folgende Punkte vergeben:

0-25 % pigmentierte Kolonien:	1
25-50 % pigmentierte Kolonien:	2
50-75 % pigmentierte Kolonien:	3
75-100 % pigmentierte Kolonien:	4

Insgesamt fand so ein zusammengesetztes Bewertungssystem Anwendung, welches Punkte basierend auf dem Produkt aus Pigmentierungsstärke und Anzahl der Kolonien in der entsprechenden Pigmentierungsstufe vergibt:

1x Anzahl der Kolonien in Pigmentierungsstufe +  
plus 2x Anzahl der Kolonien in Pigmentierungsstufe ++  
plus 3x Anzahl der Kolonien in Pigmentierungsstufe +++

Die maximal erreichbare Punktzahl liegt so bei 12, die minimale bei 4 Punkten.

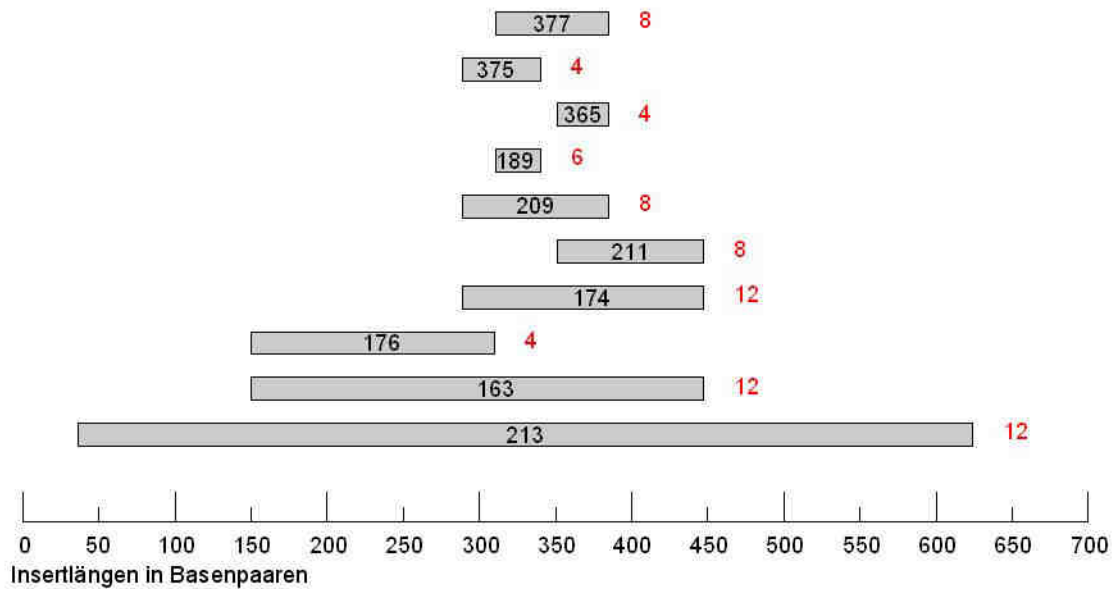
Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse für die jeweiligen rekombinanten O90R-Stämme:

**Tabelle 3:** rekombinante Stämme und Pigmentierungsgrad

Stamm	Pigmentierung (Stärke und Anzahl)	Punkte insgesamt (Produkt)
213	+: 0 ++: 0 +++: 4	12
163	+: 0 ++: 0 +++: 4	12
176	+: 4 ++: 0 +++: 0	4
174	+: 0 ++: 0 +++: 4	12
209	+: 0 ++: 4 +++: 0	8
211	+: 0 ++: 4 +++: 0	8
189	+: 3 ++: 0 +++: 1	6
365	+: 4 ++: 0 +++: 0	4
375	+: 4 ++: 0 +++: 0	4
377	+: 0 ++: 4 +++: 0	8



Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse der Beurteilung der Pigmentierung im Balkendiagramm zur Verdeutlichung der Zusammenhänge. Dem Diagramm sind dabei neben der Länge der Inserts auch ihre Lage zueinander zu entnehmen. Hinter den Balken stehen die nach obig erläuterten Bewertungsschema erreichten Punkte.



**Abbildung 8:** Länge der Inserts in Basenpaaren. Hinter den Balken steht in rot markierten Zahlen die Ausprägung Pigmentierung.

Ähnlich der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe zeigten die rekombinanten Klonen, welche große Abschnitte der potentiellen Promoterregion in multiplen Kopien enthielten, neben einem hyperhämolytischen auch einen hyperpigmentierten Phänotyp. Dies konnte so für die rekombinanten Stämme 213, 163 und 174 nachgewiesen werden. Der rekombinante Stamm 176 zeigte ebenfalls korrelierend mit seinem Hämolyseverhalten eine dem Leervektor gleichende Pigmentierung.

Unterschiede im Vergleich zum Hämolyseverhalten zeigten sich mit zunehmender Verkleinerung der transformierten Inserts: Die die Inserts 209 und 211 tragenden Klone zeigten so bereits eine abgeschwächte aber im Vergleich zum Leervektor immer noch verstärkte Pigmentierung. Beide Klone wurden bei 100% Kolonien der Pigmentierungsstufe 2 mit 8 Punkten bewertet. Dies stellte ein Abweichung zum Hämolyseverhalten dar, wo die beide rekombinanten Stämme auf Blutagar ausplattiert ausschließlich hyperhämolytische Kolonien aufwiesen und entsprechend mit + + + + bewertet wurden.

Der rekombinante Stamm 189 zeigte Kolonien in mehreren Pigmentierungsstufen, darunter die meisten in einer normalen, dem Wildtyp entsprechenden Pigmentierung und nur wenig hyperpigmentierte Kolonien. Zusammengenommen ergab sich eine Punktzahl von 6. Das nur 35 bp lange Insert 365 vermittelte dem es tragendem Stamm keine veränderte Pigmentierung im Vergleich zum Leervektor. In beiden Fällen korrelierte die Pigmentierung mit dem hämolytischen Phänotyp.

Dagegen ergab die Bewertung der Pigmentierung der rekombinanten Stämme 375 und 377 wieder Unterschiede im Vergleich zur hämolytischen Aktivität. Vor allem beim rekombinante Stamm 375 fand sich eine Diskrepanz der beiden Merkmale mit einer normalen Pigmentierung von 4 Punkten bei gleichzeitig auf + + + gesteigerter Hämolyse. Insert 377 vermittelte eine leicht gesteigerte Pigmentierung von 8 Punkten, was sich von dem prominent hyperhämolytischen Phänotyp, den es vermittelt hatte, unterschied.

Tabelle 4 gibt die Ergebnisse der Bewertung von Pigmentierung und hämolytischer Aktivität im tabellarischen Vergleich wieder, um Unterschiede zu verdeutlichen.

**Tabelle 4:** Vergleich des Hämolyse- und Pigmentierungsverhaltens der rekombinanten Stämme nach den obig erläuterten Bewertungsschemata.

Rekombinanter Stamm	Hämolyseverhalten	Pigmentierungsverhalten
Leervektor	+	4
213	+ + + +	12
163	+ + + +	12
174	+ + + +	12
176	+	4
209	+ + + +	8
211	+ + + +	8
189	+ + +	6
365	+	4
375	+ + +	4
377	+ + + +	8

Hier kann eine beim Hämolyseverhalten erreichte Wertung von + + + + mit einer beim Pigmentierungsverhalten erzielten Punktzahl von 12 gleichgesetzt werden, da beides der maximal erreichbaren Wertung entspricht.

---

Eine abgeschwächte Korrelation der Hämolyseaktivität mit der Pigmentierung zeigte sich somit bei den rekombinanten Stämmen 209, 211, 375 und 377. Hierbei verhielt es sich immer so, dass die Pigmentierung verhältnismäßig schwächer ausgeprägt war als die hämolytische Aktivität. Umgekehrt war es aber in keinem Fall so, dass ein stark pigmentierter Stamm einen abgeschwächten hämolytischen Phänotyp präsentierte.

### **3.5 Hämolysinassays**

Zur quantitativen Bestimmung der Hyperhämolyse führten wir Hämolysinassays durch. Es handelt sich um einen experimentellen Ansatz, der nach Marchlewicz et al. modifiziert wurde (Marchlewicz u. Duncan, 1981). Dabei wurden die hergestellten rekombinanten Bakterienstämme mit humanem Vollblut inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden dann unterschiedliche Mengen des Überstands ad 500ml einer Pufferlösung pipettiert und der Verfärbungsgrad photometrisch quantifiziert. Dieser sollte dem Ausmaß der stattgefundenen Hämolyse entsprechen.

Unsere ersten Versuchsreihen mit den Hämolysinassays dienten der Optimierung des gesamten Ansatzes. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, hatte sich in vielen Arbeiten gezeigt, dass es sich bei dem Hämolysin von *S. agalactiae* um ein äußerst labiles Molekül handelt, welches sich nur schwer extrahieren lässt.

Zunächst führten wir den Assay mit dem Wildtyp O90R unter Zusatz verschiedener Konzentrationen an Stärke und fetalem Kälberserum (FCS) durch. Diese zum Nährmedium MTHB zugegebenen Stoffe sollten die Expression und die Stabilität des Hämolysins verstärken. Stärke wurde dabei in Konzentrationen von 0,5 %, 1 % und 2 % getestet; FCS in Konzentrationen von 1-5 %. Die besten Ergebnisse, das heißt ein linearer Anstieg der photometrischen Dichte als Ausdruck der hämolytischen Aktivität, zeigten sich für den Zusatz von 0,5 % Stärke und 3 % FCS. Zudem wurden verschiedenen Inkubationszeiten der Bakterienstämme in MTHB-Medium (mit Stärke und FCS) in unterschiedlichen Brutschränken getestet.

Die in die Auswertung eingehenden Assays wurden schließlich unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Zusatz von 0,5 % Stärke (w/v) und 3 % FCS (v/v) zu Nährmedium MTHB
- darin Inkubationszeit von 3,5 Stunden
- Inkubation im 37 °C Brutschank unter aeroben Bedingungen

Nach Festlegung dieses Standards wurden nun verschiedene rekombinante O90R-Klone, welche makroskopisch einen ausgeprägt hyperhämolytischen Phänotyp präsentiert hatten, gegen den Wildtyp O90R und einen Leervektor im Assay verglichen. Bei dem Leervektor handelte es sich dabei wie in den ersten beiden Versuchsreihen um einen O90R-Stamm, in den leere pAT28-Vektoren ohne Inserts transformiert worden waren. Dabei stammten die

gegeneinander verglichenen Klone (rekombinante Stamm mit Insert vs. Leervektor) immer aus der gleichen Transformation, d.h. sie wurden unter gleichen Bedingungen hergestellt.

Im Folgenden zeigen sich die gemittelten Werte aus 4 Assays mit dem rekombinanten Stamm 213 versus Leervektor versus O90R. Die OD<sub>540</sub> der Positivkontrolle, bestehend aus mit Aqua bidest lysierten Erythrozyten, wurde gleich 100% gesetzt, und die hämolytische Aktivität der einzelnen Stämme entsprechend prozentual ausgerechnet.

**Tabelle 5:** Hämolytische Aktivität des rekombinanten Stamms 213 versus Leervektor versus O90R in Prozent. Die OD<sub>540</sub> der Positivkontrolle wurde 100 % gesetzt.

	Eingesetzter Zellüberstand in µl (Mikroliter)			
	5	10	20	40
213	2,09 %	9,21 %	29,68 %	65,33 %
Leervektor	2,18 %	7,73 %	38,79 %	54,8 %
O90R	2,47 %	10,1 %	29,6 %	67,8 %

Analog wurden Hämolysinassays mit den identische Vektorkonstrukte tragenden Stämmen 174 und 175 durchgeführt, die ebenfalls 100% hyperhämolytischen Kolonien auf den Agarplatten demonstriert hatten. Auch hier erfolgte der Vergleich mit dem Leervektor und dem Wildtypstamm O90R. Tabelle 5 präsentiert die gemittelten Ergebnisse von 4 Assays.

**Tabelle 6:** Hämolytische Aktivität der rekombinanten Stämme 174 und 175 versus Leervektor versus O90R in Prozent. Die OD<sub>540</sub> der Positivkontrolle wurde 100% gesetzt.

	Eingesetzter Zellüberstand in µl (Mikroliter)			
	5	10	20	40
174	1,86 %	5,22 %	33,52 %	55,1 %
175	1,91 %	3,76 %	28,56 %	47,97 %
Leervektor	1,95 %	25,67 %	37,91 %	71,08 %
O90R	1,8 %	6,62 %	36,53 %	55,67 %

In beiden Fällen fanden sich trotz mehrfacher Messungen stark schwankende Ergebnisse. Für die rekombinaten Stämme konnte eine gegenüber dem Wildtyp oder dem Leervektor signifikant höhere  $OD_{540}$  – gleichzusetzen mit einer höheren hämolytischen Aktivität – leider nicht bewiesen werden. Für jeden einzelnen *S. agalactiae*-Stamm – ob Wildtyp oder rekombinanter Stamm - konnte jedoch ein linearer Anstieg der  $OD_{540}$  in Abhängigkeit der Menge des eingesetzten Überstandes gezeigt werden.

Eine Quantifizierung der makroskopisch eindeutig zu sehenden Unterschiede in der hämolytischen Aktivität konnte jedoch nicht erfolgen.

## 4 Diskussion

In *S. agalactiae* codieren die *cyl*-Gene für die Hämolsinexpression und sind gleichzeitig an der Pigmentproduktion beteiligt (Spellerberg et al., 1999 und 2000). Die unmittelbar upstream der *cyl*-Gene liegende Region zeigt mehrere TATA-Box-Motive und wurde daher als mutmaßliche Promoterregion des *cyl*-Operons eingestuft. Die Beobachtung, dass rekombinante Plasmide, die diese Region beherbergen, *S. agalactiae* Wildtyp-Stämmen einen hyperhämolytischen Phänotyp vermitteln, führte uns zur Hypothese, dass Repressormoleküle an diese Region binden. An die Plasmide gebunden sind die Regulatorproteine nicht mehr in der Lage, an die chromosomale Promoterregion zu binden, um die Transkription der *cyl*-Gene zu inhibieren. Folglich demonstrieren Klone, die die potentiellen Bindungsstellen in multiplen Kopien beherbergen, im Vergleich zum Wildtyp einen hyperhämolytischen und hyperpigmentierten Phänotyp. Um diese Hypothese zu beweisen und die Bindungsstellen der Regulatormoleküle genau zu definieren, konstruierten wir eine Serie von pAT28-Plasmiden, die kleine Fragmente der Promoterregion enthielten. Bei der Auswahl der Fragmente wurden zum einen Abschnitte mit potentiellen TATA-Box-Motiven ausgewählt, zum anderen wurde die potentielle Promoterregion immer weiter verkleinert, um die aktiven Regionen möglichst genau einzugrenzen.

Zunächst wurde das Hämolyseverhalten der rekombinanten Stämme auf Bluagarplatten ausgewertet. Diese Versuche führten zur Identifikation zweier DNA-Fragmenten von 30 bp (Insert 189) und 97 bp (Insert 211), die in der Lage waren, dem Wildtypstamm O90R einen hyperhämolytischen Phänotyp zu vermitteln. Die durch das längere Fragment vermittelte Hyperhämolyse war dabei ausgeprägter als die des kleineren Fragments (+ + + + versus + + +). Die mittels diesem Verfahren entdeckten aktiven DNA-Abschnitte sind die Nukleotide 311-340 und 351-447 der GenBank Acession number AF 093787.

Um die mutmaßlichen Bindungsstellen genau zu definieren, wurden große Fragmente der Promoterregion mit Deletion der Nukleotide 311-350, 386-447 und 356-364 konstruiert. Diese deletierten Fragmente wurden ebenfalls als multiple Kopien auf Plasmiden in den Wildtypstamm O90R transformiert und die Klone anschließend bezüglich ihrer hämolytischen Fähigkeit auf Agarplatten ausgewertet. Die deletierten DNA-Fragmente 311-350 und 386-447 entsprechen dabei einer Verlängerung bzw. einer Verkürzung der

durch unsere erste Versuchsreihe eingegrenzten aktiven Regionen von 30 und 97 bp Länge.

Die 30 bp lange aktive Region (Insert 189) wurde dabei um 10 bp nach downstream verlängert. Dies erfolgte, da aufgefallen war, dass dieses Fragment zwar eine gesteigerte aber im Vergleich zu längeren Inserts doch nicht voll ausgeprägte Hyperhämolyse vermittelte. Als denkbare Ursache hierfür sahen wir die geringe Größe des Fragments, die eine Bindung der Regulatorproteine womöglich einschränkte. Eine upstream Verlängerung des Fragments hatte aber keine Verstärkung der Hyperhämolyse ergeben (Insert 377), so dass wir uns entschieden eine um 10 bp downstream Verlängerung von Insert 189 zu deletieren. Die entstandene Deletionsmutante zeigte eine hämolytische Aktivität von +, die sich vom Leervektor nicht unterscheiden ließ.

Die 97 bp lange aktive Region (Insert 211) wurde um den 35 bp langen, upstream gelegenen Anteil verkürzt. In den vorausgegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass dieser, der Überlappungsregion zweier stark hyperhämolisierender Inserts entsprechende Anteil (Insert 365), keinen hyperhämolytischen Phänotyp vermitteln konnte und der zugehörige rekombinante Stamm keinerlei Unterschied zum Leervektor zeigte. Dies ließ uns schlussfolgern, dass der downstream Anteil der aktiven Region von 97 bp Länge eine Regulatorbindungsstelle enthalten könnte. Die Deletion dieses Abschnitts vermittelte dem entsprechenden rekombinanten Stamm eine hämolytische Aktivität von +. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese einer weiteren Regulatorbindungsstelle im downstream Anteil des 97 bp Fragments.

Neben den von uns entdeckten aktiven Regionen wurden die Nukleotide 356-364 deletiert. Diese entsprechen dem DNA-Abschnitt, der von Lamy et al. als CovS/CovR-Bindungsstelle identifiziert wurde (Lamy et al., 2004). Er besteht aus der Nukleotidsequenz TATTTAAT und ist der von uns entdeckten aktiven Region von 97 bp enthalten. Bemerkenswerterweise findet sich diese 9 bp lange Sequenz aber in jenem upstream Anteil unseres aktiven Fragments von 97 bp, für den wir in der ersten Versuchsreihe eine aktive Beteiligung als Regulatorbindungsstelle ausgeschlossen hatten.

In unserer Arbeit fand sich damit zunächst eine Diskrepanz zu der Arbeit von Lamy et al. Da das von uns eingegrenzte 30 bp lange aktive Fragment, die CovS/CovR-Bindungsstelle



aber nicht enthielt und dennoch einen hyperhämolytischen Phänotyp vermitteln konnte, wollten wir herausfinden in welchem Maß die CovS/CovR-Bindungsstelle als auch die von uns entdeckten aktiven Regionen an der Regulation der *cyl*-Gene partizipieren. Zudem konnten Lamy et al. in ihrer Arbeit zwar zeigen, dass *covSR*-Deletionsmutanten einen hyperhämolytischen Phänotyp demonstrieren, hatten aber keine gezielte Deletion der CovS/CovR-Bindungsstelle vorgenommen.

Zu diesem Zweck wurden in unserer Arbeit sowohl die beiden von uns entdeckten aktiven Regionen als auch die CovS/CovR-Bindungsstelle jeweils in einer 624 bp langen Region, die die komplette *cyl*-Promoterregion enthält, deletiert.

Die Deletion der 9 bp langen CovS/CovR-Bindungsstelle führte zu einem leichten Rückgang der hämolytischen Aktivität, aber das rekombinante Insert war immer noch in der Lage einen hyperhämolytischen Phänotyp zu vermitteln. Dies lässt vermuten, dass es zusätzliche Regulatorbindungsstellen innerhalb der Promoterregion geben muss. Bereits bei der Entdeckung der CovS/CovR-Bindungsstelle in der Arbeit von Lamy et al. wurden Überlegungen gemacht, dass das 9 bp Motiv aufgrund seiner Kürze und dem häufigen Auftreten im Genom von *S. agalactiae* zwar vonnöten aber nicht ausreichend für die Erkennung des Zielpromoters durch CovR sei (Lamy et al., 2004).

Die beiden anderen Fragmente der Promoterregion, mit einer Deletion der von uns eingegrenzten aktiven Abschnitte, vermittelten eine normale, dem Leervektor entsprechende hämolytische Aktivität. Beide dieser Fragmente enthielten immer noch die Nukleotidsequenz der CovS/CovR-Bindungsstelle; diese war allerdings nahe im Bereich der Deletion lokalisiert. Dies könnte möglicherweise eine strukturelle Veränderung der Bindungsstelle erwirkt haben, welche CovR an einer Bindung gehindert haben könnte. Gleichzeitig könnte dies auch der Grund dafür gewesen sein, dass Insert 365, welches die CovS/CovR-Bindungsstelle enthielt, keinen hyperhämolytischen Phänotyp vermitteln konnte und Insert 189 eine abgeschwächte Hyperhämolyse zeigte. Beide Fragmente sind mit einer Länge von 35 bzw. 30 bp eher kurz und könnten die Bindung von CovR oder anderen Regulatorproteinen deshalb erschwert bis unmöglich gemacht haben.

Eine weitere Erklärung dieser Ergebnisse könnte das Vorhandensein einer Cofaktor-Bindungsstelle sein, die in den letzten beiden Vektorkonstrukten deletiert wurde. Dies könnte ebenfalls eine Erklärung für eine schwächere Hyperhämolyse der kleineren Inserts

gewesen sein, da hier zum Beispiel nur der Hauptregulator oder nur der Cofaktor durch multiplen Kopien seiner Bindungsstellen auf den Plasmiden abgefangen wurde.

Es ist davon auszugehen, dass mehrere aktive Regionen innerhalb der upstream der *cyl*-Gene liegenden Region – ob nun als Regulator- oder Cofaktorbindungsstelle - an der Regulation des *cyl*-Operons beteiligt sind. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit ein 30 bp und 97 bp langes Fragment als aktive Regionen eingrenzen, die 35 bp weit voneinander entfernt liegen. Das die von uns entdeckten DNA-Fragmente aktiv an der Regulation der Hämolyseexpression beteiligt sind, konnten wir dabei sowohl durch Einschleusen multipler Kopien dieser DNA-Abschnitte in *S. agalactiae* sowie im Gegenversuch durch gezielte Deletion nachweisen.

Die 9 bp lange, von Lamy et al. entdeckte aktive Region liegt zwischen den von uns eingegrenzten Fragmenten. Eine Beteiligung dieses DNA-Abschnitts an der Regulation der *cyl*-Gene konnten wir in unseren Experimenten bestätigen. Lamy et al. konnten eine direkte Bindung von CovR an dieses Fragment und damit die Zugehörigkeit zum CovS/CovR-Zweikomponentensystem nachweisen.

Welche Regulatoren an die von uns eingegrenzten aktiven Regionen binden, ist genauso wie die Anzahl und die Funktionsweise der das *cyl*-Operon regulierenden Systeme aktuell noch unklar. Möglicherweise handelt es sich so um Bindungsstellen eines völlig unbekanntes Signaltransduktionssystems oder eines bereits aus GBS oder von anderen Spezies bekanntem TCS, dessen Beteiligung an der Regulation der *cyl*-Gene noch nicht beschrieben ist.

Das zurzeit in *Streptococcus agalactiae* am besten erforschte Zweikomponentensystem ist das CovS/CovR-System. Es ist aber davon auszugehen, dass viele andere Signaltransduktionssysteme in GBS eine Rolle spielen, von deren genauen Wirkungsweise wir heute noch nicht wissen. In anderen gram-positiven Spezies, speziell in *S. pyogenes* (Gruppe A Streptokokken, GAS), konnte bereits eine Vielzahl von Transkriptionsregulatoren erforscht werden. Dabei spielen neben Zweikomponentensysteme auch sogenannte „stand-alone“-Regulatoren eine Rolle. Dabei handelt es sich um Einkomponentensysteme, die auf Veränderungen im Zytosol oder noch unbekanntes Stimuli reagieren und als Transkriptionsregulatoren die Expression bestimmter Gene kontrollieren.

Gut erforscht in GAS sind der Mga- und der Rgg/RopB-Regulator sowie die Familie der RALP-Regulatoren. Diese werden je nach Wachstumsphase unterschiedlich stark aktiviert. Das Mga-Regulon kontrolliert zum Beispiel die Expression vieler oberflächen-assoziiertes Moleküle, die speziell für die Kolonisation der Wirtszelle essentiell sind, und ist deshalb vor allem in der frühen Wachstumsphase von *S. pyogenes* aktiv (Kreikemeyer et al., 2003). Durch zusätzliche gegenseitige Beeinflussung bilden diese 3 Regulatoren ein hochspezialisiertes Netzwerk.

Nach vollständiger Sequenzierung von GBS geht man auch hier von mindestens 6 „stand alone“-Regulatoren aus, die allerdings weniger gut erforscht als in GAS (Rajagopal, 2009). Die Sequenzierung von *S. agalactiae*-Stämmen enthüllte außerdem das Vorliegen von 17-20 TCS (Glaser et al., 2002; Tettelin et al., 2002). Von diesen sind neben CovS/CovR drei weitere genauer untersucht: DltR/DltS, RgfC/RgfA und CiaR/CiaH. DltR/DltS ist an der Einlagerung von D-Alanin in Lipoteichonsäuren der Bakteriellenzellwand beteiligt, die so einen höheren Schutz gegen antimikrobielle Peptide des Wirtsorgansimus bietet (Poyart et al., 2003). RgfC/RgfA reguliert die C5a Peptidase negativ (Spellerberg et al., 2002). CiaR/CiaH schließlich ermöglicht GBS ein längeres intrazelluläres Überleben in Wirtszellen und ebenfalls eine verbesserte Abwehr gegenüber antimikrobiellen Peptiden, wobei die genauen molekularen Wirkungsmechanismen noch nicht geklärt sind (Quach et al., 2009).

Angesichts der Vielzahl der noch nicht erforschten Transkriptionsregulatoren ist die Wahrscheinlichkeit also hoch, dass neben CovS/CovR weitere Signaltransduktionssysteme an der Regulation der *cyl*-Gene beteiligt sind. Nur wenige davon sind bis jetzt bekannt.

Die Beteiligung von verschiedenen Systemen an der Regulation der *cyl*-Gene wurde in aktuellen Arbeiten weiter erforscht: es konnte nachgewiesen werden, dass eine Serin/Threonin-Kinase, Stk1, CovR ebenfalls phosphorylieren kann - allerdings an einem Threoninrest im Unterschied zu CovS, welches CovR an einem Aspartatrest phosphoryliert. Stk1 führt daher zu einer verminderten Bindung von CovR an die *cyl*-Promoterregion und damit zu einer gesteigerten Expression des Hämolytins (Rajagopal et al., 2006; Lin et al., 2009). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass CovR seine eigene Expression positiv reguliert und insgesamt die Transkription von 153 Genen in *S. agalactiae* beeinflusst (Lembo et al., 2010), was die Wichtigkeit dieses Zweikomponentensystems in GBS unterstreicht.

Neben Stk1 und CovR konnte zudem der „stand alone“-Regulator RovS gefunden werden, der ebenfalls die Expression der *cyl*-Gene beeinflusst. Dieser scheint bei nachgewiesener Bindung an die *cyl*-Promoterregion die *cyl*-Gene direkt zu regulieren und fungiert nach den aktuellen Kenntnissen unabhängig von CovS/CovR und Stk1 (Samen et al., 2006).

Zusammenfassend zeigt sich an diesen Beispielen wie komplex die hämolytische Aktivität in GBS reguliert wird, da das *cyl*-Operon durch mehrere Regulatorsysteme beeinflusst wird, die sich selbst oder gegenseitig wiederum in verschiedene Richtungen regulieren. Es ist anzunehmen, dass *S. agalactiae* durch die vielen beteiligten Signaltransduktionssysteme auf eine Vielzahl von externen Stimuli reagieren kann und dadurch ein Überleben in den unterschiedlichsten Nischen sowie die abgestimmte Expression von Virulenzfaktoren während einer Infektion sicherstellt (Rajagopal, 2009). Speziell für das CovS/CovR-Zweikomponentensystem konnte nachgewiesen werden, dass der pH als Stimuli fungiert. So werden bei einem pH-Anstieg, welcher beim Wechsel des Erregers vom Vaginalmilieu in den Neonaten erfolgt, viele durch CovS/CovR regulierte Virulenzfaktoren überexprimiert (Santi et al., 2009).

Bemerkenswert ist außerdem die Tatsache, dass CovS/CovR in verschiedenen *S. agalactiae*-Stämmen unterschiedliche Gene zu regulieren scheint. Im Vergleich mehrerer Wildtypstämme konnte so eine große Anzahl von stammspezifisch unterschiedlich durch CovS/CovR regulierten Genen nachgewiesen werden, im Gegensatz zu einer kleiner Kerngruppe von Genen, die in allen Stämme gleich durch CovS/CovR reguliert wird. Zu dieser Kerngruppe zählen dabei die für die wichtigsten Virulenzfaktoren codierende Gene, darunter auch das *cyl*-Operon (Jiang et al. 2008).

Sowohl in dieser als auch in vorausgegangenen Arbeiten hatten covSR-Deletionsmutanten bzw. Klone mit Deletionen anderer Abschnitte der Promoterregion einen hyperhämolytischen Phänotyp gezeigt. Dies lässt schlussfolgern, dass die hämolytische Aktivität von *S. agalactiae* vornehmlich durch Inhibierung der *cyl*-Gene reguliert wird.

Für eine Negativregulation der *cyl*-Gene spricht zum einen die in vielen anderen Arbeiten gezeigte leichte Herstellung von hyperhämolytischen *S. agalactiae*-Mutanten, die in Tierexperimenten dann auch eine gesteigerte Virulenz demonstriert hatten (Puliti et al., 2000; Ring et al., 2002). Diese Schlussfolgerung gründet in der Annahme, dass es viel einfacher ist, Regulatormoleküle von negativ regulierten Genen abzufangen, als die Konstruktion und das Zuführen von Regulatormolekülen bei positiv regulierten Genen.

Zum anderen spricht für eine Negativregulation, dass das nachweislich beteiligte CovS/CovR-Zweikomponentensystem als Negativregulator bekannt ist. Für *S. pyogenes* konnte gezeigt werden, dass dieses TCS direkt oder indirekt 15% der chromosomalen DNA von *S. pyogenes* inhibiert (Graham et al, 2002). Dagegen fand sich in *S. agalactiae* eine Beteiligung von CovS/CovR sowohl in der Negativ- als auch in der Positivregulation einer Vielzahl von Genen (Jiang et al., 2008; Santi et al., 2009). Unklar ist hierbei aber oft, ob CovS/CovR die entsprechenden Gene direkt oder indirekt über einen weiteren zwischengeschalteten Regulator beeinflusst, was eine exakte Aussage zum Ablauf der Regulation schwierig macht (Lamy et al., 2004). Der hyperhämolytische Phänotyp von covSR-Deletionsmutanten spricht aber vornehmlich für eine inhibierende Funktion dieses Zweikomponentensystems bei der Regulation der *cyl*-Gene.

Hyperhämolytische Stämme von *S. agalactiae* entstehen in geringen Mengen auch in Abwesenheit von Fremd-DNA bei der Elektrotransformation. In unseren Versuchen zeigten O90R-Stämmen, denen der Shuttle-Vektor pAT28 ohne Insert transformiert wurde, ebenfalls wenige hyperhämolytische Kolonien. In den meisten Fällen ist dieser hyperhämolytische Phänotyp instabil und konvertiert nach mehreren Übertragungen auf Blutagarplatten zum normalen hämolytischen Phänotyp (eigene Beobachtung). Dieses Phänomen könnte durch eine durch die Elektrotransformation veränderte Bindungsaffinität von Repressormolekülen an die aktiven Regionen der *cyl*-Promoterregion erklärbar sein.

Im zweiten Teil unserer Experimente versuchten wir die auf Blutagarplatten eindeutig zu erkennenden gesteigerte hämolytische Aktivität, der die Promoterregion in multiplen Kopien tragenden Stämme, mithilfe quantitativen Hämolysinassays genauer zu bestimmen. Leider fanden sich hierbei keine schlüssigen Ergebnisse. Die Ursache hierfür ist zum einen in der bekannten ausgeprägten Instabilität des Hämolysinmoleküls zu sehen. Zum anderen ist die Methodik des Hämolysinassays als Grund zu nennen. In quasi allen veröffentlichten anderen Arbeiten hatten quantitative Hämolysinassays starke Schwankungen gezeigt.

Die Versuche den Assay durch Zugabe von FCS oder Stärke zu stabilisieren, blieben leider erfolglos. Hieran wird in Zukunft noch gearbeitet werden müssen. Zumindest als Poster gibt es aber aktuell eine Veröffentlichung von de la Rosa-Fraile et al., die einen vielversprechenden stabileren Hämolysinassay präsentiert (Rosa-Fraile et al., 2010).

Die von uns konstruierten *S. agalactiae*-Stämme, die die mutmaßliche Promoterregion der *cyl*-Genen in multiplen Kopien auf Plasmiden enthielten, zeigten zum großen Teil auch einen auffällig pigmentierten Phänotyp. In vielen vorausgegangenen Arbeiten war bereits eine enge genetische Verknüpfung der beiden Merkmale Hämolyse und Pigmentierung beobachtet worden (Spellerberg et al., 2000). Unsere Ergebnisse zeigen, dass große Fragmente der Promoterregion neben der Hyperhämolyse auch einen auffällig hyperpigmentierten Phänotyp vermitteln konnten. Mit zunehmender Verkleinerung der transformierten Inserts, konnte aber eine Abschwächung der vermittelten Pigmentierung und eine fehlende Korrelation mit dem Hämolyseverhalten beobachtet werden.

Diese Beobachtung ist ein Indiz dafür, dass es sich beim Hämolysin und Pigment von *S. agalactiae* nicht um das gleiche Molekül handelt, und die Expression beider Merkmale möglicherweise durch unterschiedliche Regulatorproteine mit unterschiedlichen Bindungsstellen reguliert wird.

Unbestritten ist, dass ein Großteil der *cyl*-Gene sowohl für die Synthese des Hämolysins als auch für die des Pigments essentiell ist, da eine Deletion immer zum Verlust beider Merkmale führte. Dies konnte direkt für *apC*, *cylZ*, *cylA*, *cylB*, *cylE* (Spellerberg et al., 1999), *cylD*, *cylF*, *cylI* (Spellerberg et al., 2000) sowie *cylJ* und *cylK* (Forquin et al., 2007) nachgewiesen werden.

Die genaue Art der Verbindung der beiden Merkmale in *S. agalactiae* ist aber weiterhin ungeklärt. Neben der Annahme, dass es sich um das gleiche Molekül handeln könne, gibt es Theorien, dass das Pigment ein Derivat des Hämolysins sein könnte bzw. dass der pigmentierter Phänotyp ein posttranslatonaler Effekt des Hämolysins auf die Bakterienzelle sein könnte (Pritzlaff et al., 2001; Spellerberg et al., 2000). Möglicherweise verlaufen die Synthese des Hämolysins und des Pigments größtenteils auf demselben Stoffwechselweg, wozu beide die Enzyme und Transporter benötigen, für die das *cyl*-Operons codiert.

Bislang war man davon ausgegangen, dass das Pigment von *S. agalactiae* ein Carotin sei. Neuste Erkenntnisse aber zeigen, dass es sich um ein Glykopolyen mit 12 ungesättigten Verbindungen handelt (Rosa-Fraile et al., 2006). Das Vorkommen von Glykopolyen-pigmenten war in Prokaryonten bis dato nur für die Gattung *Xanthomonas* bekannt (Goel et al., 2002). Hier konnte auch gezeigt werden, dass die Biosynthese von Polyenen und Fettsäuren gemeinsame Stoffwechselwege haben (Forquin et al., 2007). Die Tatsache, dass über die Hälfte aller Gene des *cyl*-Operons für Enzyme der Fettsäuresynthese codieren,

unterstützt die Theorie, dass die Hämolyse- und Pigmentproduktion in *S. agalactiae* zumindest partiell die gleichen enzymatischen Schritte beinhalten.

Bei dem in dieser Arbeit vorgenommenen Vergleich der hämolytischen Aktivität mit dem Pigmentierungsgrad konnte bei einigen unserer rekombinanten Stämme eine leichte Diskrepanz der beiden Merkmale festgestellt werden. Bemerkenswert hierbei war, dass ein hyperhämolytischer Stamm zwar unverhältnismäßig wenig pigmentiert sein konnte, aber niemals ein hyperpigmentierter Stamm nur wenig hämolytisch war.

Auch diese Beobachtung spricht dafür, dass sich Pigment- und Hämolyseproduktionsstoffwechselwege teilen, oder dass es sich bei dem Pigment um ein Abbauprodukt des Hämolyseins handelt. Wenn im diesem Ablauf nur die letzten, für die Pigmentproduktion zuständigen Schritte gestört sind, kann es so zum Auftreten eines hyperhämolytischen und gleichzeitig wenig pigmentierten Stamms kommen. Da die Hämolyseproduktion nach dieser Theorie der Pigmentherstellung vorgeschaltet wäre, wäre das Vorkommen eines hyperpigmentierten und gleichzeitig wenig hämolytischen Stamms nicht möglich, so wie es in unseren Ergebnissen auch der Fall war.

Eine andere Erklärung der unterschiedlichen Ausprägung von Pigmentierung und hämolytischer Aktivität in unseren Ergebnissen könnte auch in der nur semiquantitativen Auswertung des Pigmentierungsgrads zu finden sein. So finden sich zwischen den einzelnen Pigmentierungsstufen fließende Übergänge, deren Abgrenzung sehr subjektiv ist und sich weniger gut quantifizieren lässt wie die Ausmessung eines Hämolysehofs. Des Weiteren ist zu bemerken, dass der Pigmentierungsgrad auch mit der Größe der Kolonien auf der Agarplatte korreliert, und große Kolonien oft pigmentierter erscheinen. Neue Methoden mit einer zum Beispiel spektrophotometrischen Bestimmung des Pigments könnten hier neue Perspektiven eröffnen.

Zusammenfassend bestätigen unsere Ergebnisse, dass das CovS/CovR-Zweikomponentensystem die Hämolyse in *S. agalactiae* durch Bindung an die upstream der *cyl*-Gene gelegene Region reguliert. Zusätzlich konnten wir weitere Regulator- oder Cofaktor-Bindungsstellen in der *cyl*-Promoterregion entdecken. Diese sind möglicherweise Bindungsstellen von einem anderen die Expression der *cyl*-Gene kontrollierenden Signaltransduktionssystem. Dabei kommen aus *Streptococcus agalactiae* oder anderen Spezies bereits bekannte als auch bis dato völlig unbekannte Regulatoren in Frage. Weitere

---

Versuchsreihen mit DNA-Bindungsversuchen und Gel-Shift-Assays könnten hier an unsere Ergebnisse anknüpfen.

Unsere Daten liefern neue Erkenntnisse im Verständnis der Regulation eines der wichtigsten Virulenzfaktoren von GBS. Zu verstehen, wann und wie *S. agalactiae* Virulenzfaktoren exprimiert, ist für die Entwicklung alternativer therapeutischer Strategien unerlässlich. Dies ist besonders wichtig, wenn man bedenkt, dass gegen bestimmte Virulenzfaktoren gerichtete Impfstoffe oder Antiinfektiva nur dann wirken können, wenn ihre Zielstoffe auch gerade exprimiert werden. Des Weiteren sind Signaltransduktionssysteme, die Virulenzfaktoren regulieren, vielversprechende Ziele in der aktuellen Entwicklung von Antiinfektiva (Stephenson und Hoch, 2002). Dies wird angesichts der zunehmend beobachteten Antibiotikaresistenzen von *S. agalactiae* umso wichtiger.



## 5 Zusammenfassung

*Streptococcus (S.) agalcatiae* ist der häufigste Verursacher von schweren Pneumonien, Meningitiden und Septikämien beim Neugeborenen. Die Fähigkeit zur Hämolyse, mit ausgeprägten zytopathischen und proinflammatorischen Auswirkungen auf das angegriffene Gewebe, stellt einen seiner wichtigsten Virulenzfaktoren dar.

Das aus 12 Genen bestehende *cyl*-Operon codiert für die Hämolsinproduktion. Die zugehörige Promoterregion wurde in der 631 Basenpaar (bp) langen Region direkt upstream der *cyl*-Gene vermutet. In vorausgegangenen Experimenten bemerkten wir eine gesteigerte Hämolyse in *S. agalactiae*-Stämmen, die multiplen Kopien dieser mutmaßlichen Promoterregion beherbergten.

Um die genauen regulatorischen Mechanismen weiter zu charakterisieren, war es unser Ziel, aktive Regionen innerhalb der Promoterregion zu identifizieren. Hierzu verwendeten wir den Shuttlevektor pAT28 und chromosomale Desoxyribonukleinsäure (DNA) vom *S. agalcatiae*-Stamm O90R, um multiple Kopien verschiedener Fragmente der mutmaßlichen Promoterregion in O90R zu transformieren. Die rekombinanten Stämme, die diese Fragmente in multiple Kopien auf Plasmiden enthielten, demonstrierten auf Blutagarplatten im Vergleich zum Wildtyp und einem Leervektor als Negativkontrolle deutlich hyperhämolytische Kolonien. Diese Ergebnisse zeigen, dass die klonierten DNA-Abschnitte eine essentielle Rolle in der Regulation des *cyl*-Operon haben; höchstwahrscheinlich in der Funktion als Bindungsstellen für Regulatorproteine.

Mittels gezielter Deletion einzelner DNA-Abschnitte konnten wir kurze DNA-Sequenzen definieren, die wahrscheinlich als Bindungsstellen für Repressormoleküle dienen. Eine dieser DNA-Sequenzen war von anderen Arbeitsgruppen Bindungsstelle des Zweikomponentensystems CovS/CovR entdeckt worden. Unsere Ergebnisse konnten bestätigen, dass CovS/CovR Hämolyse durch Bindung an die Promoterregion reguliert. Zusätzlich konnten wir aber weitere Regulator- oder Cofaktorbindungsstellen definieren. Dies sind möglicherweise Bindungsstellen von einem aktuell in der Regulation der Hämolsinexpression noch unbekanntem Signaltransduktionssystem.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Adair CE, Kowlasky L, Quon H, Ma D, Stoffman J, McGeer A, Robertson S, Mucenski M, Davies HD: Risk factors for early-onset group B streptococcal disease in neonates: a population-based case-control study. *Can Med Assoc J* 169: 198-203 (2003)
- [2] Andersen J, Christensen R, Hertel J: Clinical features and epidemiology of septicaemia and meningitis in neonates due to *Streptococcus agalactiae* in Copenhagen County, Denmark: a 10 year survey from 1992 to 2001. *Acta Paediatr* 93: 1334-1339 (2004)
- [3] Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskas M, Maleckiene L, Nadisauskiene R: Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87: 260-271 (2008)
- [4] Beier D, Gross R: Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* 9: 143-152
- [5] Bergseng H, Rygg M, Bevanger L, Bergh K: Invasive group B streptococcus (GBS) disease in Norway 1996-2006. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 1139-1149 (2008)
- [6] Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Kehoe M, Palmer M: Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* 165: 73-79 (1996)
- [7] Binard A, Devauchelle V, Goulesque K, Jousse S, Saraux A: Group B streptococcal arthritis. *Joint Bone Spine* 73: 465-468 (2006)
- [8] Birnboim HC: A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100: 243-255 (1983)
- [9] Blancas D, Santin M, Olmo M, Alcaide F, Carratala J, Gudiol F: Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 168-173 (2004)
- [10] Brimil N, Barthell E, Heindricks U, Kuhn M, Lütticken R, Spellerberg B: Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *Int J Med Microbiol* 296: 39-44 (2006)
- [11] Brown JH: The cultural differentiation of beta hemolytic streptococci of human and bovine origin. *J Exp Med* 31: 35-47 (1920)
- [12] Brown JH: Double-zone beta hemolytic streptococci. *J Bacteriol* 37: 133-144 (1939)

- 
- [13] CDC: Trends in perinatal Group B streptococcal disease --- United States, 2000-2006. *Morb Mortl Wkly Rep* 58: 109-112 (2009)
- [14] Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, Fahey J, Wessels MR, Rubens CE: Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. *Infect Immun* 73: 3096-3103 (2005)
- [15] Colebrook L, Purdie AW: Treatment of 106 cases of puerperal fever by sulphanilamide. *Lancet* 2: 1237-1242 & 1291-1294 (1937)
- [16] Dal MC, Monteil H: Hemolysin produced by group B streptococcus agalactiae. *FEMS Microbiol Lett* 16: 89-94 (1983)
- [17] Doran KS, Chang JC, Benoit VM, Eckmann L, Nizet V: 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 (2002)
- [18] Doran KS, Liu GY, Nizet V: Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain and endothelium and contributes to development of meningitis. *J Clin Invest* 112: 736-744 (2003)
- [19] Edwards MS, Baker CJ: Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* 41: 839-847 (2005)
- [20] Ekelund H, Konradsen HB: Invasive group B streptococcal disease in infants: a 19-year nationwide study. Serotype distribution, incidence and recurrent infection. *Epidemiol Infect* 132: 1083-1090 (2004)
- [21] Falagas ME, Rosmarakis ES, Avtamopoulos I, Vakalis N: Streptococcus agalactiae infections in non-pregnant adults: single center experience of a growing clinical problem. *Med Sci Monit* 12: 447-451 (2006)
- [22] Farley MM: Group B streptococcal infection in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis* 33: 556-561 (2001)
- [23] Federle MJ, McIver KS, Scott JR: A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A streptococcus. *J Bacteriol* 181: 3649-3657 (1999)
- [24] Fluegge K, Siedler A, Heinrich B, Schulte-Moenting J, Moenning MJ, Bartels DB, Damman O, von Kries R, Berner R, German Pediatric Surveillance Unit Study Group: Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. *Pediatrics* 117: 1139-1145 (2006)
- [25] Forquin MP, Tazi A, Rosa-Fraile M, Poyart C, Trieu-Cuot P, Dramsi S: The putative glycosyltransferase-encoding gene *cylJ* and the group B streptococcus (GBS)-

- specific gene *cytK* modulate hemolysin production and virulence of GBS. *Infect Immun* 75: 2063-2066 (2007)
- [26] Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzéby J, Tindall BJ: The Taxonomic Outline of Bacteria and Archae, Release 7.7. Michigan State University Board of Trustees [online]. Verfügbar unter [www.taxonomicoutline.org](http://www.taxonomicoutline.org) (2007, Download 25.01.2011)
- [27] Goel AK, Rajagopal L, Nagesh N, Sonti RV: Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol* 184: 3539-3548 (2002)
- [28] Gottschalk B, Bröker G, Kuhn M, Aymanns S, Gleich-Theurer U, Spellerberg B: Transport of multidrug resistance substrates by the *Streptococcus agalactiae* hemolysin transporter. *J Bacteriol* 188: 5984-5992 (2006)
- [29] Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, Msadek T, Zouine M, Couvé E, Lalioui L, Poyart C, Trieu-Cuot P, Kunst F: Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol* 45: 1499-1513 (2002)
- [30] Graham MR, Smoot LM, Migliaccio CA, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella SF, Federle MJ, Adams GJ, Scott JR, Musser JM: Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and in vivo infection modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13855-13860 (2002)
- [31] Hahn H, Miksits K, Gattermann S: Streptokokken. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U (Hrsg) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 5. Auflage, Springer Verlag Heidelberg, S. 199-219 (2005 a)
- [32] Hahn H, Miksits K, Bhakdi S: Schädigung – Toxine. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U (Hrsg) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 5. Auflage, Springer Verlag Heidelberg, S. 27-31 (2005 b)
- [33] Heath A, DiRita VJ, Barg NL, Engleberg NC: A two-component regulatory system, CsrR-CsrS, represses expression of three *Streptococcus pyogenes* virulence factors, hyaluronic acid capsule, streptolysin S and pyrogenic exotoxin B. *Infect Immun* 67: 5298-5305 (1999)
- [34] Hansen SM, Uldbjerg N, Kilian M, Sorensen UB: Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J Clin Microbiol* 42:83-89 (2004)

- [35] Hensler ME, Miyamoto S, Nizet V: Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin directly impairs cardiomyocyte viability and function. *PLoS One* 3: e2446 (2008)
- [36] Hickman ME, Rench MA, Ferrieri P, Baker CJ: Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics* 104: 203-209 (1999)
- [37] Ho CM, Chi CY, Ho MW, Chen CM, Liao WC, Liu YM, Lin PC, Wang JH: Clinical characteristics of group B streptococcus bacteremia in non-pregnant adults. *J Microbiol Immunol Infect.* 39: 396-401 (2006)
- [38] Huang PY, Lee Mh, Yang CC, Leu HS: Group B streptococcal bacteremia in non-pregnant adults. *J Microbiol Immunol Infect* 39: 237-241 (2006)
- [39] Jiang SM, Cieslewicz MJ, Kasper DL, Wessels MR: Regulation of virulence by a two-component system in group B streptococcus. *J Bacteriol* 187: 1105-1113 (2005)
- [40] Jiang SM, Ishmael N, Hotopp JD, Puliti M, Tissi L, Kumar N, Cieslewicz MJ, Tettelin H, Wessels MR: Variation in the Group B Streptococcus CsrRS Regulon and effects on Pathogenicity. *J Bacteriol* 190: 1956-1965 (2008)
- [41] Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan MS, Kunst F, Glaser P, Rusniok C, Crook DW, Harding RM, Bisharat N, Spratt BG: Multilocus sequence typing system for group B streptococci. *J Clin Microbiol* 41: 2530-2536 (2003)
- [42] Kaplan A, Chung K, Kocak H, Bertolotto C, Uh A, Hobel CJ, Simmons CF, Doran K, Liu GY, Equils O: Group B streptococcus induces trophoblast death. *Microb Pathog* 45: 231-235 (2008)
- [43] Koenig JM, Keenan WJ: Group B streptococcus and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* 56: 689-708 (2009)
- [44] Kothari NJ, Mroin CA, Glennen A, Jackson D, Harper J, Schrag SJ, Lynfield R: Invasive group B streptococcal disease in the elderly, Minnesota, USA, 2003-2007. *Emerg Infect Dis* 15: 1279-1281 (2009)
- [45] Kreikemeyer B, McIver KS, Podbielski A: Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen – host interactions. *Trens Microbiol* 11: 224-232 (2003)
- [46] Lamy MC, Zouine M, Fert J, Vergassola M, Couve E, Pellegrini E, Glaser P, Kunst F, Msadek T, Trieu-Cuot P, Poyart C: CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol* 54: 1250-1268 (2004)
- [47] Lancefield R: A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 57: 571- 595 (1933)

- [48] Lembo A, Gurney MA, Burnside K, Banerjee A, de los Reyes M, Connelly JE, Lin WJ, Jewell KA, Vo A, Renken CW, Doran KS, Rajagopal L: Regulation of CovR expression in Group B streptococcus impacts blood-barrier penetration. *Mol Microbiol* 77: 431-443 (2010)
- [49] Levent F, Baker CJ, Rench MA, Edwards MS: Early outcomes of Group B streptococcal meningitis in the 21<sup>st</sup> century. *Pediatr Infect Dis J* 29: 1009-1012 (2010)
- [50] Lin FY, Weisman LE, Troendle J, Adams K: Prematurity is the major risk factor for late-onset group B streptococcus disease. *J Infect Dis* 188: 267-271 (2003)
- [51] Lin WJ, Walther D, Connelly JE et al: Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B Streptococcus response regulator CovR. *Mol Microbiol* 71: 1477-1495 (2009)
- [52] Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, Tissi L, Nizet V: Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14491-14496 (2004)
- [53] MacFarquhar J, Jones TF, Woron AM, Kainer MA, Whitney CG, Beall B, Schrag SJ, Schaffner W: Outbreak of late-onset group B Streptococcus in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* 38: 283-288 (2010)
- [54] Maisey HC, Doran KS, Nizet V: Recent advances in understanding the molecular basis of group B streptococcus virulence. *Expert Rev Mol Med* 10: e27 (2008)
- [55] Marchlewicz BA, Duncan JL: Properties of a hemolysin produced by group B streptococci. *Infect Immun* 30: 805-813 (1980)
- [56] Marchlewicz BA, Duncan JL: Lysis of erythrocytes by a hemolysin produced by a group B Streptococcus sp. *Infect Immun* 34: 787-794 (1981)
- [57] Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M: Wirkung und Wirkungsweise von Toxinen. In: Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M (Hrsg) *Medizinische Mikrobiologie Infektiologie*, 2. Auflage, Urban&Fischer München, S. 200 (2006)
- [58] Nizet V, Gibson RL, Chi EY, Framson PE, Hulse M, Rubens CE: Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun* 64: 3818-3826 (1996)
- [59] Neto MT: Group B streptococcal disease in portuguese infants younger than 90 days. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 93: 90-93 (2008)

- [60] Nocard D, Mollereau A: Sur une mamille contagieuse des vaches laitieres. *Anm Inst Pasteur Paris* 1: 109-126 (1884)
- [61] Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ; Active Bacterial Core surveillance/Emerging Infections Program Network: Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *J Am Med Assoc* 299: 2056-2065 (2008)
- [62] Platt MW: In vivo haemolytic activity of group B streptococcus is dependent on erythrocyte-bacteria contact and independent of a carrier molecule. *Curr Microbiol* 31: 5-9 (1995)
- [63] Poyart C, Pellegrini E, Marceau M, Baptista M, Jaubert F, Lamy MC, Trieu-Cuot P: Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol Microbiol* 49: 1615-1625 (2003)
- [64] Pribnow D: Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 784-788 (1975)
- [65] Pritzlaff CA, Chang JC, Kuo SP, Tamura GS, Rubens CE, Nizet V: Genetic basis for the  $\beta$ -haemolytic/ytolytic activity of group B streptococcus. *Mol Microbiol* 39: 236-247 (2001)
- [66] Puliti M, Nizet V, von Hunolstein C, Bistoni F, Mosci P, Orefici G, Tissi L: Severity of group B streptococcal arthritis is correlated with beta-hemolysin expression. *J Infect Dis* 182: 824-832 (2000)
- [67] Puopolo KM, Eichenwald EC: No change in the incidence of ampicillin-resistant, neonatal, early-onset sepsis over 18 years. *Pediatrics* 125: 1031-1038 (2010)
- [68] Quach D, van Sorge NM, Kristian SA, Bryan JD, Shelver DW, Doran KS: The CiaR response regulator in Group B *Streptococcus* promotes intracellular survival and resistance to innate immune defenses. *J Bacteriol* 191: 2023-2032 (2008)
- [69] Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A, Rubens CE: Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signaling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* 62: 941-957 (2006)
- [70] Rajagopal L: Understanding the regulation of group B streptococcal virulence factors. *Future Microbiol* 4: 201-221 (2009)

- [71] Ricci ML, Manganelli R, Berneri C, Orefici G, Pozzi G: Electrotransformation of *Streptococcus agalactiae* with plasmid DNA. *FEMS Microbiol Lett* 119: 47-52 (1994)
- [72] Ring A, Braun JS, Pohl J, Nizet V, Stremmel Wm Shenep JL: Group B streptococcal beta-hemolysin induces mortality and liver injury in experimental sepsis. *J Infect Dis* 185: 1745-1753 (2002)
- [73] Rosa-Fraile M, Rodriguez-Granger J, Cabrera J, Sampedro A, Navarro-Mari JM: Partial purification on the hemolysin-cytolysin from Group B Streptococci (GBS). Abstract book from the XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal Disease 2008, S. 223 (2008)
- [74] Rowe GE, Welch RA: Assays of haemolytic toxins. *Methods Enzymol* 235: 657-667 (1994)
- [75] Samen UM, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ: The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithel cells and the expression of virulence genes. *Infect Immun* 74: 5625-5635 (2006)
- [76] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467 (1977)
- [77] Santi I, Grifantini R, Jiang SM, Brettoni C, Grandi G, Wessels MR, Soriani M: CsrRS regulates group B *Streptococcus* virulence gene expression in response to enviromental pH: a new perspective to vaccine development. *J Bacteriol* 191: 5287-5297 (2009)
- [78] Schaller H, Gray C, Herrman K: Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage fd. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 737-741 (1975)
- [79] Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A: Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *Morb Mortl Wkly Rep* 51: 1-22 (2002)
- [80] Schuchat A: Epidemiology of Group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 11: 497-513 (1998)
- [81] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491 (1988).



- [82] Sendi P, Johansson L, Norrby-Teglund A: Invasive group B streptococcal disease in non-pregnant adults: a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. *Infection* 36: 100-111 (2008)
- [83] Skoff TH, Farley MM, Petit S, Craig S, Schaffner W, Gershman K, Harrison LH, Lynfield R, Mohle-Boetani J, Zansky S, Albanese BA, Stefonek K, Zell ER, Jackson D, Thompson T, Schrag SJ: Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clin Infect Dis* 49: 85-92 (2009)
- [84] Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL: Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J Clin Microbiol* 45: 2929-2936 (2007)
- [85] Spellerberg B, Pohl B, Haase G, Martin S, Weber-Heynemann J, Lütticken R: Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by ISS1 transposition. *J Bacteriol* 181: 3212-3219 (1999)
- [86] Spellerberg B, Martin S, Brandt C, Lütticken R: The *cyl* genes of *Streptococcus agalactiae* are involved in the production of a pigment. *FEMS Microbiol Lett* 188: 125-128 (2000)
- [87] Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Lütticken R: *rgf* encodes a novel two-component signal transduction system of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* 70: 2434-2440 (2002).
- [88] Stanley P, Koronakis V, Hughes C: Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 309-333 (1998)
- [89] Stephenson K, Hoch JA: Virulence- and antibiotic resistance-associated two-component signal transduction systems of Gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. *Pharmacol Ther* 93: 293-305 (2002)
- [90] Tapsall JW: Pigment production by Lancefield-group-B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). *J Med Microbiol* 21: 75-81 (1986)
- [91] Tettelin H, Maignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, Paulsen IT, Nelson KE, Margarit I, Read TD, Madoff LC, Wolf AM, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, DeBoy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Lewis MR, Radune D, Fedorova NB, Scanlan D, Khouri H, Mulligan S, Carty HA, Cline RT, Van Aken SE, Gill J, Scarselli M, Mora M, Iacobini ET, Brettoni C, Galli G, Mariani M, Vegni F, Maione D, Rinaudo D, Rappuoli R, Telford JL, Kasper DL, Grandi G, Fraser CM: Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an

- emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12391-12396 (2002)
- [92] Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Margarit y Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJ, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM: Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13950-13955 (2005)
- [93] Todd EW: A comparative study of streptolysins derived from human and animal infections with notes on pneumococcal haemolysin, tetanolysin and staphylococcus toxin. *J Pathol Bacteriol* 39: 299-321 (1934)
- [94] Trager JD, Martin JM, Bardbadora K, Green M, Wald ER: Probable community acquisition of group B *Streptococcus* in an infant with late-onset disease: demonstration using field inversion gel electrophoresis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 150: 766-768 (1996)
- [95] Trieu-Cuot P, Carlier C, Poyart-Salmeron C, Courvalin P: A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in Gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res* 18: 4296 (1990)
- [96] Ulett KB, Benjamin WH Jr, Zhuo F, Xiao M, Kong F, Gilbert GL, Schembri MA, Ulett GC: Diversity of group B streptococcus serotypes causing urinary tract infection in adults. *J Clin Microbiol* 47: 2055-2060 (2009)
- [97] Uden G: Regulation des Stoffwechsels und des Zellaufbaus von Bakterien. In: Fuchs G (Hrsg) *Allgemeine Mikrobiologie*, 8. Auflage, Georg Thieme Stuttgart, S. 491-523 (2007)
- [98] Van Dyke MK, Phares CR, Lynfield R, Thomas AR, Arnold KE, Craig AS, Mohle-Boetani J, Gershman K, Schaffner W, Petit S, Zansky SM, Morin CA, Spina NL, Wymore K, Harrison LH, Shutt KA, Baretta J, Bulens SN, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ: Evaluation of universal screening for group B streptococcus. *N Engl J Med* 360: 2626-2636 (2009)

- 
- [99] Vriesema AJ, Zaat SA, Dankert J: A simple procedure for isolation of cloning vectors and endogenous plasmids from viridans group streptococci and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 62: 3527-3529 (1996)
- [100] Weisner AM, Johnson AP, Lamagni TL, Arnold E, Warner M, Heath PT, Efstratiou A: Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. *Clin Infect Dis* 38: 1209-1211 (2004)
- [101] Wilkinson HW, Facklam RR, Wortham EC: Distribution by serological type of group B streptococci isolated from a variety of clinical material over a five-year period (with special reference to neonatal sepsis and meningitis). *Infect Immun* 8: 228-235 (1973)
- [102] Winn HN: Group B streptococcus infection in pregnancy. *Clin Perinatol* 34: 387-392 (2007)
- [103] Wintermeyer E, Rdest U, Ludwig B, Debes A, Hacker J: Characterization of legiolysin (lly), responsible for haemolytic activity, colour production and fluorescence of *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 5: 1135-1143 (1991)
- [104] Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW: Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17: 3469-3478 (1989)

## Anhang

### Chemikalien

Agarose	BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA
Ameisensäure 89-91 %	Merck KgaA, Darmstadt
Anaerobiersystem GasPak Plus	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Anaerotest Teststäbchen	Merck KgaA, Darmstadt
Bacto-Agar	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto-Trypton	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto-Hefeextrakt	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Biomol GmbH, Hamburg
Calciumchlorid-Dihydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Chloroform	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker Inc, Griesheim
Columbia-Agar	Oxoid GmbH, Wesel
Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix, je 2 mM)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dextranblau Stocklösung	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
Dimethylformamid (DMFA)	Merck KgaA, Darmstadt
Ethidiumbromid 1 % (w/v)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Fetales Kälerserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Glucose	Merck KgaA, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Größenstandard 1 kb-DNA-Ladder (1,0 µg/µl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HiDi Formamide	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
Isoamylalkohol (IAA)	Merck KgaA, Darmstadt
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Biomol GmbH, Hamburg
Kaliumacetat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze

Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Heptahydrat	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker Inc, Griesheim
PBS (+ CaCl <sub>2</sub> + MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Proteosepepton No.3	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Schafblut, defribiniert	Oxoid GmbH, Wesel
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Spectinomycin	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Stärke, löslich	Merck KgaA, Darmstadt
Todd-Hewitt-Broth	Oxoid GmbH, Wesel
Tris Ultrapure	USB Corporation, Cleveland, OH, USA
Tween 20	Merck KgaA, Darmstadt
X-Gal	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

### Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer	Gibco BRL Life Technologies, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Brutschrank	
• 37 °C	Heraeus Instruments, Fellbach
• 39 °C	Heraeus Instruments, Fellbach
• 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>	Heraeus Instruments, Fellbach
Digitalkamera Nikon Coolpix 995	Nikon GmbH, Düsseldorf
Elektroporationsgerät EasyjecT Plus D2000	EquiBio Limited
Fotodokumentationsanlage	Kappa opto-electronics GmbH, Gleichen
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf GmbH, Hamburg
Inkubationsschüttler Certomat R	Braun Biotech International GmbH, Mainz
Leuchtplatte Prolite basic 2174	Kaiser Fototechnik GmbH, Buchen
Netzgerät für Elektrophorese:	Gibco BRL Life Technologies, Invitrogen
Elektrophoresis Powers Supply ST 606 T	GmbH, Karlsruhe
PCR-Maschine Biometra TRIO-	Biometra GmbH, Göttingen

## Thermoblock

Photometer Ultrospec 3000

Amersham Biosciences GmbH, Freiburg

Pipetten

Gilson International B.V. Deutschland,  
Limburg-Offenheim

Rühr-und Heizplatte Heidolph MR 3002

Heidolph Instruments GmbH, Schwabach

Sequenzierer ABI PRISM 310 Genetic

Applied Biosystems GmbH, Darmstadt

Analyser

Stempelset Replica Plating Apparatus

BIO 101 Inc, Carlsbad, CA, USA

Sterilwerkbank LaminAir HBB 2448

Heraeus Instruments, Fellbach

Tiefkühlschrank:

- -20 °C
- -70 °C

Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen

Heraeus Instruments, Fellbach

UV-Schirm Bachofer IL-50-M

Bachofer GmbH, Reutlingen

Vortexer Heidolph REAX 2000

Heidolph Instruments GmbH, Schwabach

Waagen:

- Kern 470
- AG 204

Kern GmbH, Albstadt

Mettler Toledo GmbH, Giessen

Wasserbad Julabo MP-5

Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Zentrifugen:

- Biofuge fresco (Tischzentrifuge)
- Varifuge 3.OR

Heraeus Instruments, Fellbach

Heraeus Instruments, Fellbach

**Verbrauchsmaterialien**

Glasperlen 3 mm

Merck KGaA, Darmstadt

Impfnadeln

Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen

Küvetten:

- Elektroporationsküvetten 1 mm
- Einmalküvetten 1,6 ml
- Quarzglasküvette

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

VWR International GmbH, Darmstadt

Hellma GmbH, Müllheim

Messpipetten

- Glaspipetten
- Einmalpipetten

Brand GmbH, Wertheim

Sarstedt AG, Nümbrecht

Petrischalen 92 x 16 mm

Sarstedt AG, Nümbrecht

Pipettenspitzen

Sarstedt AG, Nümbrecht

Reaktionsgefäße:

- 0,5 / 1,0 / 1,5 ml
- 0,6 ml (für Sequenzierung)

Eppendorf AG, Hamburg

Biozym Scientific GmbH, Olendorf

Zellkulturflaschen (Falcon) 15 und 50ml

BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Barbara Spellerberg, für die langjährige Unterstützung und wirklich herzliche Betreuung.

Für die Einarbeitung im Labor danke ich besonders Melanie Kuhn, die mir von Grund auf alle wichtige Methoden beigebracht hat und nie um einen Rat verlegen war. Ebenfalls immer für mich ansprechbar war Simone Aymanns, mit der ich mir lange Zeit eine Laborbank geteilt habe.

Tatkräftig unterstützt haben mich außerdem meine Freundinnen Hanna und Lea; ihnen gilt ebenfalls mein besonderer Dank.



---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Nachname: Appel  
Vorname: Katharina  
Geburtsdatum: 08.09.1980  
Geburtsort: Karlsruhe  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Berufserfahrung

---

Ab 12/2010 Assistenzärztin in der Abteilung für Kardiologie, Pneumologie und Internistische Intensivmedizin, Prof. Dr. med. S. Sack  
Klinikum Schwabing, Klinikum München

07/2007 – 06/2010 Assistenzärztin in der Abteilung für Allgemeine Innere Medizin, Gastroenterologie, Hepatologie und internistische Onkologie,  
Prof. Dr. med. T. Andus  
Krankenhaus Bad Cannstatt, Klinikum Stuttgart

### Studium

---

Ab 10/1999 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm

09/2002 – 06/2003 Studium des 3. und 4. klinischen Semesters an der Université d'Angers, Frankreich im Rahmen eines ERASMUS-Stipendiums

**Ärztliche Prüfung 05/2007**

### Schulbildung

---

1989-1999 Evangelisches Heidehofgymnasium Stuttgart

**Abitur 06/1999**

---

**Dissertation**

---

ab 2004                    Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität  
Ulm  
AG Streptokokken, Prof. Dr. med. B. Spellerberg

Titel                        Regulatorische DNA-Sequenzen in der Promoterregion des  
*Streptococcus agalactiae* Hämolysin-Genclusters

Poster                     Katharina Appel, Melanie Kuhn and Barbara Spellerberg  
“Regulation of hemolysis in *Streptococcus agalactiae*”  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität  
Ulm

vorgelegt auf der 57. DGHM-Jahrestagung  
(Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V.)  
Göttingen, September 2005

München, 31.01.2011

Katharina Appel