

Validation de l'outil aequorine pour le dosage du calcium libre cytoplasmique par chimioluminescence chez *Streptococcus pneumoniae*

par Sabine Chapuy-Regaud¹, Helen E. Jones², Anthony K. Campbell² et Marie-Claude Trombe¹

¹ Laboratoire de Génétique et Physiopathologie de *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et bactéries apparentées EA 3036 CHU Rangueil, Université Paul Sabatier 31403 Toulouse, France

² Department of Medical Biochemistry, University of Wales, College of Medicine, Heath Park, Cardiff, CF14 4XN, UK

Reçu le 22 mars 2001

RÉSUMÉ

Streptococcus pneumoniae est une bactérie pathogène extracellulaire, transformable par l'ADN en solution. Il a été montré que le transport du calcium joue un rôle clé dans sa croissance végétative, la compétence pour la transformabilité génétique et la virulence expérimentale. Afin de préciser la localisation du calcium dans la bactérie, nous avons cloné l'ADN complémentaire de l'apoequorine dans le chromosome de *Streptococcus pneumoniae*. Ceci a permis la reconstitution du système aequorine *in*

vivo et les mesures par chimioluminescence de la concentration cytoplasmique en calcium libre. La concentration cytoplasmique en calcium est de 2 μM à l'équilibre et peut atteindre 14 μM après addition de calcium dans la suspension bactérienne. Cette augmentation de la concentration intracytoplasmique en calcium libre en réponse à un gradient extérieur de calcium implique un transport actif sensible au DMB et dépend de la vitesse initiale du transport de calcium.

SUMMARY Cytoplasmic free calcium measurements by chemoluminescence in *Streptococcus pneumoniae*

In the extracellular pathogen *Streptococcus pneumoniae*, transformable by soluble DNA, calcium transport is shown to play a key role for vegetative growth, development of competence for genetic transformation and experimental virulence. To get a more precise localisation of Ca^{2+} in the cell, we cloned the cDNA of apoequorine in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. This allowed the reconstitution of the aequorine system and chemo-

luminescence measurements of the cytoplasmic free calcium concentration in the bacteria. Intracellular free Ca^{2+} is 2 μM at the steady state and can reach 14 μM when calcium is added to the bacterial suspension. Increase in free Ca^{2+} in response to an imposed Ca^{2+} gradient depends on the initial velocity (V_i) of the DMB-sensitive Ca^{2+} transport, showing that changes in cytoplasmic Ca^{2+} involve active transport.

INTRODUCTION

Les données concernant le rôle du calcium chez les procaryotes sont encore rares. Elles concernent tant l'implication de Ca^{2+} dans les structures des parois et des membranes que la signalisation permettant l'adaptation des bactéries à leur environnement (pour revues Smith, 1995; Kakinuma, 1998). Les problèmes majeurs posés par ces études sont d'ordre technique, dus notamment à la taille des microorganismes qui limite la précision des approches fondées sur l'utilisation des sondes fluorescentes classiquement utilisées en biologie cellulaire. Des données récentes mettant en jeu l'utilisation de

fura-2 suggèrent une diminution du calcium cytoplasmique, liée à une phosphorylation des kinases stimulées par l'acétylhomosérine lactone, chez *Serratia liquefaciens* et chez *Vibrio fischeri*. Elles permettent de proposer que le calcium cytoplasmique puisse être un médiateur de *quorum sensing* (Werthén et Lundgren, 2001). L'un des facteurs prérequis pour la signalisation calcique est le contrôle strict de la concentration du cation libre dans le cytoplasme et le déplacement transitoire de l'équilibre en réponse à un stimulus. Son analyse impose la mesure de la concentration en cation libre dans les cellules en conditions contrôlées. Chez *Streptococcus pneumoniae*, l'utilisation de l'isotope 45 du calcium a permis de pro-

poser que la cinétique de transport du cation est impliquée dans la régulation de la compétence pour la transformation génétique (Trombe *et al.*, 1992, 1994 ; Trombe, 1993). *Streptococcus pneumoniae* requiert l'ion Ca^{2+} pour sa croissance et pour la transformabilité génétique en milieu riche au laboratoire. Le développement de la compétence, dont l'induction met en jeu un réseau de régulations par transfert de phosphate orchestré par le peptide stimulant la compétence (*Competence stimulating peptide*) ou CSP, est observé à une concentration en calcium de 1 mM. Les bactéries sont alors sensibles au dérivé de l'amiloride 2', 4'-diméthylbenzamil (DMB), inhibiteur des échanges $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Kaczorowski *et al.*, 1985). Par ailleurs le développement de la compétence se produit exclusivement dans les cultures en aérobie et implique l'activité d'une NADH oxydase ayant O_2 comme substrat (Echenique *et al.*, 2000 ; Auzat *et al.*, 1999 ; Echenique et Trombe, 2001). Les opérons *comCDE* et *comAB* sont essentiels pour le développement de la compétence (Chandler et Morrison, 1987 ; 1988 ; Pestova *et al.*, 1996 ; Cheng *et al.*, 1997). *comCDE* code le système de transduction du signal à deux composantes ComDE et le pro-activateur ComC (Pestova *et al.*, 1996 ; Cheng *et al.*, 1997). ComC est hydrolysé au niveau d'un site Gly-Gly, lors de son export par le transporteur de type ABC, ComAB (Håvarstein *et al.*, 1995). La libération dans le milieu extracellulaire de l'activateur (CSP) permet la communication intercellulaire. Il est proposé que le CSP active la kinase ComD selon un mécanisme non caractérisé (Håvarstein *et al.*, 1996).

En vue d'analyser le rôle du calcium dans la signalisation, nous avons adapté l'outil aequorine au pneumo-

coque pour pouvoir doser spécifiquement le calcium libre cytoplasmique dans les souches et les situations physiologiques d'intérêt. Le système chimiluminescent « aequorine » a été largement utilisé chez la cellule eucaryote et a permis la mesure des flux et concentrations calciques dans le cytoplasme et aussi dans différents compartiments cellulaires (Badminton *et al.*, 1995). Chez les procaryotes dont *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, des plasmides multicopies portant le gène de l'apoequorine sous contrôle d'un promoteur régulable ont été utilisés pour transformer les souches d'intérêt permettant ainsi le dosage du calcium cytoplasmique (Watkins *et al.*, 1995 ; Jones *et al.*, 1999 ; Herbaud *et al.*, 1998). Pour éviter les perturbations physiologiques consécutives à l'expression d'un plasmide à haut nombre de copies, nous avons cloné dans le chromosome de pneumocoque le gène de l'apoequorine. L'expression de ce gène en monocopie est suffisante pour permettre un dosage des flux calciques et mesurer les concentrations en calcium libre dans le cytoplasme. Les résultats obtenus confirment les conclusions découlant des études de transport effectuées en utilisant le $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches, plasmides et amorces ; milieux

Les caractéristiques des souches, plasmides et amorces utilisés dans cette étude sont présentées dans le Tableau I. Les cultures ont été réalisées dans le milieu CTM (ou complete transformation medium) décrit par Clavé et Trombe (1989) pour *Streptococcus pneumoniae*

TABLEAU I. – Souches bactériennes, plasmides et amorces utilisés dans cette étude.

Caractéristiques		Référence
SOUCHES BACTERIENNES		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
Cp1015	wild type, <i>strI</i> ; <i>hexA</i> ⁻	Morrison <i>et al.</i> , 1984
Cp2200	<i>strI</i> ; <i>hexA</i> ⁻ ; <i>dmb1</i>	Trombe <i>et al.</i> , 1993
Cp3300	<i>strI</i> ; <i>hexA</i> ⁻ ; <i>dmb2</i>	Trombe <i>et al.</i> , 1994
Cp8900	wild type, <i>strI</i> ; <i>hexA</i> ⁻ ; <i>amiC</i> : : <i>aeq</i>	ce travail
Cp8922	<i>strI</i> ; <i>hexA</i> ⁻ ; <i>dmb1</i> ; <i>amiC</i> : : <i>aeq</i>	ce travail
Cp8933	<i>strI</i> ; <i>hexA</i> ⁻ ; <i>dmb2</i> ; <i>amiC</i> : : <i>aeq</i>	ce travail
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE</i> 44 Δ <i>lac</i> U169 (φ80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Bethesda Research Laboratories, 1986
AMORCES		
AEQS1	5'- CCCATCGCTAGCTTAGGGGACAGCTCC	ce travail
AEQS2	5'- CCACACGCTAGCTAAAAAGGAGGTAATGGTCAAGCTTACATCA	ce travail
AEQ5	5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGTCAAGCTTACATCAGACTTCGAC	ce travail
AEQ57	5'- CCACACAGATCTATGGTCAAGCTTACATCAG	ce travail
Pet2	5'- CCCATCAGATCTTTAGGGGACAGCTCC	ce travail
PLASMIDES		
pR15	Dérivé de pBR325, portant un fragment interne de <i>amiC</i> , Amp ^R	Méjean <i>et al.</i> , 1981
PTSS2	Produit PCR AEQS1-AEQS2 cloné au site <i>NheI</i> de pR15	ce travail

et selon les conditions standards décrites par Sambrook *et al.* (1989) pour *Escherichia coli*. Les colonies transformées ont été respectivement sélectionnées sur méthotrexate (10^{-5} M) et ampicilline ($150 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

Clonage de l'ADN complémentaire de l'apoeaquerine

Le plasmide pR15 (Méjean *et al.*, 1981) a été extrait de la souche de *Escherichia coli* selon le protocole décrit par Sambrook *et al.* (1989), hydrolysé par l'enzyme *NheI*, déphosphorylé par la phosphatase intestinale de veau puis purifié par précipitation à l'éthanol absolu. L'ADN complémentaire de l'apoeaquerine a été amplifié grâce aux amorces AEQS1 et AEQS2 (Tableau I), hydrolysé par l'enzyme *NheI*, puis purifié par précipitation à l'éthanol absolu. Plasmide et fragment PCR hydrolysés et purifiés ont été soumis à une réaction de ligation dans un rapport de concentration 1/10 et le mélange de ligation utilisé pour transformer *Escherichia coli* DH5 α . Les colonies résistantes à l'ampicilline $150 \mu\text{g/ml}$ ont été analysées par PCR et digestion enzymatique pour vérifier le clonage de l'apoeaquerine et le sens de l'insertion. Le plasmide obtenu a été nommé pTSS2.

Construction des souches de *Streptococcus pneumoniae* portant le gène de l'apoeaquerine

L'intégration de l'ADN complémentaire de l'apoeaquerine dans le chromosome de *Streptococcus pneumoniae* a été obtenue par échange allélique au niveau de la région *ami*. Une culture de la souche d'intérêt en phase exponentielle précoce ($\text{DO}_{400\text{nm}} = 0,15$) a été activée par addition de CSP (50 ng.ml^{-1}) pendant 10 min à 37°C . L'ADN transformant pTSS2 ($0,01$ à $0,05 \mu\text{g.ml}^{-1}$) a alors été ajouté et le mélange mis à incuber 20 minutes à 20°C puis dilué au dixième et mis à incuber 2 heures à 37°C . Les colonies transformées résistantes au méthotrexate (10^{-5} M) ont été sélectionnées. La présence du gène de l'apoeaquerine a été vérifiée par PCR avec les amorces AEQ57 et Pet2. Son intégrité a été vérifiée par un test de transcription-traduction (TNT-Promega®) *in vitro* réalisé selon les indications du fournisseur, après amplification avec les amorces AEQ5 et Pet2 et reconstitution de l'aequerine par incubation avec la coelentérazine ($1 \mu\text{M}$) pendant 1 heure à $+4^\circ \text{C}$.

Reconstitution du système aequerine *in vivo*

Des cultures $\text{DO}_{400\text{nm}} = 0,2$ des souches Cp8900, Cp8922 et Cp8933 en CTM pH 7,8 sont centrifugées et reprises dans un cinquième du volume de tampon de mesure (Hepes 25 mM, NaCl 125 mM, MgCl_2 10 mM) contenant la coelentérazine à $2 \mu\text{M}$. La suspension est mise à incuber pendant 1 heure à température ambiante à l'obscurité. L'excès de coelentérazine est éliminé par centrifugation et lavage en tampon de mesure et des volumes aliquots de la suspension bactérienne ainsi traitée sont placés dans la chambre de mesure du lumino-

mètre. Les mesures de chimioluminescence sont effectuées toutes les 5 secondes pendant 155 secondes. Le système est conçu de façon à ce que l'on puisse injecter différents réactifs pendant le temps de mesure. La concentration cytoplasmique en calcium libre est calculée pour chaque point de mesure en rapportant l'émission lumineuse mesurée à la quantité totale d'aequerine reconstituée, selon la méthode établie par Jones *et al.* (1999).

RESULTATS ET DISCUSSION

Le système chimioluminescent aequerine, clonage et expression de l'apoeaquerine chez *Streptococcus pneumoniae* et dosage du calcium libre cytoplasmique.

Le système aequerine isolé de la méduse *Aequora victoria*, est composé de l'apoeaquerine, peptide de 189 acides aminés, et d'un chromogène, la coelentérazine (Charbonneau *et al.*, 1985). La fixation du calcium au niveau des sites de fixation spécifiques (Oishi *et al.*, 1992) entraîne un changement conformationnel provoquant l'oxydation du chromogène en coelentéramide avec émission d'une onde lumineuse de 470 nm. Le système peut être étalonné afin que l'intensité de la lumière émise soit directement proportionnelle à la quantité de calcium libre dans le milieu (Watkins *et al.*, 1995). La coelentérazine est une molécule hydrophobe qui diffuse selon son gradient de concentration, ce qui permet, dans une bactérie exprimant la protéine recombinante apoeaquerine, une reconstitution du système et le dosage du calcium cytoplasmique dans des conditions contrôlées. L'ADN complémentaire de l'apoeaquerine a été cloné au site *NheI* du gène *amiC* de *Streptococcus pneumoniae*. *AmiC* appartient au système de transport des oligopeptides codé par *amiABCDEF*. La perte de la fonction *Ami* se traduit par une augmentation de résistance au méthotrexate et permet donc une sélection positive des transformants (Alloing *et al.*, 1990). Pour permettre l'expression de la protéine recombinante fonctionnelle, notamment éviter la fusion *AmiC/apoeaquerine*, un amplicon, présentant en amont de la séquence codante de l'apoeaquerine un codon d'arrêt de traduction et une séquence de fixation des ribosomes (Bacot et Reeves, 1991), a été obtenu par amplification du plasmide pMMB66EH-AEQ (Watkins *et al.*, 1995) avec les amorces AEQS2 et AEQS1 (Fig. 1). La fonctionnalité de cette construction dans le plasmide pTSS2 a été vérifiée par un test de transcription traduction *in vitro* (Matériel et Méthodes). Le plasmide pTSS2 a été utilisé pour transformer une culture de la souche Cp1015 et les transformants résistants au méthotrexate ont été obtenus avec une fréquence de 0,7 %. L'échange allélique au niveau de *amiC* a été vérifié par PCR avec les oligonucléotides AEQ57 et Pet2; pour la majorité des clones, un amplicon de 600 kb a été obtenu attestant de la présence de l'insert dans *amiC* (Fig. 2). La stabilité de deux de ces



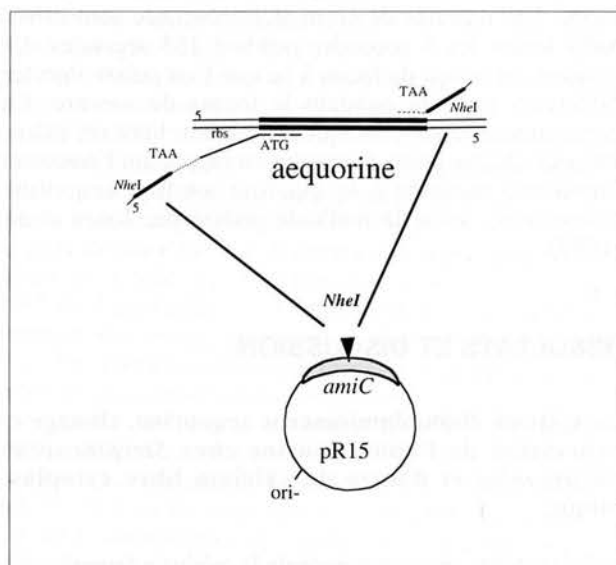


FIG. 1. – Stratégie de clonage de l'ADN complémentaire de l'apoeaequorine. Clonage au site *NheI* de *amiC*.

L'insertion de l'ADN complémentaire de l'apoeaequorine, précédé d'un codon d'arrêt de la traduction et de la séquence de fixation au ribosome spécifique de *Streptococcus pneumoniae*, dans le gène *amiC* a été obtenu *in vitro*. Le clonage a été effectué au site *NheI* de pR15 pour donner le plasmide pTSS2. (rbs : ribosome binding site, site de fixation aux ribosomes).

clones a été prouvée par sous-clonages successifs et vérification de la résistance au méthotrexate (10^{-5} M) et de la présence de l'insert après PCR. Un clone a été conservé et a donné la souche Cp8900. Nous avons vérifié que Cp8900 présente une cinétique de croissance similaire à celle de la souche sauvage.

Pour les mesures de calcium cytoplasmique, la souche Cp8900 a été cultivée en milieu CTM dans les conditions permettant le développement de la compétence et le système a été reconstitué comme indiqué dans la rubrique « matériel et méthodes ». A l'équilibre, la concentration

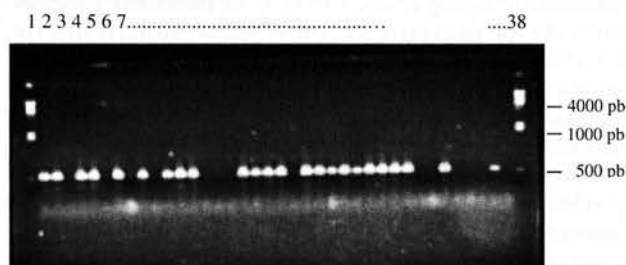


FIG. 2. – Vérification de la présence de l'insert apoeaequorine dans le chromosome des souches transformées. La souche Cp1015 a été transformée par le plasmide pTSS2 et les transformées sélectionnées sur 10^{-5} M méthotrexate. Un échantillon de culture a été utilisé pour vérifier par une réaction de PCR ciblant le gène correspondant la présence de l'ADNc de l'apoeaequorine dans ces souches. La bande observée (600pb) témoigne du maintien du gène. *pistes 1 et 38* : phage λ coupé par *HindIII*; *piste 37* : témoin négatif; *pistes 2 à 36* : différentes colonies résistantes au méthotrexate.

en calcium libre dans le cytoplasme est estimée à $2 \mu\text{M}$. L'addition de calcium (1 mM final) dans la suspension bactérienne entraîne une augmentation immédiate (en 5 secondes) et transitoire avec un pic à $14 \mu\text{M}$. Dans les 30 secondes suivant le pic, la concentration décroît pour atteindre la valeur d'équilibre (Fig. 3). Ainsi, chez le pneumocoque, le système aequorine est fonctionnel et n'interfère pas avec l'homéostasie calcique. L'addition de DMB dans la suspension bactérienne inhibe l'influx de calcium en réponse au gradient électrochimique du cation. L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique met en jeu une fonction sensible au DMB. Il est vraisemblable qu'elle corresponde à la fonction permettant l'échange $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sensible au DMB définie chez *Streptococcus pneumoniae* (Trombe, 1993 ; Trombe *et al.*, 1994).

Applications à l'estimation de la vitesse initiale d'influx

Afin de tester la potentialité de cet outil, nous avons envisagé l'estimation des vitesses initiales d'influx. Les souches mutantes Cp2200 et Cp3300 présentent des cinétiques de transport du calcium altérées (Tableau IIA) (Trombe, 2000). L'ADN complémentaire de l'apoeaequorine a été introduit dans ces souches selon la méthode décrite pour la souche sauvage et sa fonctionnalité et sa stabilité ont été validées. Les mesures des variations de la concentration calcique dans les souches Cp8922 et

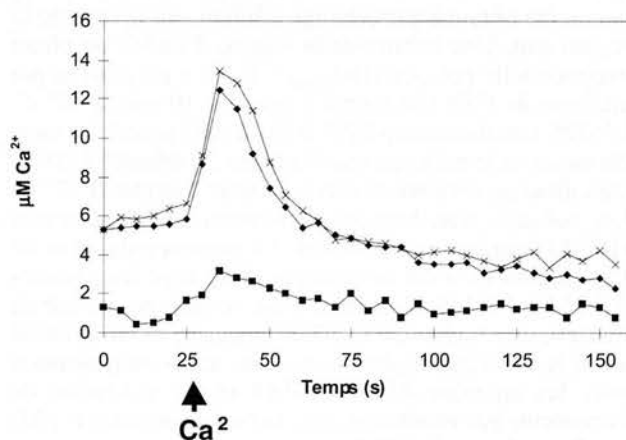


FIG. 3. – Mesure du calcium libre intracytoplasmique et des variations de sa concentration en réponse à l'addition de calcium (1 mM).

Les cultures en CTM à $\text{DO}_{400\text{nm}} = 0,2$ ont été centrifugées, reprises en tampon de mesure et reconstituées avec la coelentératine $2 \mu\text{M}$ (Matériel et Méthodes), avec ou sans EGTA $50 \mu\text{M}$. L'injection de $10 \mu\text{l}$ d'une solution de calcium 100 mM a été réalisée 25 secondes après le début de la mesure et l'émission lumineuse enregistrée ; la concentration cytoplasmique a été calculée comme indiqué dans la rubrique matériel et méthodes. Lorsqu'indiqué, la suspension bactérienne est mise à incuber en présence de DMB $30 \mu\text{M}$, puis soumise à l'analyse par chimioluminescence. (♦ : bactéries reconstituées sans EGTA ; ■ : bactéries reconstituées en présence d'EGTA $50 \mu\text{M}$; x : bactéries reconstituées sans EGTA puis traitées par le DMB).

TABLEAU II. – Comparaison des valeurs des vitesses initiales d'influx et des variations de la concentration cytoplasmique en calcium libre en réponse au gradient de calcium et mesurées par chimioluminescence chez différentes souches.

A		B	
Vi (15s)		ΔCa_i (5s)	
nmol.min ⁻¹ .(mg de protéines) ⁻¹		μM	
Trombe, 2000		ce travail	
Cp1015	10	Cp8900	2,75
Cp2200	6	Cp8922	1,60
Cp3300	27	Cp8933	5,45

La détermination de ΔCa_i (5s) a été effectuée sur 2 expériences indépendantes.

Cp8933 correspondantes ont été effectuées après reconstitution de l'aequorine par incubation des bactéries en présence de coelentérazine. L'augmentation de la concentration en calcium libre cytoplasmique en 5 secondes mesurée par chimioluminescence corrobore les mesures de V_{15s} déterminées par utilisation de l'isotope $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et permet de valider le système aequorine pour l'estimation des vitesses initiales apparentes d'entrée de calcium (Tableau IIB).

En conclusion, le dosage de calcium cytoplasmique libre chez le pneumocoque a été réalisé par chimioluminescence grâce au système aequorine. L'expression de l'apoequorine clonée en monocopie dans le chromosome s'est avérée suffisante pour ces mesures. A l'équilibre la concentration cytoplasmique est de $2 \mu\text{M}$. L'utilisation de mutants présentant des différences au niveau de leur cinétique de transport du calcium a permis de montrer que ce système permet aussi une étude cinétique et la mesure de la V_{5s} . L'ensemble de ces résultats conforte les conclusions obtenues lors d'études cinétiques utilisant l'isotope 45 du calcium (Trombe 1993 ; Trombe *et al.*, 1994). Ils montrent que l'outil aequorine est adapté à une analyse des flux calciques dans des conditions physiologiques.

Remerciements. – Ce travail a été financé par le Wellcome Trust et l'Université Paul Sabatier.

Les auteurs remercient Delphine Dos Santos pour son aide technique.

BIBLIOGRAPHIE

- Alloing G., Trombe M.-C., Claverys J.-P., The *ami* locus of the gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* is similar to binding protein-dependent transport operons of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.*, 1990, 4, 633-644.
- Auzat I., Chapuy-Regaud S., Dos Santos D., Le Thomas I., Le Bras G., Onnuyighy D., Garel J.-R., Paton J., Trombe M.-C., The NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae*, its involvement in competence and virulence, *Mol. Microbiol.*, 1999, 34, 1018-1028.
- Bacot C.-M., Reeves R.-H., Novel tRNA gene organization in the 16S-23S intergenic spacer of the *Streptococcus pneumoniae* rRNA gene cluster. *J. Bacteriol.*, 1991, 173, 4234-4236.
- Badminton M.-N., Sala-Newby G.-B., Kendall J.-M., Campbell A.-K., Differences in stability of recombinant apoaequorin within subcellular compartments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, 217, 950-957.
- Chandler M.-S., Morrison D.-A., Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: molecular cloning of *com*, a competence control locus. *J. Bacteriol.*, 1987, 169, 2005-2011.
- Chandler M.-S., Morrison D.-A., Identification of two proteins encoded by *com*, a competence control locus of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 1988, 170, 3136-3141.
- Charbonneau H., Walsh K.-A., McCann R.-O., Prendergast F.-G., Cormier M.-J., Vanaman T.-C., Amino acid sequence of the calcium-dependent photoprotein aequorin. *Biochemistry*, 1985, 24, 6762-6771.
- Cheng Q., Campbell E.-A., Naughton A.-M., Johnson S., Masure H.-R., The *com* locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 1997, 23, 683-692.
- Clavé C., Trombe M.-C., DNA uptake in competent *Streptococcus pneumoniae* requires ATP and is regulated by cytoplasmic pH. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 1989, 53, 113-118.
- Echenique J.-R., Chapuy-Regaud S., Trombe M.-C., Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of *ciaRH* and *comCDE*. *Mol. Microbiol.*, 2000, 36, 688-696.
- Echenique J., Trombe M.-C., Competence modulation by the NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae* involves signal transduction. *J. Bacteriol.*, 2001, 183, 768-772.
- Håvarstein L.-S., Diep D.-B. and Nes I.-F., A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.*, 1995, 16, 229-240.
- Håvarstein L.-S., Gaustad P., Nes I.-F., Morrison D.-A., Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Mol. Microbiol.*, 1996, 21, 863-869.
- Herbaud M.-L., Guiseppi A., Denizot F., Haiech J., Kilhoffer M.-C., Calcium signalling in *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1448, 212-26.
- Jones H.-E., Holland I.-B., Baker H.-L., Campbell A.-K., Slow changes in cytosolic free Ca^{2+} in *Escherichia coli* highlight two putative influx mechanisms in response to changes in extracellular calcium. *Cell Calcium*, 1999, 25, 265-274.
- Kaczorowski G.-J., Barros F., Dethmers J.-K., Trumble M.-J., Cragoe E.-J., Inhibition of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange in pituitary plasma membrane vesicles by analogues of amiloride. *Biochemistry*, 1985, 24, 1394-1403.
- Kakinuma Y., Inorganic cation transport and energy transduction in *Enterococcus hirae* and other streptococci. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, 62, 1021-1045.
- Mejean V., Claverys J.-P., Vasseghi H., Sicard A.-M., Rapid cloning of specific DNA fragments of *Streptococcus pneumoniae* by vector integration into the chromosome followed by endonucleolytic excision. *Gene*, 1981, 15, 289-293.
- Morrison D.-A., Trombe M.-C., Hayden M.-K., Waszak G.-A., Chen J.-D., Isolation of transformation-deficient *Streptococcus pneumoniae* mutants defective in control of competence using insertion-duplication mutagenesis with the erythromycin resistance determinant of pAM beta 1. *J. Bacteriol.*, 1984, 159, 870-876.
- Oishi O., Nagatomo A., Kohzuma T., Oda N., Miyazima T., Ohno M., Sakaki Y., Validity of putative calcium binding loops of photoprotein aequorin. *FEBS Lett.*, 1992, 307, 272-274.
- Pestova E.-V., Havarstein L.-S., Morrison D.-A., Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus*

- pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system., *Mol. Microbiol.*, 1996, 21, 853-852.
- Sambrook J., Fritsch E.-F., Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 1989, second edition. (N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Smith R.-J., Calcium and bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, 1995, 37, 83-133.
- Trombe M.-C., Calcium signaling in *Streptococcus pneumoniae* : implication of the kinetics of calcium transport. In *Streptococcus pneumoniae*, 2000, Mary Ann Liebert, Inc, pp. 287-292.
- Trombe M.-C., Characterization of a calcium porter of *Streptococcus pneumoniae* involved in calcium regulation of growth and competence. *J. Gen. Microbiol.*, 1993, 139, 433-439.
- Trombe M.-C., Clave C., Manias, J.-M., Calcium regulation of growth and differentiation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.*, 1992, 138, 77-84.
- Trombe M.-C., Rieux V., Baille F., Mutations which alter the kinetics of calcium transport alter the regulation of competence in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 1994, 176, 1992-1996.
- Watkins N.-J., Knight M.-R., Trewavas A.-J., Campbell A.-K., Free calcium transients in chemotactic and non-chemotactic strains of *Escherichia coli* determined by using recombinant aequorin. *Biochem. J.*, 1995, 306, 865-869.
- Werthén M., Lundgren T., Intracellular Ca^{2+} mobilization and kinase activity during AHL-dependent quorum sensing in *Serratia liquefaciens*. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 6468-6472.
-