

**Charakterisierung neuer Zielstrukturen für die  
Antibiotikatherapie gegen *Staphylococcus aureus*  
und Entwicklung eines konditionalen In-vivo-  
Expressionssystems**

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

**Karin Streker**

aus Stuttgart

Würzburg 2005

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Jörg Hacker

2. Gutachter: PD Dr. Michael Kuhn

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Januar 2005

Karin Streker

## **Vielen Dank !**

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. mult. J. Hacker danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für sein stetes Interesse am Fortgang und Erfolg meiner Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Knut Ohlsen, der stets Zeit fand meine Fragen zu beantworten und neue Ideen zu diskutieren und mir bei der täglichen Arbeit im Labor viel Freiheit ließ.

Bei Herrn Professor Dr. H. Labischinski und Dr. C. Freiberg vom Pharmaforschungszentrum der Bayer AG in Wuppertal möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere für die interessante Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Zielgene. Danke auch für das Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für die zahlreichen Zusammentreffen und Diskussionen. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. H. Brötz-Oesterhelt und Herrn Dr. C. Ladel für die Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Tierexperimente.

Weiterhin danke ich PD Dr. Michael Kuhn, Kompetenzzentrum PathoGenoMik der Universität Würzburg, für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Nicht zu vergessen sind die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts, die stets hilfsbereit waren und für ein sehr gutes Arbeitsklima sorgten. Insbesondere möchte ich mich bei Antje Michel bedanken, die mir mit allerlei praktischen Tipps im Labor und am Computer zur Seite stand und für zahlreiche Diskussionen im und außerhalb des Labors.

Mein Dank gilt auch Uschi Wallner, die mich bei den Klonierungsarbeiten unterstützt hat. Auch bei Hennes Kränzler möchte ich mich für praktische Tipps zur Durchführung von Microarrays bedanken sowie bei Heike Bruhn und Klaus Heuner für zahlreiche Ratschläge bei der Charakterisierung des Enzyms NfrA und bei Primer Extension Experimenten.

Ein herzliches Dankeschön auch an meine Eltern, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben und mir immer den nötigen Rückhalt gaben. Auch bei meiner Schwester Petra, ihrem Mann Daniel und ganz besonders bei Peter möchte ich mich für das Interesse und den Zuspruch im Verlauf meiner Arbeit bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Summary</b>	<b>3</b>
<b>2. Einleitung:</b>	<b>5</b>
2.1 Infektionen durch <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.2 Resistenzentwicklung in <i>S. aureus</i>	5
2.3 Entwicklungen neuer Antibiotika	7
2.4 Die Oxidoreduktase NfrA	9
2.5 Ser/Thr-Kinasen in Bakterien	11
2.6 Die DNA-Polymerase I	13
2.7 Die Topoisomerase III	14
2.8 Die Isopren-Biosynthese	16
2.9 Der Transkriptionsfaktor NusG	19
2.10 Holliday Junction Endonukleasen	20
2.11 Nukleotidbindeproteine	21
2.12 Konditionale Mutanten	21
2.12.1 Die DNA-Ligase ( <i>ligA</i> )	22
2.12.2 Die $\alpha$ -Kette der DNA-Polymerase III ( <i>dnaE</i> )	23
2.13 Zielsetzung dieser Arbeit	24
<b>3. Material</b>	<b>25</b>
3.1 Geräte	25
3.2 Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Enzyme	26
3.3 Antibiotika	26
3.4 Medien und Agarplatten	27
3.5 Puffer und Lösungen	28
3.6 Bakterienstämme	28

3.7 Oligonukleotide	29
3.8 Plasmide	34
<b>4. Methoden</b>	<b>38</b>
4.1 Isolierung von Plasmid-DNA	38
4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
4.1.2 Plasmid-Isolierung aus <i>S. aureus</i>	38
4.2 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. aureus</i>	39
4.3 Konzentrations-Bestimmung von DNA	40
4.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)	40
4.5 Horizontale Gelelektrophorese	41
4.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	42
4.7 Aufreinigung von PCR Fragmenten	42
4.8 Sequenzierung von DNA	42
4.9 Restriktion von DNA	43
4.10 Southern-Hybridisierung	43
4.10.1 Gelelektrophorese	43
4.10.2 Kapillarblot	43
4.11 Klonierung von PCR Produkten: pGEM-T Vektor System	44
4.12 Ligation von Restriktionsfragmenten	44
4.13 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	45
4.14 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i>	45
4.14.1 Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	45
4.14.2 Herstellung elektrokompetenter <i>S. aureus</i> -Zellen	45
4.14.3 Transformation von CaCl <sub>2</sub> -kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	46
4.14.4 Transformation elektrokompetenter Staphylokokken	46
4.14.5 Entsalzen von Plasmiden für die Elektroporation	46
4.15 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	47
4.16 Sensitivitätstest gegenüber Wasserstoffperoxid	47
4.17 Transduktion	47
4.17.1 Herstellung des Phagenlysats	48
4.17.2 Transduktion des Empfängers	48

4.18 Arbeiten mit RNA	49
4.18.1 Isolierung von RNA	49
4.18.2 DNase-Verdau der RNA	49
4.18.3 Aufreinigung der RNA	50
4.18.4 Konzentrations-Bestimmung von RNA	50
4.18.5 Reverse Transkription	50
4.18.6 Primer Extension Assay	51
4.18.7 Relative Quantifizierung der Gen-Expression mit Hilfe der Real-Time PCR	52
4.18.8 Expressionsanalyse mit Hilfe von Microarrays	54
4.18.8.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese	54
4.18.8.2 Überprüfung der Qualität der Sonden	55
4.18.8.3. Hybridisierung	55
4.18.8.4 Waschen des Microarrays	56
4.18.8.5 Auswertung der Microarrays	57
4.18.9 Northern-Hybridisierung	57
4.18.9.1 RNA-Gelelektrophorese	57
4.18.9.2 Northern Blot	58
4.18.9.3 Markierung von Sonden mit dem ECL-System	58
4.18.9.4 Hybridisierung, Waschen und Entwicklung des Blots	58
4.19 Klonierung und Aufreinigung des NfrA-Proteins	59
4.19.1 Beschreibung des Systems pCRT7/TOPO zur Proteinexpression	59
4.19.2 Expression des Proteins zu verschiedenen Zeiten nach Induktion	60
4.19.3 Isolierung und Aufreinigung des rekombinanten Proteins	60
4.19.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	62
4.19.4.1 Herstellung eines Polyacrylamidgels	62
4.19.4.2 Elektrophorese-Lauf	63
4.19.4.3 Anfärben des Gels	63
4.19.5 Dialyse des Proteins NfrA	63
4.19.6 Messung der enzymatischen Aktivität von NfrA und $K_M$ -Wert Bestimmung	64
4.20 Erstellung einer Wachstumskurve	66
4.21 Klonierungsstrategien	66
4.21.1 Herstellung von Deletionsmutanten	66
4.21.2 Herstellung konditional letaler Mutanten mit Hilfe des Vektors pBT2- <i>xyIR</i>	67
4.21.3 Herstellung konditional letaler Mutanten mit Hilfe des pMUTIN4/Pspac-System	68
4.21.4 Herstellung konditional letaler Mutanten mit Hilfe von Antisense-RNA	69
4.21.5 Herstellung konditional letaler Mutanten mit dem pLL30/Pspac/pMJ8426-System	69
4. 22 Verwendete Computerprogramme und Websites	70

<b>5. Ergebnisse</b>	<b>72</b>
5.1 Herstellung und Charakterisierung von Deletionsmutanten	72
5.1.1 Untersuchungen zu <i>nfrA</i> (SA0367)	72
5.1.1.1 Deletion von <i>nfrA</i> ( <i>ywcG</i> )	72
5.1.1.2 Charakterisierung der <i>nfrA</i> -Deletionsmutante	75
5.1.1.3. Expression von <i>nfrA</i> im Verlauf der Wachstumskurve	77
5.1.1.4 Stress-vermittelte Induktion der Expression von <i>nfrA</i>	79
5.1.1.5 Rolle von SigB bei der Stress-vermittelten Induktion von <i>nfrA</i>	83
5.1.1.6 Untersuchung der Promotor-Struktur von <i>nfrA</i>	85
5.1.1.7 Biochemische Charakterisierung des NfrA-Proteins	86
5.1.1.7.1 Überexpression und Aufreinigung von NfrA	86
5.1.1.7.2 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von NfrA	87
5.1.1.8. Chromosomale Lokalisation des <i>nfrA</i> -Gens	90
5.1.2 Untersuchungen zu <i>pknB</i> (SA1063)	91
5.1.2.1 Deletion von <i>pknB</i> (Ser/Thr-Kinase)	91
5.1.2.2 Chromosomale Lokalisation des <i>pknB</i> (SA1063)-Gens	92
5.1.2.3 Charakterisierung der <i>pknB</i> -Deletionsmutante	94
5.1.3 Untersuchung zu <i>polA</i>	99
5.1.3.1 Deletion von <i>polA</i>	99
5.1.3.2 Charakterisierung der $\Delta$ <i>polA</i> -Mutante	101
5.1.4 Untersuchungen zur Topoisomerase TopoIII	101
5.1.4.1 Deletion von <i>topB</i>	101
5.1.4.2 Charakterisierung der <i>topB</i> -Deletionsmutante	103
5.1.5 Untersuchungen zu SA0241, SA0245 und SA0453	104
5.1.5.1 Deletion von SA0241 und SA0245	104
5.1.5.2 Charakterisierung der <i>ygbP1</i> (SA0241)-Deletionsmutante	105
5.1.6 Untersuchungen zu SA0453	106
5.1.6.1 Deletion von SA0453	106
5.1.6.2 Charakterisierung der <i>yehB</i> (SA0453)-Deletionsmutante	108
5.1.7 Deletion von SA1857	108
5.1.8 Deletion von SA1444	108
5.1.9 Deletion von <i>nusG</i>	109
5.1.10 Deletionsmutanten im Sepsismodell	109
5.1.11 Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 5.1	110
5.2 Herstellung konditional letaler Mutanten	112
5.2.1 Xylose-Regulon	112
5.2.1.1 Fusion des Xylose-Regulons mit <i>nusG</i>	113
5.2.1.2 Charakterisierung der konditionalen Mutante <i>S. aureus</i> 8325 P <sub>xyl</sub> - <i>nusG</i>	115
5.2.1.3 Fusion von <i>dnaE</i> mit dem Xylose-Regulon	116

5.2.2 pMUTIN4/Pspac	117
5.2.3 Antisense-RNA	119
5.2.4 pLL30/Pspac/pMJ8426	121
5.2.4.1 Mutation von <i>ligA</i> mit dem Plasmid pLL30	122
5.2.4.1.1 Repression der Expression von <i>ligA</i> durch das Plasmid pMJ8426	125
5.2.4.1.2 Untersuchung der konditionalen Pspac- <i>ligA</i> -Mutante im Tierversuch	128
5.2.4.2 Konditionale Mutation Pspac- <i>ygbP2</i> mit pLL30 und pMJ8426	131
5.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 5.2	134
<b>6. Diskussion</b>	<b>135</b>
6.1 Deletionsmutanten	135
6.1.1 Charakterisierung der Oxidoreduktase NfrA	135
6.1.2 Charakterisierung der Ser/Thr-Kinase PknB (SA1063)	140
6.1.3 Untersuchungen zur DNA-Polymerase I	146
6.1.4 Deletion der Topoisomerase TopoIII (TopB)	147
6.1.5 Homologe Gene des DXP-Weges zur Isopren-Biosynthese	149
6.1.6 Deletion und konditionale Expression von <i>nusG</i>	153
6.1.7 Deletion von SA1444	155
6.1.8 Deletion von SA1857	155
6.2 Konditionale Expressionssysteme in <i>S. aureus</i>	155
6.2.1 Das Xylose-regulierte Expressionssystem	155
6.2.2 Kontrollierte Synthese von Antisense-RNA durch das Xylose-Regulon	157
6.2.3 pMUTIN/Pspac	158
6.2.4 pLL30/ Pspac/pMJ8426-Expressionssystem	159
6.2.5 Die konditionale Mutanten Pspac- <i>ligA</i> und Pspac- <i>ygbP2</i>	160
6.2.6 Die konditionale Pspac- <i>ligA</i> -Mutante im Tierversuch	161
6.2.7 Übersicht über die verwendeten Systeme zur konditionalen Gen-Expression	162
6.3 Ausblick	163
<b>7. Literatur</b>	<b>164</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>179</b>
8.1 Abkürzungsverzeichnis	179
8.2 Publikationen und Präsentationen	181
8.3 Lebenslauf	182

## 1.1 Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* ist ein bedeutender opportunistischer Krankheitserreger, der eine Vielzahl von Infektionen im Menschen hervorrufen kann. Das Krankheitsbild reicht von leichten Hautinfektionen bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen wie Endokardiden, Sepsis oder Pneumonien. Zu Komplikationen kann es vor allem bei nosokomialen Infektionen mit *S. aureus* in immungeschwächten Patienten kommen. In Krankenhäusern haben sich Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme (MRSA) etabliert, die meist zahlreiche weitere Resistenzen erworben haben. Als wirksames Antibiotikum kann oft nur noch Vancomycin, Synercid oder Linezolid zur Therapie eingesetzt werden. In jüngster Zeit treten jedoch auch MRSA Isolate mit mittlerer bis hoher Vancomycin-Resistenz auf und auch Synercid- und Linezolid-resistente Stämme wurden beschrieben. Die Resistenzentwicklung in *S. aureus* ist alarmierend und macht deutlich, dass die Entwicklung neuer Antibiotika dringend erforderlich ist.

Bislang inhibieren antibakterielle Substanzen in erster Linie die Zellwandsynthese, den DNA- und RNA-Stoffwechsel sowie die Proteinsynthese. In dieser Arbeit wurde ein erster Versuch unternommen, neue Zielstrukturen für die Antibiotika-Therapie in *S. aureus* zu finden. Insgesamt wurden 10 Gene untersucht, die Funktion von 7 dieser Gene war in *S. aureus* unbekannt. Zunächst sollte herausgefunden werden, ob diese 10 Zielgene: *topB*, *polA*, *nusG*, SA1857, SA1444, SA1063, SA0453, SA0241, SA0245, SA0367, für *S. aureus* essentiell sind. Es wurde versucht, jedes dieser Gene in *S. aureus* zu deletieren. Außer den Genen SA1444, SA0245 und *nusG* konnten alle Zielgene deletiert werden und waren daher für *S. aureus* nicht essentiell. Die Deletionsmutanten  $\Delta topB$ ,  $\Delta polA$ ,  $\Delta SA1857$ ,  $\Delta SA1063$ ,  $\Delta SA0453$ ,  $\Delta SA0241$ ,  $\Delta SA0367$  wurden außerdem in einem Sepsismodell in Mäusen untersucht und waren nicht attenuiert. Gene, die weder in vitro noch in vivo essentiell sind, sind nur von geringem Interesse für die Entwicklung neuer Antibiotika.

Zur Untersuchung essentieller Gene in *S. aureus* wurden vier verschiedene konditionale Expressionssysteme untersucht. Bei drei dieser Systeme wurde der wildtypische Promotor gegen einen regulierbaren Promotor ausgetauscht. Bei einem weiteren System handelte es sich um einen Antisense-RNA-Ansatz. Zur Überprüfung der konditionalen Expressionssysteme („proof-of-principle“) wurden die bekannten essentiellen Gene *ligA* und *dnaE* in *S. aureus* mutiert. Eines dieser konditionalen Expressionssysteme, das pLL30/Pspac/pMJ8426-System, konnte erfolgreich in *S. aureus* angewandt werden. Die konditionale Expression von *ligA* und von SA0245 wurde mit diesem System erzielt. Der Temperatur-sensitive Shuttle-Vektor pLL30 dieses konditionalen Expressionssystems enthält eine Insertionskassette, die das Antibiotikaresistenzgen *cat* (Chloramphenicol-

Acetyltransferase) sowie den regulierbaren Promotor Pspac enthält. Ein wesentliches Merkmal des pLL30/Pspac/pMJ8426-Systems ist die stabile Integration des Resistenzmarkers *cat* und des Pspac-Promotors durch ein doppeltes Crossover Ereignis vor dem Zielgen. Der Temperatur-sensitive Shuttle-Vektor pLL30 kann anschließend durch mehrfaches Subkultivieren der Bakterien bei nicht permissiver Temperatur eliminiert werden. Der Repressor LacI wird auf einem Extra-Plasmid pMJ8426 kodiert und wird nach erfolgter Integration des Pspac-Promotors vor dem Zielgen in die Bakterien transformiert. Mehrere Kopien des Repressorplasmids ermöglichen eine gute Repression an Pspac. Durch die Zugabe des Induktors IPTG kann der Repressor LacI inaktiviert und die Gen-Expression induziert werden. Insbesondere konnte dieses konditionale Expressionssystem erfolgreich im Tiermodell angewandt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die genetische und funktionelle Charakterisierung von SA0367. Durch biochemische Untersuchungen wurde gezeigt, dass dieses Gen für eine FMN-enthaltende Oxidoreduktase codiert. Auf Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Funktion des Proteins wurde das Gen SA0367, in Analogie zum orthologen Gen *nfrA* aus *B. subtilis*, in *nfrA* umbenannt. Die Oxidoreduktase NfrA oxidiert NADPH in Gegenwart von FMN. In Gegenwart von NADPH und FMN zeigt das Enzym NfrA außerdem Nitroreduktase- und eine leichte Disulfidreduktase-Aktivität. Induktionsexperimente im Wildtyp zeigten, dass *nfrA* durch oxidativen Stress, verursacht von Diamide oder Nitrofurantoin, und durch Ethanol induziert wird. Ethanol und oxidativer Stress führt zu Denaturierung von Proteinen. NfrA könnte an der Reparatur geschädigter Proteine beteiligt sein. Die Induktion von *nfrA* in *S. aureus* erfolgt unabhängig vom alternativen Sigmafaktor SigB. Durch Primer Extension-Experimente wurde eine putative PerR-Box vor dem *nfrA*-Gen identifiziert. Diese könnte für die Regulation von *nfrA* wichtig sein. Außerdem wird *nfrA* während des gesamten Wachstumszyklus von einem SigA-abhängigen Promotor exprimiert. Die Deletionsmutante  $\Delta nfrA$  zeigt nur in Gegenwart hoher Ethanolkonzentrationen von 6,5 % einen leichten Wachstumsnachteil im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem weist die  $\Delta nfrA$ -Mutante eine höhere Resistenz gegenüber Nitrofurantoin auf.

In weiteren Untersuchungen wurde begonnen die Funktion der Ser/Thr-Kinase SA1063 durch Microarray-Experimente aufzuklären. Hierbei wurde deutlich, dass dieses Gen eine regulatorische Rolle bei der Zellwandsynthese in *S. aureus* spielen könnte.

## 1.2 Summary

*Staphylococcus aureus* is an important opportunistic pathogen that can cause a diverse range of diseases in humans. The outcome of an infection can range from mild skin infections to life-threatening infections, like endocarditis, bacteraemia and pneumonia. Currently, methicillin-resistant *S. aureus* strains (MRSA) that have acquired numerous additional resistances towards several antibiotics have established in the hospital-setting. Therefore, the treatment of hospital-acquired infections with *S. aureus* in many patients is increasingly complicated. The last effective antibiotics to treat infections with multi-resistant MRSA are vancomycin, synergid, and linezolid. However, MRSA isolates with intermediate and high resistance towards vancomycin have been described recently, as well as synergid- and linezolid-resistant strains. The emergence and spreading of multi-resistant *S. aureus* is alarming and emphasizes the need to develop new antibiotics.

So far, antimicrobial substances inhibit primarily the synthesis of the cell wall, DNA- and RNA as well as the synthesis of proteins. In this work, alternative targets for antibiotic-therapy in *S. aureus* were investigated. Consequently, altogether ten different genes were analysed, seven of these genes were of unknown function in *S. aureus*. The ten target genes chosen were: *topB*, *polA*, *nusG*, SA1857, SA1444, SA1063, SA0453, SA0241, SA0245 and SA0367. First, it should be discovered whether or not these target genes are essential for bacterial survival. Therefore, deletion strains of each of these genes were constructed in *S. aureus*. All of these genes, except of SA1444, SA0245 and *nusG*, could be deleted, and were thus non-essential in *S. aureus*. The deletion strains  $\Delta topB$ ,  $\Delta polA$ ,  $\Delta SA1857$ ,  $\Delta SA1063$ ,  $\Delta SA0453$ , SA0241,  $\Delta SA0367$  were analysed in a sepsis model of infection in mice. These experiments turned out that none of those strains were attenuated in this model which suggests that the factors investigated are neither in vitro nor in vivo essential for bacterial survival and virulence. Therefore, the potential of these determinants to serve as a target for the development of new antibiotics is rather low.

To examine essential genes in *S. aureus*, four different conditional expression systems were analysed. In three of these systems the promoter of the wildtype gene was exchanged by an experimentally controllable promoter. Another approach involved antisense-RNA to counteract the transcription of the target genes. To verify that the conditional expression systems are functional in *S. aureus* ("proof-of-principle"), we first mutated two known essential genes, namely *ligA* and *dnaE*. One of these conditional expression systems, the pLL30/Pspac/pMJ8426-System could be applied successfully in *S. aureus*. Conditional mutants of *ligA* and SA0245 were obtained with this system. The temperature-sensitive shuttle-vector pLL30 of this expression system contains a DNA cassette for insertion in front of the target gene. This insertion-cassette encodes the resistance marker *cat*

(chloramphenicol-acetyltransferase) as well as the Pspac promoter. One important feature of the pLL30/Pspac/pMJ8426-system is the stable integration of the resistance gene *cat* and the Pspac promoter in front of the target gene by a double crossover event. Following the integration of the *cat*-Pspac-cassette the temperature-sensitive vector can be eliminated by successive sub-culturing of the bacteria at non-permissive temperature. The repressor LacI is encoded on the Plasmid pMJ8426 which is transformed into the bacteria after integration of the *cat*-Pspac-cassette in front of the target gene. Several copies of the repressor-plasmid pMJ8426 give rise to high amounts of the repressor LacI and should allow tight repression of the target gene. By addition of the inducer IPTG the repressor LacI is inactivated and gene expression is induced. This conditional expression system was also successfully applied in an animal model of infection. Thus, a validated in vivo expression system is now applicable for the investigation of putative target genes in vivo.

Furthermore, in the present work SA0367 was genetically and functionally characterized. Biochemical assays of the gene product revealed that it encodes a FMN-containing oxidoreductase. Based on the findings of this work about the function of the protein, the gene SA0367 was named *nfrA*, in analogy to the orthologous gene *nfrA* from *B. subtilis*. The oxidoreductase NfrA oxidizes NADPH in the presence of FMN. In addition, the enzyme NfrA showed nitroreductase-activity and a minor disulfidreductase-activity in the presence of FMN and NADPH. Induction experiments in the wildtype showed that *nfrA* is induced by oxidative stress caused by diamide or nitrofurantoin and by ethanol. Ethanol and oxidative stress cause denaturation of proteins. Therefore, NfrA could be involved in the repair of damaged proteins. The induction of *nfrA* is independent of the alternative sigma-factor SigB. Primer-extension experiments revealed a putative PerR-Box in front of the *nfrA*-gene. This PerR-Box could be important for the regulation of the expression of *nfrA*. Moreover, *nfrA* is transcribed throughout the whole life cycle of *S. aureus* from a SigA-dependent promoter. Growth of the deletion strain  $\Delta nfrA$  was slightly reduced in the presence of 6,5 % ethanol as compared to the wildtype. The  $\Delta nfrA$ -mutant also shows a higher resistance towards nitrofurantoin.

In addition, the function of the Ser/Thr-kinase SA1063 was investigated by DNA-microarray-experiments. Several genes were differentially regulated when comparing transcription of the wildtype and its isogenic  $\Delta SA1063$ -mutant. The results of these experiments implicate a regulatory role of that SA1063 in the cell wall synthesis in *S. aureus*.

## **2. Einleitung:**

### **2.1 Infektionen durch *Staphylococcus aureus***

Staphylokokken sind gram-positive, fakultativ-anaerobe, unbewegliche, sporenlose Kokken. *Staphylococcus aureus* ist ein weit verbreiteter opportunistischer Krankheitserreger und normaler Bestandteil der Haut- und Schleimhautflora gesunder Individuen. Gleichzeitig verfügen Staphylokokken über ein breites Spektrum an Virulenzfaktoren, die ihnen ermöglichen unter günstigen Umständen Infektionen hervorzurufen. Das Krankheitsbild, das durch eine Infektion mit *S. aureus* hervorgerufen wird, reicht von leichten, lokal begrenzten Hautinfektionen bis hin zu systemischen, lebensbedrohlichen Infekten wie Endokarditiden (Entzündungen der Herzinnenhaut) und Septikämien (systemische Erkrankung nach Übertritt der Erreger in die Blutbahn, Lowy, 1998; Novick, 2000). Schwere, invasive Infektionen mit *S. aureus* werden hauptsächlich in immungeschwächten Personen beobachtet. Besonders problematisch sind Fremdkörper-assoziierte Infektionen. Verschiedene Implantate und Katheter können von *S. aureus* kolonisiert werden und in der Folge den Fremdkörper mit einem Biofilm überziehen. Zunehmend problematisch sind Infektionen durch Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA)-Stämme, die zusätzlich gegen mehrere Antibiotika Stoffklassen resistent sind und dadurch eine Therapie erschweren. Zusätzliche werden in neuester Zeit *S. aureus* Infektionen mit MRSA-Stämmen in der immunkompetenten Bevölkerung beschrieben („community-acquired MRSA“). Die Betroffenen sind Individuen, die keine der bekannten Risikofaktoren, wie Operationen und längerer Aufenthalt in Krankenhäusern, aufweisen. Bislang zeigen diese „community acquired MRSA“ (cMRSA) keine Multiresistenzen und sind noch gegen verschiedenen Antibiotikasubstanzen, außer der  $\beta$ -Lactame, empfindlich (Baba et al., 2002; Robinson und Enright, 2004; Holden et al., 2004). Eine Vielzahl von Toxinen und Superantigenen tragen zur erhöhten Pathopotenzen dieser cMRSA bei. Schwerwiegende Infektionen können von cMRSA verursacht werden, die das Pantone-Valentine Leukocidin (PVL)-Gen exprimieren. Diese PVL-Stämme können neben schweren Hautinfektionen auch lebensbedrohliche nekrotisierende Lungeninfektionen in der immunkompetenten Bevölkerung verursachen (Johnsson et al., 2004; Gillet et al., 2002).

### **2.2 Resistenzentwicklung in *S. aureus***

Vor allem Staphylokokken zeigen eine schnelle Resistenzentwicklung gegen neue Antibiotika. Bereits zwei Jahre nach Einführung von Penicillin im Jahre 1944 wurden die

ersten Penicillin-resistenten Staphylokokken isoliert (Barber et al., 1948). Grund für die Resistenz gegen diese  $\beta$ -Lactamantibiotika war der Erwerb von Penicillinasen. Gegenwärtig produzieren über 90 % aller klinischen *S. aureus* Isolate  $\beta$ -Lactamase (Projan, 2000). Seit dem Jahre 1959 wurden daher Penicillinase-stabile  $\beta$ -Lactamantibiotika, wie das Methicillin eingesetzt. Wiederum zwei Jahre später wurde der erste Methicillin-resistente *S. aureus* Stamm (MRSA) isoliert (Jevons et al., 1961). Nach der neuesten PEG-Studie sind ca. 21 % aller *S. aureus* Isolate in Deutschland Methicillin-resistent (Kresken et al., 2001). Die Resistenz beruht auf dem Erwerb des *mecA*-Gens, einem zusätzlichen Penicillin-Bindeprotein (PBP2a oder PBP2'), das nur eine geringe Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactamverbindungen aufweist. Erst im Zusammenspiel mit weiteren bakteriellen Faktoren kann die Expression von *mecA* zu einer hohen Resistenz gegenüber Methicillin führen. Staphylokokken, die das *mecA*-Gen tragen sind gegen alle bekannten  $\beta$ -Lactamantibiotika, einschließlich der Cephalosporine und Carbapeneme resistent (Hiramatsu et al., 1997, Projan, 2000; Robinson und Enright, 2004). Besonders besorgniserregend ist die zusätzliche Resistenz klinischer MRSA-Isolate gegen zahlreiche weitere Stoffklassen von Antibiotika. Zum Beispiel zeigte die Sequenzierung eines in England und USA dominierenden klinischen *S. aureus* Stammes MRSA252, wie der Erwerb mehrerer mobiler genetischer Elemente zu einem multiresistenten Phänotyp beiträgt. Das *mecA*-Gen befindet sich auf einer mobilen, chromosomalen Kasette, die als SCC*mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome) bezeichnet wird. Die SCC*mec*-Kasette im Stamm MRSA252 gehört zum Typ II. Inzwischen sind fünf SCC*mec*-Haupttypen beschrieben (Ito et al., 2004, Ito et al., 2003; Baba et al., 2002; Holden et al., 2004). Im Stamm MRSA252, befindet sich auf dieser SCC*mec*-Kasette neben der *mecA*-Determinante, auch ein intergriertes Plasmid pUB110, das Bleomycin- und Kanamycin Resistenzgene trägt, sowie das Transposon Tn554, das Erythromycin- und Spectinomycinresistenz vermittelt. Außerdem enthält dieser Stamm das Transposon Tn552 mit den induzierbaren  $\beta$ -Lactamasegenen (*BlaI*, *BlaR*, *BlaZ*). Zusätzlich sind chromosomale Resistenzdeterminanten wie *norA* vorhanden. Das Gen *norA* codiert für eine Efflux-Pumpe, die Resistenz gegenüber Fluoroquinolonen vermittelt (Holden et al., 2004). Für derart multiresistente Erreger blieb häufig nur noch Vancomycin zur Therapie. Über einen Zeitraum von mehr als 30 Jahren konnte Vancomycin zur Bekämpfung multiresistenter *S. aureus* (MRSA) eingesetzt werden. Die ersten Staphylokokken mit verringerter Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin traten im Jahr 1997 in Japan und wenig später in den USA auf (Hiramatsu et al., 1997). Diese *S. aureus* Stämme zeigten eine mittlere Resistenz gegenüber Vancomycin, bei einer MHK von

8 µg/ml. Die ersten Staphylokokken mit hoher Vancomycin-Resistenz wurden vor zwei Jahren in Michigan (USA) isoliert. Diese Stämme enthielten sowohl die Vancomycin-Resistenzdeterminante *vanA* aus Enterokokken, als auch das Methicillin-Resistenzgen *mecA*. Die MHK dieses Stammes für Vancomycin betrug >128 µg/ml und für Oxacillin 16 µg/ml (Miller et al., 2002a; Sievert et al., 2002). Die Verbreitung von multiresistenten MRSA-Stämmen, die gleichzeitig hohe Vancomycin-Resistenz besitzen, stellen eine große Bedrohung dar, da sie nur noch schwer mit Antibiotika behandelt werden können (de Sousa und De Lencastre, 2004). Gegen Vancomycin-resistente MRSA wirken häufig nur noch die neuesten Antibiotika Linezolid, Synercid (Quinupristin-Dalfopristin) oder Daptomycin (LaPlante und Rybak, 2004; Lundstrom et al., 2004; Cha et al., 2003). Allerdings wurden bereits ein Jahr nach Zulassung des Antibiotikums Linezolid, Linezolid-resistente *S. aureus* Stämme beschrieben (Tsiodras et al., 2001). Auch von Synercid-resistenten *S. aureus* Isolaten wird berichtet (Hershberger et al., 2004). Mobile genetische Elemente und horizontaler Gentransfer tragen maßgeblich zur Etablierung multiresistenter *S. aureus* bei.

### 2.3 Entwicklungen neuer Antibiotika

Die soeben beschriebenen Resistenzentwicklungen in *S. aureus* verdeutlichen die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer, wirksamer Antibiotika. Eine Strategie dabei könnten Varianten bereits bestehender Antibiotika sein. Zum Beispiel gibt es weitere Varianten der  $\beta$ -Lactamantibiotika, die Wirksamkeit gegen MRSA zeigen (Singh, 2004). Alternativ dazu könnten ganz neue Stoffklassen auf ihre antibakterielle Wirkung getestet werden. Seit dem Jahr 1962 sind jedoch nur zwei neue Substanzklassen zur Antibiotikatherapie zugelassen worden (Leeb, 2004). Eine neue Klasse synthetischer Antibiotika stellen die Oxazolidinone (Linezolid) dar. Diese Substanzklasse inhibiert die Proteinbiosynthese in grampositiven Bakterien (Swaney et al., 1998). Eine weitere antibakterielle Substanz, das Daptomycin, ein zyklisches Lipopeptide ist seit 2003 zur Therapie zugelassen (Leeb, 2004).

Ein Ansatz zur Entwicklung neuer Antibiotika ist die Suche nach neuen Angriffszielen in der Bakterienzelle. Bislang inhibieren antibakterielle Substanzen in erster Linie die Zellwandsynthese, den DNA- und RNA-Stoffwechsel sowie die Proteinsynthese. Auch andere zelluläre Vorgänge, wie die Zellteilung, die Sekretion und zahlreiche Stoffwechselwege könnten sich als Angriffsziel eignen. Von besonderem Interesse sind dabei bakterielle Strukturen, die über mehrere Spezies verbreitet sind, um ein Antibiotikum mit breitem Spektrum zu erhalten. Dank zahlreicher sequenzierter bakterieller Genome

lassen sich weit verbreitete homologe Gene auffinden. Diese potentiellen Angriffsziele neuer Antibiotika sollten lebensnotwendige Funktionen in der Bakterienzelle übernehmen oder zumindest für die Etablierung einer Infektion (in vivo) essentiell sein (Chopra et al., 1997; Moir et al., 1999; McDevitt und Rosenberg et al., 2001; Reidhaar-Olsen et al., 2001). Ein erster Schritt zur Auffindung potentieller neuer Angriffsziele für Antibiotika in *S. aureus* wurde in dieser Arbeit unternommen. Dabei wurden hauptsächlich Gene ausgewählt, deren Essentialität in anderen Bakterien, wie *E. coli* oder *B. subtilis* bereits nachgewiesen wurde. Eine weitere Eigenschaft der zu untersuchenden Gene war deren weite Verbreitung über viele Bakterien Spezies hinweg. Die zu untersuchenden Gene wurden von Dr. Freiberg (Bayer AG, Wuppertal) ausgewählt und sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Ausgewählte, putativ essentielle Gene, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden (genaue Beschreibung im Text). Die entsprechenden orthologen Gene aus *B. subtilis* und *E. coli* sind angegeben. (\*Identifikationsnummern aus *S. aureus* N315, Stand Juli 2004.)

<b>*<i>S. aureus</i></b>	<b><i>B. subtilis</i></b>			<b><i>E. coli</i></b>			<b>(putative) Funktion</b>
	<b>Gen</b>	<b>Identität (Protein)</b>	<b>essentiell</b>	<b>Gen</b>	<b>Identität (Protein)</b>	<b>essentiell</b>	
SA1063	<i>prkC</i>	38 %	nein	-	-	-	Serin/Threonin Kinase
<i>topB</i> , SA2051	<i>topB</i>	49 %	nein	<i>topB</i>	30 %	nein	Topoisomerase Typ I
<i>polA</i> , SA1513	<i>polA</i>	60 %	nein	<i>polA</i>	38 %	ja (Vollmedium)	DNA-Polymerase I
<i>nusG</i> , SA0494	<i>nusG</i>	68 %	nein	<i>nusG</i>	41 %	ja	Antiterminator bei der Transkription
SA0453	<i>yabH</i>	50 %	ja	<i>yhbB</i>	30 %	ja	Isopren-Biosynthese
SA0241	<i>yacM</i>	30 %	ja	<i>ygbP</i>	27 %	ja	Isopren-Biosynthese
SA0245	<i>yacM</i>	32 %	ja	<i>ygbP</i>	27 %	ja	Isopren-Biosynthese
SA1857	<i>ydiB</i>	43 %	ja (geringes Wachstum)	<i>yjeE</i>	39 %	ja	Nukleotid-Bindeprotein
SA1444	<i>yrrK</i>	59 %	ja	<i>yqgF</i>	27 %	ja	Endonuklease
SA0367	<i>nfrA</i> ( <i>ywcG</i> )	42 %	ja (Moch et al., 1998); nein (Kobayashi et al., 2003)	<i>nfsA</i>	37 %	(nein)	NADPH-abhängige Oxidoreduktase

## 2.4 Die Oxidoreduktase NfrA

Homologe Gene von *nfrA* codieren für Oxidoreduktasen und konnten durch BLAST-Analysen in verschiedenen Bakterienspezies identifiziert werden, darunter sowohl gram-positive Vertreter wie *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Enterococcus faecalis*, in verschiedenen *Bacillus* Arten, wie *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. halodurans*, *B. anthracis*, als auch in gram-negativen Spezies wie *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* und *Vibrio cholerae*. Die enzymatische Aktivität von NfrA in *B. subtilis* und von dem homologen Protein NfsA in *E. coli* wurden bereits bestimmt (Moch et al., 1998; Zenno et al., 1996). In diesen Spezies codiert *nfrA* oder *nfsA* für eine FMN-enhaltende NADPH-Oxidase. Das NfrA orthologe Protein von *S. aureus* zeigt 42 % identische Aminosäuren mit dem NfrA-Protein aus *B. subtilis* und 37 % identische Aminosäuren mit dem homologen Protein NfsA aus *E. coli*. In *S. aureus* wurde das NfrA-Ortholog (Identifizierungsnummer SA0367 in *S. aureus* N315) noch nicht charakterisiert. In *B. subtilis* ist *nfrA* nach Moch et al. (1998) essentiell, jedoch nach Kobayashi et al. (2003) nicht essentiell. In *E. coli* existieren mehrere Mutanten im *nfrA*-homologen Gen *nfsA* (McCalla et al., 1970, Whiteway et al., 1998). Daher ist das Gen in *E. coli* vermutlich nicht essentiell. Eine Restaktivität des *nfsA* Gens in den beschriebenen Mutanten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass NfsA ein breites Spektrum an Substratmolekülen hat. Verschiedene organische Nitroverbindungen, wie Nitrofurazon, Nitrofurantoin, 4-Nitrophenol, sowie Quinone als auch manche Azofarbstoffe, Ferricyanid und Chromat werden von NfsA reduziert (Zenno et al., 1996; Ackerley et al., 2004). Die Nitroreduktase-Aktivität von NfsA wurde bereits 1970 von McCalla et al., beschrieben, daher wird das Enzym auch als Nitroreduktase bezeichnet. Bei der Reduktion von organischen Nitroverbindungen, wie Nitrofurantoin, durch Nitroreduktasen, entstehen die entsprechende Nitrosoverbindungen und die entsprechenden Hydroxylamin-Derivate, die cancerogen und mutagen sind (Asnis, 1957; McCalla et al., 1970; Merino et al., 2000). Eine Mutation im Nitroreduktasegen *nfsA* hat daher eine erhöhte Resistenz gegenüber diesen Nitroverbindungen zur Folge. Verschiedene Mutanten mit verringerter Empfindlichkeit gegenüber Nitrofurantoin wurden entweder durch Nitrosoguanidin-Mutagenese oder als spontan resistente Klone gegenüber Nitrofurazon isoliert. Die verschiedenen Mutanten wurden von McCalla 1970 mit „*nfr*“-Mutanten (für Nitrofuran-resistent) bezeichnet. Dieser Name wurde für das orthologe Gen in *B. subtilis* übernommen. McCalla et al., (1978) dagegen bezeichneten das wildtypische Gen in *E. coli* mit *nfs* für (Nitrofuran sensitive). In

*E. coli* wurden neben der Nitroreduktase NfsA auch weitere Enzyme mit Nitroreduktase-Aktivität beschrieben, wie z. B. NfsB. Das Protein NfrA aus *B. subtilis* zeigt ebenfalls Nitroreduktase-Aktivität, jedoch sind keine Mutanten in diesem Gen beschrieben (Zenno et al., 1998). Die tatsächliche Funktion von Enzymen mit Nitroreduktase-Aktivität ist ungewiss. Da die Reduktion bestimmter Nitroverbindungen eine schädliche Auswirkung auf die Zelle hat, ist anzunehmen, dass die eigentliche Funktion des Enzyms eine andere Reduktionsreaktion ist.

Sowohl in *B. subtilis* als auch in *E. coli* wird die Expression des NfrA homologen Gens durch oxidativen Stress induziert (Mostertz et al., 2004; Liochev et al., 1999; Paterson et al., 2002). In *E. coli* ist *nfsA* ein Mitglied des *soxRS* Regulons (Paterson et al., 2002; Liochev et al., 1999). Das *soxRS* Regulon umfasst mindestens 15 Gene, deren Expression durch Superoxid Radikale induziert wird. Zu diesem Regulon gehören z.B. auch die Superoxid Dismutase (*sodA*), Fumarase C (*fumC*) und NADPH Ferredoxin Reduktase (*fpr*). Das *nfrA* homologe Gen in *B. subtilis* wird ebenfalls durch oxidativen Stress und durch Hitze-Stress induziert (Mostertz et al., 2004; Moch et al., 2000). Die Regulation der Expression von *nfrA* in *B. subtilis* ist nicht bekannt.

In *B. subtilis* und *S. aureus* ist häufig der alternative Sigma Faktor SigB an der Stressantwort beteiligt. Die Gene unter der Kontrolle von SigB tragen zu einer allgemeinen vielfältigen Stressantwort bei, ähnlich zu dem SigS Regulon von *E. coli*. In *S. aureus* ist das SigB Regulon an der Expression von Genen beteiligt, die zur Resistenz gegenüber Hitze, Säure und oxidativem Stress benötigt werden. SigB-Deletionsmutanten in *S. aureus* waren gegenüber dieser Art von Stress empfindlicher als der isogene Wildtyp (Gertz et al. 2000; Chan et al., 1998; Kullik et al., 1997, 1998; Horsburgh et al., 2002). In *B. subtilis* trägt SigB zu der Regulation von mehr als 100 Genen bei, die bei Hitze-, Säure-, Ethanol-, Salz- und oxidativem Stress wichtig sind (Antelmann et al., 1996, 1997; Völker et al., 1999).

Eine spezifischere Kontrolle von Genen, die bei oxidativem Stress eine Rolle spielen, wird durch den Transkriptionsfaktor PerR ermöglicht. Das PerR Regulon wurde sowohl in *B. subtilis* als auch in *S. aureus* beschrieben (Horsburgh et al., 2001; Bsat et al., 1999, Herbig and Helmann, 2001; Fuangthong et al., 2002). Vermutlich handelt es sich bei PerR um einen Wasserstoffperoxid-Sensor, in Analogie zu OxyR aus *E. coli* (Aslund et al., 1999; Storz et al., 1999). Die DNA-Bindungsstelle für den PerR Repressor liegt in der

Promotorregion entsprechender Gene und wird als PerR-Box bezeichnet. Die Gene unter der Kontrolle von PerR sind in *B. subtilis* der Repressor *perR* selbst, die Katalase *katA*, das Alkyl Hydroperoxide Reduktase Operon (*ahpCF*), ein *dps* homologes Gen (*mrgA*) und die Hem Biosynthese-Gene (*hemAXCDBL*), sowie ein Zink-Aufnahmesystem (*zosA*; Bsat et al., 1996, Chen et al., 1995; Chen et al., 1993). Die Komponenten des *perR*-Regulons in *S. aureus* überlappen mit den in *B. subtilis* regulierten Genen. Die zum *perR*-Regulon gehörenden Gene in *S. aureus* sind der *perR* Repressor, *katA* (Katalase), *ahpCF* (Alkyl Hydroperoxide Reduktase Operon), *mrgA* (ein Dps Homolog), *fur* (Eisenaufnahme Regulator), *ftn* (Ferritin), *trxB* (Thioredoxin Reduktase), *bcp* („Bacterioferritin comigratory protein“). Die Rolle von *nfrA* bei oxidativen Stress in *S. aureus* wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

### 2.5 Ser/Thr-Kinasen in Bakterien

Ein wichtiger Weg in Prokaryonten und Eukaryonten Umweltsignale und Wachstumsbedingungen wahrzunehmen und auf diese zu reagieren, stellen Phosphorylierungskaskaden dar. Am häufigsten in Prokaryonten anzutreffen ist die Signalübertragung durch so genannte Zwei-Komponenten-Systeme. Solche Systeme bestehen aus einem Sensorprotein, das häufig in der Bakterienmembran lokalisiert ist und nach Aktivierung an einem Histidin-Rest phosphoryliert wird und einem Response Regulator. Die Phosphatgruppe wird vom Sensorprotein auf einen Aspartat-Rest des Response Regulators übertragen. Der Response Regulator wirkt direkt auf die Transkription der Zielgene, die aktiviert oder reprimiert werden. Die Signalübertragung in Eukaryonten wird häufig ebenfalls über membranständige Rezeptoren vermittelt. Bei der Signalübermittlung spielen auch hier Phosphorylierungskaskaden eine essentielle Rolle (Robinson et al., 2000; Foussard et al., 2001). Die Phosphorylierungsreaktionen finden dabei an Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten statt. Die Phosphorylierung von Tyrosin-, Serin- und Threonin-Resten gilt als der prinzipielle Weg der Signalübertragung in Eukaryonten (Alberts et al., 1995).

Erst im Jahr 1991 wurde die erste Eukaryonten-ähnliche Ser/Thr-Protein-Kinase von einem Bakterium, *Myxococcus xanthus*, kloniert (Munoz-Dorado et al., 1991). Tatsächlich ist dieser Kinase-Typ (ESTPK, ekaryotic-type Ser/Thr protein kinase) über viele Bakterien-Spezies verbreitet. Dank zahlreicher Genom-Sequenzierungsprojekte wurden putative ESTPKs und putative Ser/Thr-Phosphatasen in vielen Prokaryonten-Genomen entdeckt. In *E. coli* wird von drei putativen ORFs für Protein-Kinasen berichtet und in *B. subtilis*

bislang von zweien (Shi et al., 1998). Besonders in Bakterien mit komplexen Lebenszyklen wie Myxokokken, Cyanobakterien, Mykobakterien und Streptomyceten sind diese Kinasen in großer Anzahl vorhanden. In Mykobakterien wurden 13 putative EPSTKs gefunden, von denen bereits 5 biochemisch charakterisiert wurden (Chaba et al., 2002). In *Streptomyces coelicolor* wurden Sequenzen von 37 putativen ESTPKs gefunden (Petrickova and Petricek, 2003). Mittlerweile wird offensichtlich, dass die Phosphorylierung von Hydroxyl-Aminosäuren auch in Prokaryonten weit verbreitet ist und in unterschiedliche Regulationsprozesse involviert ist. So ist z. B. auch die HPr-Kinase eine Serin-Kinase, die bei der Katabolit-Repression in gram-positiven Bakterien eine wesentliche Rolle spielt (Galinier et al., 1998; Reizer et al., 1998).

Das Protein SA1063 von *S. aureus* weist Homologien zu Ser/Thr-Protein-Kinasen auf. Über die Funktion von EPSTKs ist relativ wenig bekannt. In Mykobakterien stehen noch keine Deletionsmutanten dieser Kinasen zur Verfügung. Die konstitutive Expression der EPSTK *pknA* aus *M. tuberculosis* in *E. coli* führt zu einem verstärkten Längenwachstum der Zellen (Chaba et al., 2002). In anderen Bakterien-Spezies konnten zum Teil schon Deletionsmutanten der EPSTKs untersucht werden. Die Deletion der EPSTK *Stk1* in *Streptococcus agalactiae* führt zur Bildung von langen aneinanderhängenden Zellketten. Für *Stk1* konnte gezeigt werden, dass diese Kinase eine Pyrophosphatase (PpaC) phosphoryliert und dadurch vermutlich deren Aktivität reguliert. Die *stk1*-Deletionsmutanten waren außerdem attenuiert in einem Sepsismodell mit neonatalen Ratten (Rajagopal et al., 2003). Die Inaktivierung der EPSTK *Pkn9* oder *Pkn2* von *Myxococcus xanthus* vermindert die Sporenbildung (Hanlon et al., 1997; Udo et al., 1996). In *B. subtilis* spielt die EPSTK *prkC* eine Rolle bei der Biofilm- und Sporenbildung und ist nicht essentiell (Madec et al., 2002; Kobayashi et al., 2003). Diese Beobachtungen geben Hinweise darauf, dass EPSTKs an Prozessen wie Zellteilung, dem Zellwandaufbau und der Zelldifferenzierung beteiligt sein könnten sowie zur Pathogenität beitragen könnten. Außerdem wurde nachgewiesen, dass Ser/Thr-Protein-Kinase-Inhibitoren das Wachstum von *Mycobacterium bovis* BCG und *M. smegmatis* deutlich reduzieren. Daher wurde vermutet, dass manche EPSTKs essentielle Funktionen haben könnten (Drews et al., 2001). Bislang wurde noch keine EPSTK in *S. aureus* charakterisiert.

## 2.6 Die DNA-Polymerase I

Die DNA-Polymerase I wurde bereits 1955 durch Kornberg und seine Mitarbeiter in *E. coli* entdeckt, und seither intensiv untersucht (Stryer, 1996). Die DNA-Polymerase I verfügt über drei verschiedene aktive Zentren in einem einzigen Polypeptid. Neben der Matrizen-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität am C-terminalen Ende, weist das Enzym außerdem eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität auf, die dem Korrekturlesen der synthetisierten DNA dient („proof-reading“), als auch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität am N-terminalen Ende des Polypeptides. Eine wichtige Rolle spielt die DNA-Polymerase I bei der Prozessierung der Okazaki-Fragmente während der DNA-Replikation (Okazaki et al., 1971). Die DNA-Polymerase I entfernt durch die 5'-3'-Exonukleasefunktion die RNA-Primer und füllt Lücken in der DNA auf. Eine weitere wichtige Funktion übernimmt die DNA-Polymerase I bei der Reparatur geschädigter DNA. Zum Beispiel können Pyrimidindimere, die nach Einwirkung von ultraviolettem Licht auf die DNA entstehen, durch die Aktivität der Proteine UvrA, UvrB, UvrC und UvrD erkannt und herausgeschnitten werden. Die entstandene Lücke in der DNA wird anschließend durch die DNA-Polymerase I aufgefüllt (Sancar et al., 1994; Sharma et al., 1987). Außerdem ist die DNA-Polymerase I, aufgrund der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die einzige DNA-Polymerase in *E. coli*, die die DNA-Synthese bei einem Einzelstrangbruch in der DNA beginnen kann. Dabei verlängert die Polymerase-Aktivität des Enzyms gleichzeitig das 3'-Ende der unterbrochenen DNA und verdrängt dabei den homologen Strang vom 5'-Ende her (5'-3'-Exonuklease-Aktivität). Dieser Prozess wird Nicktranslation genannt. Die Nicktranslation wird auch in der Gentechnik verwendet, um markierte Nukleotide in DNA einzubauen (Stryer, 1995; Lewin 1998).

*E. coli* Mutanten, die nur noch 1 % der normalen Polymeraseaktivität aufweisen, vermehren sich mit der gleichen Geschwindigkeit wie der Ausgangsstamm, allerdings wurden die *polA*-Mutanten durch UV-Licht schneller abgetötet (DeLucia und Cairns, 1969). Diese Beobachtung macht die Bedeutung der DNA-Polymerase bei der Reparatur von geschädigter DNA deutlich. Eine vollständige Deletion des *polA*-Gens wurde in *E. coli* beschrieben (Joyce and Grindley, 1984). Die  $\Delta polA$ -Mutante war nur in Minimalmedium lebensfähig, für das Wachstum in Vollmedium war die DNA-Polymerase I essentiell. Es ist möglich, dass bei der verringerten Wachstumsrate in Minimalmedium andere Nukleasen und Polymerasen die Funktion der DNA-Polymerase I übernehmen können (Joyce and Grindley, 1984; Moolenaar et al., 2000). Die DNA-Polymerase I ist in *B. subtilis* nicht

essentiell (Kobayashi et al., 2003). Verschiedene *polA*-Mutanten in *B. subtilis* zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Substanzen wie Methylmethanosulfat oder UV-Licht (Martinez et al., 1987, Laipis und Ganesan 1972; Villani et al., 1974). In *Streptococcus pneumoniae* wurden verschiedene Mutationen in das *polA*-Gen eingefügt. Die DNA-Polymerase I von *S. pneumoniae* verfügt nur über zwei enzymatische Aktivitäten. Das Enzym weist sowohl Polymerase-Aktivität auf, als auch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Das Enzym hat jedoch keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Diaz et al., 1992a). Mutanten, die die Polymerase-Aktivität verloren hatten waren lebensfähig, allerdings konnte die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität nicht mutiert werden, es sei denn die 5'-3'-Exonuklease-Domäne wurde ektopisch im Genom exprimiert. Daher wurde angenommen, dass in diesem Organismus die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität von PolA essentiell ist (Diaz et al., 1992b). Die Essentialität der DNA-Polymerase I (*polA*) für *S. aureus* wurde noch nicht untersucht und sollte in dieser Arbeit geklärt werden.

### 2.7 Die Topoisomerase III

Die DNA-Doppelhelix liegt in der Zelle nicht entspannt (relaxiert) vor, sondern bildet Superhelices aus. Die Ausbildung dieser Superspiralisierung ist die Folge einer Aufwindung der beiden DNA-Stränge der DNA-Doppelhelix. Die Häufigkeit mit der die beiden DNA-Stränge umeinander gewunden sind, wird mit der Verwindungszahl ausgedrückt (linkage number; Lk). In der Zelle ist die Verwindungszahl der DNA niedriger als im entspannten Molekül. Diese Aufwindung setzt die DNA unter Spannung, die dadurch aufgefangen wird, dass sich die Achse der DNA zu einer Superspirale verdreht. Da die Superspirale durch das Entfernen von Helixwindungen Zustand kommt, spricht man von negativer Superspiralisierung. Die Superspiralisierung erleichtert die dichte Verpackung der DNA. Außerdem wird eine weitere Auftrennung der beiden DNA-Stränge durch die negative Superspiralisierung energetisch begünstigt. Dies spielt insbesondere bei Prozessen wie der Replikation, Transkription und Rekombination eine Rolle. Topoisomerasen verändern die Verwindungszahl der DNA. Man unterscheidet zwei Typen von Topoisomerasen: Typ I erzeugt in einem der beiden DNA-Stränge vorübergehend einen Bruch, der zweite DNA-Strang wird durch den Bruch geführt und die DNA Enden werden anschließend wieder verbunden. Die Verwindungszahl ändert sich dabei jeweils um eins. Topoisomerasen vom Typ II schneiden beide Stränge der DNA-Duplex und führen eine zweite DNA-Duplex durch den Bruch. Beide Brüche werden anschließend wieder verschlossen. Dieser Vorgang verändert die Verwindungszahl um jeweils zwei.

In *E. coli* sind vier Topoisomerasen bekannt. Topoisomerasen vom Typ I sind die Topoisomerase I (Topo I), codiert vom *topA*-Gen, und die Topoisomerase III (Topo III), codiert vom *topB*-Gen. Beide Enzyme sind als Homodimere aktiv. Die DNA-Gyrase und die Topoisomerase IV sind Topoisomerasen vom Typ II. Beide Topoisomerasen vom Typ II sind Tetramere, die aus Paaren von zwei Untereinheiten bestehen. Die Proteine GyrA und GyrB sind die Untereinheiten der DNA-Gyrase, ParC und ParE stellen die Untereinheiten der Topoisomerase IV dar. Die DNA-Gyrase und die Topoisomerase IV sind essentiell. Beide Enzyme sind die Zielstruktur verschiedener Antibiotika, insbesondere Quinolone werden zur Antibiotika-Therapie eingesetzt (Hopper, 1998; Levine et al., 1998).

Die DNA Topoisomerasen vom Typ I sind nicht essentiell, allerdings ist eine Deletion von *topA* nur in Gegenwart kompensatorischer Mutationen lebensfähig. Deletionsmutanten von *topA* in *E. coli* sind lebensfähig, wenn sie gleichzeitig Mutationen in *gyrA* oder *gyrB* anhäufen, die zu einer verminderten Aktivität der Gyrase führen (Pruss et al., 1982). Die Gyrase hat besondere Bedeutung, da sie das einzige Enzym ist, das negative Supercoils in die DNA einführen kann. Die Topoisomerase I entfernt dagegen negative Supercoils aus der DNA. Die gegensätzliche Aktivität dieser beider Enzyme ist vermutlich für die Aufrechterhaltung der superhelikalen Dichte der DNA verantwortlich (Hopper, 1998). Die Topoisomerase III (*topB*) ist weniger gut untersucht. Eine Deletion von *topB* in *E. coli* ist lebensfähig, allerdings zeigen *topB*-Deletionsmutanten eine erhöhte Rate *recA*-unabhängiger spontaner Deletionen an kurzen direkten Wiederholungs-Sequenzen (DiGate and Marians, 1988; Whoriskey et al., 1991; Schofield et al., 1992). Die Aufgabenverteilung zwischen den Topoisomerasen ist zum Teil redundant. Beide Typ 1-Topoisomerasen können negative Superspiralisierung entfernen, jedoch ist Topo I (TopA) darin effizienter als Topo III (TopB). Der Wachstumsdefekt einer *topA*-Nullmutante kann allerdings durch Überexpression von *topB* korrigiert werden (Broccoli et al., 2000). Die Topoisomerase III ist dagegen die effizientere Dekatenase. Die Topoisomerase IV ist ebenfalls eine Dekatenase, außerdem kann sie positive und negative Supercoils aus der DNA entfernen (Hooper, 1998).

In *S. aureus* sind homologe aller vier Topoisomerasen zu finden (KEGG, Datenbanksuche). Die DNA Gyrase und die Topoisomerase IV sind auch in *S. aureus* essentiell. Im Gegensatz zu *E. coli* ist in *S. aureus* nicht die Gyrase, sondern die Topoisomerase IV das Hauptangriffsziel der Fluoroquinolon-Antibiotika (Fournier et al., 2000). Die Typ I-

Topoisomerasen, das *topA*-homologe Gen und *topB*, sind in *S. aureus* weniger gut untersucht. Die Aufgabenverteilung der Topoisomerasen in *S. aureus* könnte von der Aufgabenverteilung der Topoisomerasen in *E. coli* abweichen. Daher sollte untersucht werden, ob *topB* in *S. aureus* essentiell ist. Theoretisch könnten sich allerdings auch nicht essentielle Topoisomerase als Target für Antibiotika eignen. Die Substanz müsste die Eigenschaft besitzen den Enzym-DNA-Komplex irreversibel zu blockieren. Ähnlich ist der Wirkmechanismus von Quinolonen mit der DNA-Gyrase oder der Topoisomerase IV. Die Quinolone blockieren die enzymatische Reaktion, indem sie an den Enzym-DNA-Komplex binden (Drlica, 1999; Hopper, 1998).

## 2.8 Die Isopren-Biosynthese

Isoprenoide, auch Terpene genannt, stellen eine sehr große und vielfältige Stoffklasse dar. Zum Teil haben Isoprenoide wichtige Aufgaben wie Bactoprenol (Undecaprenylpyrophosphat) das an der Zellwandsynthese in Bakterien beteiligt ist. Außerdem können Isoprenoide als Verankerung mancher Membranproteine dienen, z.B. dem Menaquinon und Ubiquinon. Auch Carotinoide gehören zu dieser Stoffklasse (Stryer et al., 1995; Brock et al., 1997; Lehniger et al., 2001).

Die Enzyme YgbP und YchB sind in *E. coli* und *B. subtilis* essentiell (Freiberg et al., 2001b). In diesen Organismen werden die beiden Enzyme zur Synthese von Isopren (2-Methyl-1,3-Butadien), dem zentralen Baustein der Isoprenoid-Biosynthese benötigt. Die Synthese aller Isoprenoide geht von den aktivierten Isoprenmolekülen Isopentenylpyrophosphat (IPP) und dem Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) aus. Es sind mittlerweile zwei Synthesewege bekannt die zu diesen Isoprenmolekülen führen. Der gut charakterisierte Acetat/Mevalonat-Weg findet in Tieren, im Cytoplasma von Pflanzen und in einigen Bakterien wie *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium* statt (Tanaka et al., 1990; Potter et al., 1997; Wilding et al., 2000; Lichtenthaler, 2000; Voynova et al., 2004). Ein alternativer Weg zur Isopren-Biosynthese stellt der 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate- (DXP-) Weg dar. Dieser Syntheseweg läuft in verschiedenen Bakterienspezies wie *E. coli*, *B. subtilis* und Mykobakterien sowie in *Plasmodium falciparum* ab. Außerdem findet dieser Syntheseweg in Plastiden höherer Pflanzen statt. In den letzten zehn Jahren wurde dieser Isopren-Biosyntheseweg weitgehend aufgeklärt (Eisenreich et al., 1998; Rohmer 1998; Rohdich et al., 1999; Lüttgen et al., 2000; Hecht et al., 2001; Kollas et al., 2002; Page et al., 2004). Die Biosynthese von Isopren über den DXP-Weg geht von den beiden C3-Körpern Pyruvat und Glyceraldehyde-3-Phosphat

aus. Im ersten Schritt wird aus diesen beiden C3-Körpern durch die DXP Synthase, codiert vom Gen *dxs*, 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DXP) gebildet. Bei dieser Reaktion wird Pyruvat decarboxyliert und eine C2-Einheit des Pyruvats wird in einer Thiamin-abhängigen Reaktion auf das Aldehyd übertragen. Es kommt im Folgenden zur Reduktion von DXP in Gegenwart von NADPH und zur Methylgruppenumlagerung durch das Enzym DXP-Reduktoisomerase (Genprodukt von *dxr*), dabei entsteht 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (MEP). Anschließend wird CTP mittels der CDP-ME Synthetase (YgbP) auf MEP übertragen, dabei entsteht 4-(Diphosphocytidyl)-2-C-Methyl-D-Erythritol (CDP-ME). CDP-ME wird dann durch die CDP-ME Kinase (YchB) und ATP phosphoryliert. Das Produkt CDP-Methyl-D-erythritol-2-phosphate (CDP-ME-2-P) wird durch die ME-Cyclodiphosphat Synthetase (YgbB) zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphate. Anschließende Reduktionsreaktionen führen zu Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP; Abb.1).

Obwohl *S. aureus* über den Acetat/Mevalonat-Weg zur Isopren-Biosynthese verfügt, besitzt dieses Bakterium homologe Gene des DXP-Weges. Zwei Gene in *S. aureus* sind homolog zur CDP-ME Synthetase, codiert durch *ygbP1* (SA0241) und *ygbP2* (SA0245). Diese beiden Gene liegen in *S. aureus* 4607 bp getrennt voneinander auf dem Chromosom. Die Aminosäuresequenz der beiden Genprodukte YgbP1 (SA0241) und YgbP2 (SA0245) ist zu 75 % identisch. Ein weiteres Gen von *S. aureus* ist homolog zur CDP-ME Kinase und wird von *ychB* (SA0453) codiert. Welche Funktion diese Gene in *S. aureus* erfüllen ist nicht bekannt. Es wurden keine homologen Gene der 3 Enzyme, Dxs, Dxr und YgbB des DXP-Weges in *S. aureus* gefunden (Freiberg, 2001a). Orthologe von *ygbP* und *ychB* sind auch in Bakterien der Gattung *Streptococcus* und *Enterococcus*, die ebenfalls über den Mevalonatweg zur Isopren-Biosynthese verfügen, zu finden. YgbP-homologe Enzyme sind vermutlich Nukleotidyltransferasen, wohingegen die YchB-homologen Enzyme ATP-abhängige Kinasen darstellen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die homologen Gene von *ygbP* und *ychB* in *S. aureus* essentiell sind.

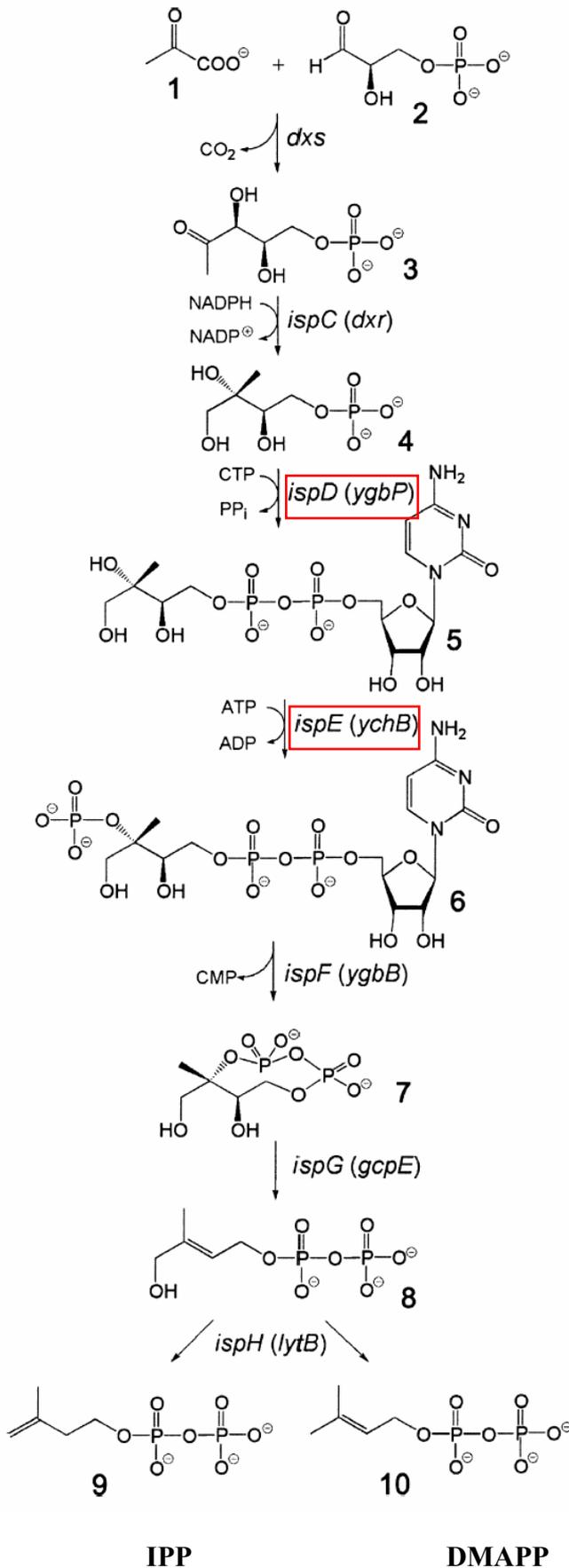


Abb. 1: Der DXP-Weg zur Synthese von Isoprenmolekülen. Die beteiligten Gene *dxr*, *ygbP*, *ychB*, *ygbB*, *gcpE* und *lytB* wurden mittlerweile umbenannt in *ispC*, *ispD*, *ispE*, *ispF*, *ispG*, *ispH*. Die Gene von *ispD* und *ispE* sind durch eine Umrahmung hervorgehoben. Orthologe dieser beiden Gene in *S. aureus* wurden in dieser Arbeit untersucht.

**1**: Pyruvat;  
**2**: D-Glyceraldehyd-3-Phosphat;  
**3**: 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat;  
**4**: 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat;  
**5**: 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol  
**6**: 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol-2-Phosphat  
**7**: 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphate  
**8**: 1-Hydroxy-2-Methyl-2-Butenyl-4-Diphosphat  
**9**: Isopentenylpyrophosphat  
**10**: Dimethylallylpyrophosphat

(Abbildung aus Gabrielsen et al., 2004)

## 2.9 Der Transkriptionsfaktor NusG

Das Protein NusG ist involviert bei der Elongation und Termination der RNA-Transkription (Burns et al., 1995; Burns et al., 1998; Li et al., 1993; Sullivan and Gottesmann, 1992). Man unterscheidet zwischen intrinsischen Terminatoren und Rho-abhängigen Terminatoren. An intrinsischen Terminatoren bildet sich in der transkribierten RNA einer Haarnadelschleife aus, der Stiel der Haarnadelschleife besteht hauptsächlich aus den Basenpaarungen G:C. Die Haarnadelschleife wird gefolgt von etwa 6 Uridinresten. Die RNA-Polymerase kann die Termination der Transkription an dieser Terminatorstruktur in vitro ohne zusätzliche Faktoren beenden. Bei Rho-abhängigen Terminatoren kann die Termination nur in Gegenwart des für *E. coli* essentiellen Rho-Proteins stattfinden. Die DNA-Sequenz für Rho-abhängige Terminatoren lässt sich nicht eindeutig festlegen. Ein Merkmal für Rho-abhängige Terminatoren ist eine Sequenz aus etwa 50- 90 Basen upstream der Terminationsstelle, die hauptsächlich aus C-Resten besteht und kaum G-Reste aufweist. Im zellulären System beeinflussen jedoch weitere Faktoren sowohl die Termination an intrinsischen Terminatoren als auch an Rho-abhängigen Terminatoren (Henkin 1996; Squires and Zaporozjets, 2000). Der Transkriptionsfaktor NusG spielt in *E. coli* vermutlich hauptsächlich bei der Rho-abhängigen Termination der Transkription eine Rolle (Li et al., 1993; Sullivan und Gottesmann, 1992). Das Protein NusG interagiert direkt mit dem Rho-Hexamer und der RNA-Polymerase (Pasman und von Hippel, 2000; Li et al., 1993; Li et al., 1992). Die Wirkung von NusG scheint widersprüchlich zu sein, da NusG sowohl die Effizienz der Termination erhöht als auch die Antitermination an Rho-abhängigen Terminatoren positiv beeinflusst (Li et al., 1993; Torres et al., 2004). Bei der Transkription der *rrn* Operons in *E. coli* erhöht NusG die Transkriptionsrate und bewirkt zudem ein Überlesen der Rho-abhängigen Terminationssequenz. Diese Wirkung von NusG könnte auf bestimmte Sequenzen in der RNA (*boxA*) zurückzuführen sein, die zusammen mit NusG im Fall der *rrn*-Operons eine Antitermination bewirken (Burova et al., 1995; Zellars und Squires, 1999; Torres et al., 2004). Auch bei der Transkription der verzögert frühen Gene des Lamda-Phagen spielt die Antitermination eine entscheidende Rolle. Zusätzlich zu bestimmten Sequenzen in der transkribierten Phagen RNA (*boxA* und *boxB*) wird das Phagenprotein pN benötigt. Der bakterielle Transkriptionsapparat wird durch die Gegenwart des Proteins pN und der *boxA* und *boxB* Sequenz in der RNA so beeinflusst, dass die RNA-Polymerase über Rho-abhängige Terminatoren hinweg liest. Das pN-Protein wirkt dabei auf die Nus-Faktoren, darunter NusG ein (DeVito et al., 1994; Friedmann et al., 1995). Die Wirkung von NusG als Terminationsfaktor oder Anti-Terminationsfaktor

scheint daher von weiteren zellulären Komponenten und auch von der Sequenz in der transkribierten RNA abzuhängen. Eine mögliche regulatorische Rolle von NusG bei der Translation wird ebenfalls diskutiert, da die Translationsrate in NusG-ausgehungerten Zellen abnimmt (Zellers and Squires, 2000). Die genauen Interaktionen zwischen NusG mit der RNA-Polymerase, dem Rho-Protein und weiteren Transkriptionsfaktoren sowie dem Translationsapparat sind noch nicht aufgeklärt.

NusG ist in *E. coli* essentiell (Sullivan and Gottesman, 1992), nicht jedoch in *B. subtilis* (Ingham et al., 1999). Auch der Terminationsfaktor Rho scheint in dem gram-positiven Bakterium *B. subtilis* nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Das Protein Rho ist nur in geringen Mengen in *B. subtilis* vorhanden und ist im Gegensatz zu *E. coli* in *B. subtilis* ebenfalls nicht essentiell. Rho ist auch für *S. aureus* nicht essentiell (Washburn et al., 2001). Das Gen *rho* ist bislang das einzige bekannte Gen in einem gram-positiven Organismus, das durch Rho reguliert wird. Diese Autoregulation von Rho wird in *B. subtilis* nicht durch NusG beeinflusst (Ingham et al., 1999). Das Zusammenspiel zwischen Rho und NusG wie es in *E. coli* stattfindet scheint für *B. subtilis* keine essentielle Bedeutung zu haben. Bei der Regulation der Termination der Transkription gibt es in *E. coli* und in *B. subtilis* offensichtlich bedeutende Unterschiede. Dabei stellen auch die gram-positiven Bakterien hinsichtlich der Bedeutung von NusG keine einheitliche Gruppe dar. In *Streptomyces coelicolor* konnte *nusG* nicht zerstört werden (Puttikhunt et al., 1995). Die Frage der Essentialität von *nusG* in *S. aureus* sollte in dieser Arbeit geklärt werden.

### 2.10 Holliday Junction Endonukleasen

Das Protein SA1444 in *S. aureus* ist zu 27 % identisch mit YqgF, einer putativen Holliday Junction Resolvase aus *E. coli*. Das Protein YqgF aus *E. coli* zeigt, bei nur geringer Sequenzhomologie von 13 % identischen Aminosäuren, hohe strukturelle Ähnlichkeit mit der Nuklease RuvC (Aravind et al., 2000; Liu et al., 2003). RuvC codiert in *E. coli* für eine Nuklease, die die Überkreuzungspunkte von DNA-Strängen bei der homologen Rekombination (Holliday Junction) erkennt und schneidet. Mit Ausnahme der Spirochaeten sind YqgF-Orthologe in allen Bakterienarten, einschließlich der Mykoplasmen, zu finden (Aravind et al. 2000). Das zu YqgF orthologe Protein aus *B. subtilis* YrrK ist zu 58 % identisch zu SA1444 aus *S. aureus*. In *B. subtilis* und *E. coli* sind YrrK bzw. YqgF essentiell (Freiberg et al., 2001b; Freiberg, 2001a). Die Funktion dieser Proteine ist unbekannt. Aravind et al. (2000) schlagen vor, dass in den gram-positiven

Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, YqgF-Proteine die Funktion von RuvC übernehmen, da in dieser Bakteriengruppe keine RuvC homologen Proteine zu finden sind. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob SA1444 für *S. aureus* essentiell ist.

### 2.11 Nukleotidbindeproteine

Das Protein SA1857 ist zu 39 % identisch mit dem Protein Yjee aus *E. coli*. Das Protein SA1857 weist, ebenso wie Yjee, einen so genannten P-loop auf, der charakteristisch ist, für Nukleotid-bindende Proteine. Im P-loop des Enzyms, werden die Phosphat-Reste des zu bindenden Nukleotides gebunden. In Assays zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Yjee konnte eine ATPase Aktivität dieses Enzyms nachgewiesen werden, die jedoch sehr gering ist. Das gereinigte Protein Yjee aus *E. coli* weist eine hohe selektive Bindungsaffinität für ADP auf und eine geringe Bindungsaffinität für ATP. Andere Nukleotide, wie AMP, GDP, GMP, GTP, CMP, CDP, CTP, UMP, UDP, oder UTP, wurde nur gering, oder gar nicht von dem Protein Yjee gebunden (Allali-Hassani et al., 2004). Die Funktion der Yjee orthologen Gene ist unbekannt. Über die Funktion von Yjee wird derzeit nur spekuliert. In *H. influenzae* könnte die ATPase Yjee eine Rolle bei der Zellwandsynthese spielen (Telyakov et al., 2002). In *E. coli* wird eine Rolle von Yjee bei der Signaltransduktion, als DNA-bindendes Protein, oder als molekulares Chaperon vorgeschlagen (Allali-Hassani et al., 2004). Für keine dieser Spekulationen gibt es jedoch experimentelle Beweise. Homologe des Proteins Yjee sind in allen bakteriellen Genomen zu finden, kommen jedoch nicht in Archaeobakterien oder Eukaryonten vor. In *E. coli* ist dieses Protein essentiell (Freiberg et al., 2001b; Allali-Hassani et al., 2004). Eine Deletion des Yjee homologen Proteins YdiB in *B. subtilis* führt zu einer verringerten Wachstumsrate von etwa 50 % (Freiberg, 2001a). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das Yjee-Homologe Protein (SA1857) in *S. aureus* essentiell ist. Die Aminosäuren-Sequenz von SA1857 und YdiB aus *B. subtilis* sind zu 43 % identisch.

### 2.12 Konditionale Mutanten

Gene, die sich nicht deletieren lassen, sind wahrscheinlich essentiell und müssen in einem konditionalen Expressionssystem analysiert werden. In dem gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* sind bereits zahlreiche regulierbare Expressionssysteme entwickelt worden (Guzman et al., 1995; Zhang et al., 2000). In *S. aureus* wurde erst in den letzten 5 Jahren verstärkt nach geeigneten konditionalen Expressionssystemen gesucht. Bei den meisten

dieser Systeme wurden verschiedene induzierbare Promotor-Sequenzen vor das Zielgen integriert. So wurde zum Beispiel ein Integrationsvektor pMUTIN in Kombination mit dem Promotor Pspac, der auch in *B. subtilis* verwendet wird, zur konditionalen Gen-Expression in *S. aureus* eingesetzt (Zhang et al., 2000). Auch ein Xylose-induzierbarer Promotor oder ein Tetrazyklin-induzierbarer Promotor finden Anwendung (Rohrer et al., 1999; Zhang et al., 2000). Besonders erfolgreich erwies sich die Expression von Antisense-RNA Konstrukten, zahlreiche essentielle Gene konnten so in *S. aureus* identifiziert werden (Ji et al., 2001; Forsyth et al., 2002). Einige dieser beschriebenen Systeme sollten zur Untersuchung von essentiellen Genen in dieser Arbeit getestet werden. Zur Etablierung eines konditionalen Expressionssystems wurden zunächst Gene mutiert, deren essentielle Rolle im Wirt *S. aureus* bereits bekannt ist. Mit verschiedenen Expressionssystemen wurde versucht, konditionale Mutanten der  $\alpha$ -Kette der DNA-Polymerase III (*dnaE*) und der DNA-Ligase (*ligA*) in *S. aureus* herzustellen.

### 2.12.1 Die DNA-Ligase (*ligA*)

Die DNA-Ligase von *S. aureus* *ligA* ist zu 47 % identisch mit dem entsprechenden essentiellen Enzym in *E. coli*. In *S. aureus* konnte durch eine Temperatur-sensitive Mutante gezeigt werden, dass dieses Enzym essentiell ist (Dermody et al., 1979; Kaczmarek et al., 2001). DNA-Ligasen katalysieren die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende einer DNA-Kette und der 5'-Phosphatgruppe am Ende einer anderen. Dabei müssen die zu verknüpfenden Enden zu einem doppelhelikalen Molekül (oder zu zweien) gehören. Diese Ligationsreaktion ist nicht nur bei der Replikation der DNA essentiell, sondern auch bei Reparatur- und Rekombinationsprozessen in der DNA von Bedeutung (Dermody et al., 1979; Timson et al., 2000, 1999). Die DNA-Ligase Familie kann in 2 Klassen unterteilt werden. Zum einen in Enzyme, die ATP als Cofaktor verwenden, und in Enzyme, die  $\text{NAD}^+$  als Cofaktor benötigen. In Eukaryonten und Phagen kommen ATP-abhängige Ligasen vor, wohingegen in Prokaryonten nur NAD-abhängige Ligasen beschrieben sind (Kaczmarek et al., 2001). Aufgrund dieser unterschiedlichen Eigenschaften der eukaryontischen und prokaryontischen Ligasen und aufgrund der Essentialität dieses Enzyms, bietet die DNA-Ligase gute Voraussetzungen, als selektives Ziel neuer Antibiotika.

### 2.12.2 Die $\alpha$ -Kette der DNA-Polymerase III (*dnaE*)

Die Vorgänge bei der DNA-Replikation wurden zuerst in *E. coli* untersucht. Die Synthese der DNA an der Replikationsgabel wird von dem Holoenzym der DNA-Polymerase III bewerkstelligt, die aus mindestens 10 verschiedenen Untereinheiten besteht. Die  $\alpha$ -Kette der DNA-Polymerase III besitzt die eigentliche DNA-polymerisierende, katalytische Aktivität und wird in *E. coli* vom *dnaE*-Gen codiert (McHenry, 1988; Maki et al., 1985). In Gram-positiven Bakterien, wie *B. subtilis*, *S. aureus* und *Streptococcus pyogenes* sind zwei Gene zu finden, die für die  $\alpha$ -Kette der DNA-Polymerase III codieren, *polC* und *dnaE*. Auch homologe Gene der anderen Untereinheiten des DNA-Polymerase-Gesamtenzyms sind zu finden, so dass man davon ausgeht, dass die DNA-Replikation in gram-positiven und gram-negativen Organismen ähnlich abläuft (Bruck und O'Donnell, 2000; Klemperer et al., 2000). Beide Gene, sowohl *polC* als auch *dnaE* sind in *S. aureus* und *B. subtilis* essentiell (Inoue et al., 2001; Dervyn et al., 2001). Beide Enzyme sind an der Elongationsreaktion der DNA-Replikation beteiligt. Vermutlich wird eine Polymerase ( $\alpha$ -Kette) zur Synthese des Leitstranges und die andere zur Synthese des Folgestranges benötigt (Dervyn et al., 2001). Zusätzlich könnte *dnaE* in gram-positiven Bakterien auch bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen, zumal *B. subtilis* und *S. aureus* keine DNA-Polymerase II besitzen, die in *E. coli* (neben DNA-Polymerase I, III, IV, V) vermutlich an Reparaturprozessen der DNA beteiligt ist (Dervyn et al., 2001; KEGG Datenbanksuche). Das Protein DnaE aus *S. aureus* zeigt 33 % identische Aminosäuren zu DnaE aus *E. coli* und 41 % identische Aminosäuren zu DnaE aus *B. subtilis*. Die  $\alpha$ -Kette PolC der DNA-Polymerase III ist typisch für gram-positive Bakterien und weist neben der DNA-Polymerase-Aktivität auch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität auf (Low et al., 1976; Inoue et al., 2001). Die  $\alpha$ -Kette DnaE der DNA-Polymerase III aus *E. coli* besitzt nur Polymeraseaktivität, die 3'-5'-Exonukleaseaktivität ist in einer extra Untereinheit ( $\epsilon$ ), die von *dnaQ* codiert wird, untergebracht. Die Identität zwischen PolC aus *S. aureus* und dem DnaE-DnaQ-Komplex aus *E. coli* beträgt nur 16 % (Klemperer et al., 2000). PolC und DnaE aus *S. aureus* zeigen nur 21 % identische Aminosäuren. Jedoch gibt es Regionen in PolC und DnaE mit über 42 % Sequenzidentität, die essentielle Motive in DNA-Polymerasen bilden (Inoue et al., 2001).

### 2.13 Zielsetzung dieser Arbeit

Die soeben beschriebenen 10 Gene sollten auf ihre Essentialität in *S. aureus* untersucht werden. Zunächst wurde daher versucht jedes dieser Gene in *S. aureus* zu deletieren. Dabei sollte die codierende Sequenz des Zielgens durch die Sequenz einer Antibiotika (*ermB*)-Resistenzkassette ersetzt werden. Die erhaltenen Deletionsmutanten wurden phänotypisch untersucht, um so Hinweise auf die Funktion der bislang unbekanntenen Gene zu erhalten. Die Deletionsmutanten wurden außerdem in einem Sepsismodell im Tierversuch getestet, um die Bedeutung der Gene in vivo untersuchen zu können. Putativ essentielle Gene, die nicht deletiert werden konnten, sollten in einem konditionalen Expressionssystem überprüft werden. Verschiedene konditionale Expressionssysteme wurden daher auf ihre Funktionalität in *S. aureus* überprüft. Dazu wurden zunächst die essentiellen Gene *ligA* und *dnaE* mutiert. Ein konditionales Expressionssystem sollte in *S. aureus* etabliert werden, dass sich auch im Tierversuch anwenden lässt.

### 3. Material

#### 3.1 Geräte

Autoklaven	Integra Bioscience, H+P Varioklav
Brutschränke	Heraeus, Memmert
Elektrophoresekammern	Hartenstein (Würzburg), Bio Rad
Elektroporator	Bio Rad
Mini-Proteingelkammer	Protean II xi, BioRad
Filme	Hyperfilm ECL, Amersham
Film-Entwicklung	Agfa (Curix60)
FastPrep F120	BIO 101, Savant
Feinwaage	Chyo Balance Corp (Chyo II-180)
Heizblöcke	Liebisch
Hybridisierungsöfen	Hybaid (Mini 10)
Magnetrührer	GLW (M21)
Microarray Scanner	Genepix 4000B, Molecular Dynamics
Mikroliterpipetten	Gilson, Eppendorf
Mikroskope	Leitz, Zeiss
Mikrowellengerät	Siemens
Netzgeräte	Consort E455, Bio Rad Power Pac 300
PCR-Thermocycler	Biometra (T3 Thermocycler)
pH-Meter	Metrohm-Herisau, WTW pH 523
Phosphoimager	Amersham Bioscience (Thyphoon 4600)
Photometer	Pharmacia, Amersham Bioscience
Real-Time PCR Cycler	iCycler (MyiQ), BioRad
Schüttelinkubator	Braun-Melsungen(Clim-O-Shake)
	New Brunswick Scientific Innova 4300
Sequenzierer	MWG-Biotech (LiCor Modell 4000),
	Perkin Elmer (ABI PRISM)
Speedvac-Concentrator	UNIVAPO 150H Uniequipe
Sterilarbeitsbank	Nuair II Type A/B3, Heraeus
	Lamin Air HBB2448, Flow Gelair
Tisch-Mixer	Eppendorf, Mixer 5432
UV-Fotoanlage	Mitsubishi, BioRad
Vakuumpumpe	Pharmacia LKB, Vacu, Gene Pump
Vortexer	GLW (L46)
Waagen	Ohaus Navigator, Kern 470
Wasserbad	GFL 1083, Memmert
Zentrifugen	Heraeus, Megafuge 1.0 R
	Eppendorf, Zentrifuge 5415C

### 3.2 Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Enzyme

Sämtliche Verbrauchsmaterialien lieferten die Firmen ABgene, BioRad, Eppendorf, Falcon, Greiner, Peqlab, Millipore, Nalgene, Sarstedt und Schleicher & Schuell. Die benötigten Chemikalien, Antibiotika, Enzyme und Nährstoffe wurden von den Firmen, Appllichem, Amersham, Boehringer, BioRad, Difco, Invitrogen (Gibco-BRL), MBI-Fermentas, Merck, New England Biolabs, Oxoid, Pharmacia, Promega, Peqlab, Qiagen, Roth, Roche, Serva, Stratagene und Sigma bezogen.

#### Folgende Kits wurden verwendet:

- ECL, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Deutschland
- GENECLEAN III Kit, Q-BIO gene, Europe
- iQ, SYBR Green Supermix, BioRad, München, Deutschland
- PCR-Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
- pGEM-T Vektor System, Promega, Madison, USA
- pCRT7/CT-TOPO TA Expression Kit, Invitrogen, Carlsbad, California
- SuperScript III Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, California
- RNeasy Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
- Roti-Nanoquant, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Sequi Therm DNA Sequencing Kit-LC; Epicentre Technologies
- Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits with AmpliTaq DNAPolymerase, FS; Applied Biosystems

### 3.3 Antibiotika

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

<b>Antibiotika</b>	<b>Stocklösung (gelöst in)</b>
Ampicillin	100 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Bacitracin	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Cefepim	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Chloramphenicol	10 mg/ml (100 % EtOH)
Ciprofloxacin	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Erythromycin	10 mg/ml (100 % EtOH)
Rifampicin	10 mg/ml (Methanol)
Spectinomycin	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)

Fortsetzung Tabelle 2

Teicoplanin	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Tetrazyklin	10 mg/ml (70 % EtOH)
Novobiocin	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Methicillin	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Nitrofurantoin	10 mg/ml (DMSO)
Nalidixinsäure	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Vancomycin	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)

### 3.4 Medien und Agarplatten

Medien für Flüssigkulturen und Agarplatten wurden bei 120 °C für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Zusätze wurden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen der Lösungen auf 50 °C zugegeben.

LB-Medium:                    10 g Bactotrypton  
    5 g Hefeextrakt  
    5 g NaCl  
    ad 1 l dH<sub>2</sub>O

B-Medium:                    10 g Bactotrypton  
    5 g Hefeextrakt  
    5 g NaCl  
    1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
    ad 1 l dH<sub>2</sub>O

TSB-Medium:                30 g Trypticase Soy Broth  
    ad 1 l dH<sub>2</sub>O

Agarplatten: zu den jeweiligen Medien wurden 15 g Agar pro Liter Medium zugegeben

LB-X-Gal-Platten:            1 l LB-Medium  
    15 g Agar

autoklavieren, auf 50 °C abkühlen lassen,  
 500 µl IPTG (100mM)  
 3 ml 2 % X-Gal (in Dimethylformamid) zusetzen

Blutagarplatten: 5 % Kaninchenblut oder Schafsblut zu LB-Agar geben,  
 nachdem dieser auf 50 °C abgekühlt ist.

### 3.5 Puffer und Lösungen

Für Enzymreaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und Lösungen verwendet. Alle selbst angesetzten Puffer und Lösungen sind bei den jeweiligen Methoden beschrieben. Für alle Lösungen und Enzymreaktionen wurde destilliertes Wasser (dH<sub>2</sub>O) verwendet.

### 3.6 Bakterienstämme

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>GyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ <sup>-</sup> , Δ( <i>argF-lac</i> )U169, Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15	BRL, Bethesda Research Laboratories
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm <sup>r</sup> ) <i>E. coli</i> Stamm zur Überexpression von Proteinen	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP10F <sup>'</sup>	F <sup>'</sup> [ <i>lacI<sup>q</sup></i> , Tn10(Tet <sup>R</sup> )] <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-</i> <i>mcrBC</i> )Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ <i>lacX74recA1deoRaraD139</i> Δ( <i>ara-</i> <i>leu</i> )7697 <i>galUgalK</i> rpsL(Str <sup>R</sup> ) <i>endA1nupG</i>	Invitrogen

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete *S. aureus* Stämme

<i>S. aureus</i> Stamm	Eigenschaft	Herkunft/ Referenz
8325	NCTC 8325; Wildtyp, mit 11 bp Deletion in <i>rsbU</i>	Labor- Stammsammlung
RN4220	NCTC 8325-4-r; Restriktionsmutante mit 11 bp Deletion in <i>rsbU</i>	Kreiswirth et al., 1983

Fortsetzung Tabelle 4

MA12	MSSA, klinisches Isolat, Nasenabstrich	Rachid et al., 2000
MA12.2	<i>sigB</i> -Deletionsmutante von MA12	Rachid et al., 2000
COL	MRSA, hohe homogene Methicillin-Resistenz, Tetrazyklin-Resistenzplasmid	Tübingen
8325 $\Delta$ <i>ywcG</i>	8325 mit <i>ywcG</i> Deletion, <i>ermB</i> -Kassette Insertion, Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
8325 $\Delta$ <i>pknB</i>	8325 mit <i>pknB</i> Deletion, <i>ermB</i> -Kassette Insertion, Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
COL $\Delta$ <i>pknB</i>	COL mit <i>pknB</i> Deletion, <i>ermB</i> -Kassette Insertion, Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
8325 $\Delta$ <i>topB</i>	8325 mit <i>topB</i> Deletion, <i>ermB</i> -Kassette Insertion, Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
8325 $\Delta$ <i>polA</i>	8325 mit <i>polA</i> Deletion, <i>ermB</i> -Kassette Insertion, Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
8325 $\Delta$ <i>ychB</i>	8325 mit <i>ychB</i> Deletion, <i>ermB</i> -Kassette Insertion, Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
8325 $\Delta$ <i>ygbP1</i>	8325 mit <i>ygbP1</i> Deletion, <i>ermB</i> -Kassette Insertion, Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
8325 $\Delta$ <i>ydiB</i>	8325 mit <i>ydiB</i> Deletion, <i>ermB</i> -Kassette Insertion, Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
RN4220 wt + pMJ	RN4220, Wildtyp mit Repressorplasmid pMJ8426 ( <i>lacI</i> , <i>tet</i> )	diese Arbeit
RN4220 Pspac- <i>ligA</i> + pMJ	RN4220, konditionale Mutante von <i>ligA</i> , Pspac- <i>ligA</i> Fusion, Cm <sup>R</sup> , mit Repressorplasmid pMJ8426 ( <i>lacI</i> , <i>tet</i> )	diese Arbeit
RN4220 Pspac- <i>ygbP2</i> + pMJ	RN4220, konditionale Mutante von <i>ygbP2</i> , Pspac- <i>ygbP2</i> Fusion, Cm <sup>R</sup> , mit Repressorplasmid pMJ8426 ( <i>lacI</i> , <i>tet</i> )	diese Arbeit
8325, <i>xylR-nusG</i>	8325, Fusion der <i>xylR</i> -Regulatorregion mit <i>nusG</i> , Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
RN4220, Antisense <i>ligA1/3</i>	RN4220 mit pRB473- <i>xylR-ligA1/3</i> (750 bp 5'- <i>ligA</i> in Antisense-Orientierung downstream <i>xylR</i> ), Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
RN4220, Antisense <i>ligA1/2</i>	RN4220 mit pRB473- <i>xylR-ligA1/2</i> (2070 bp <i>ligA</i> in Antisense-Orientierung downstream <i>xylR</i> ), Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
RN4220 Antisense <i>dnaE</i>	RN4220 mit pRB473- <i>xylR-dnaE</i> (750 bp 5'- <i>dnaE</i> in Antisense-Orientierung downstream <i>xylR</i> ), Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit

### 3.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-ARK, MWG-Biotech und Qiagen Operon bezogen. Die für die einzelnen Arbeiten verwendeten Oligonukleotide sind in den Tabellen 5-12 aufgelistet.

Tab. 5: Oligonukleotide zur Herstellung der Deletionsmutanten

Bezeichnung	Sequenz: 5'-3'	Annealing-Temperatur	<sup>1</sup> relative Position
<i>pknBPstI</i>	AAC TGC AGA GTG ACG ATA TTG ATG AGG G	52 °C	+1631
<i>pknB2BamHI</i>	CGG GAT CCA ATA AAT TCA GTC TCA TAG CC	52 °C	+2649
<i>pknBEcoRI</i>	CGG AATTCT ATC ACC TTC AAT AGC CGC G	52 °C	-5
<i>pknBHindIII</i>	CCC AAG CTT GTT TGG TGG TGT GAA TGA CC	52 °C	-1012
<i>topBEcoRI</i>	CGG AAT TCA GCC ATT AAT ACA CCT ACC	50 °C	+3359
<i>topBPstI</i>	AAC TGC AGA AGG AGC ATC CAT TCG TGA A	50 °C	+2233
<i>topBBamHI</i>	CGG GAT CCG CAT CAG CAA TAT CTC TTG CG	50 °C	+55
<i>topBHindIII</i>	CCC AAG CTT GCT AAT GAT GTA CTG TAG GG	50 °C	-1107
<i>ywcGEcoRI</i>	CGG AAT TCC AGT TTC TCA CTC ATT ACC	50 °C	-140
<i>ywcGXbaI</i>	TGC TCT AGA TTA CGA ACA TAT TGA GCT GC	50 °C	-976
<i>ywcGPstI</i>	AAC TGC AGT ACA GCG ATA GCA AGA TAC C	50 °C	+745
<i>ywcGBamHI</i>	CGG GAT CCC ATG GTG AAT TGC TTA AGC G	50 °C	+1594
<i>polAXbaI</i>	GCT CTA GAG TTA GAC CAA TAA CTT TCG G	50 °C	+3571
<i>polABamHI</i>	CGG GAT CCG ATA TCA TTA AAC TGG CAA TGG	50 °C	+2418
<i>polAPstI</i>	AAC TGC AGA CTG CAT TGG TAT GAA TGC C	50 °C	+115
<i>polAHindIII</i>	CCC AAG CTT ACG TCA CTT CCA TAT GGT GTC	50 °C	-1022
<i>ychBBamHI</i>	CGG GAT CCA GAC TAT TAG GAT AGA AGG G	50 °C	+834
<i>ychBXbaI</i>	GCT CTA GAC ATT CAC AAC TGT TGC G CG	50 °C	+1772
<i>ychBPstI</i>	AAC TGC AGT CCG CCC TCT TTT CGT AT C	50 °C	-3
<i>ychBHindIII</i>	CCA AG T TTGATGCAGAGAACTGAACCG	50 °C	-937
<i>ygbP1BamHI</i>	CGG GAT CCT GCA TAA ATC ATG TTG C	50 °C	+26
<i>ygbP1HindIII</i>	CCC AAG CTT GAT ATT GCA ACA TCA TTG GGC	50 °C	-964
<i>ygbP1EcoRI</i>	CGG AAT TCA CGC TTG GAC GAT ATC TTG C	50 °C	+1690
<i>ygbP1PstI</i>	AAC TGC AGT AAA GTG ACA ACA CCG TAT G	50 °C	+659
<i>ygbP2BamHI</i>	CGG GAT CCC ATT CTT GAG CCT ATA CC	50 °C	+47
<i>ygbP2HindIII</i>	TAG AAG CTT TGC GTC AAG CG	50 °C	-723
<i>ygbP2PstI</i>	AAC TGC AGG TTC GAC TTG TAA AAG GTG AG	50 °C	+617
<i>ygbP2EcoRI</i>	CGG AAT TCT CAA ATG TTA AGC CTT CAG G	50 °C	+1380
<i>ydiBBamHI</i>	CGG GAT CCG ATT ATC CAT TGT TCA ATC G	50 °C	-7
<i>ydiBHindIII</i>	CCC AAG CTT TCC ATG TGC AGA TAA GCC	50 °C	-944
<i>ydiBPstI</i>	AAC TGC AGA TTG AGT TGT TCG CGC AAG G	50 °C	+420
<i>ydiBKpnI</i>	GGG GTA CCG AGC TTG ATC GAT AAC AAT CC	50 °C	+1332
<i>yrrKBamHI</i>	CGG GAT CCT CTA CTA CCG ACA TCG AGT C	50 °C	+41
<i>yrrKEcoRI</i>	CGG AAT TCG TAA GTG AGT CAG GTA CAG G	50 °C	-907
<i>yrrKPstI</i>	AAC TGC AGG TGA TTG ATA AAA TGG CAG CG	50 °C	+369
<i>yrrKHindIII</i>	CCC AAG CTT CGT TTC ATT ACG CTC TAT CG	50 °C	+1294
<i>nusGBamHI</i>	CCG GAT CCA TGT GGT CGC GCT TTT AGA G	50 °C	+626

Fortsetzung Tabelle 5

<i>nusGXbaI</i>	GCTCTAGACATTGTTTGGTTTCGCCTGAACC	50 °C	+1009
<i>nusGPstI</i>	AAC TGC AGT ATG CAC TGC ATA CCA ACG C	50 °C	+42
<i>nusGEcoRI</i>	CGG AAT TCT ATA CGG ATG TAT AGG TCG G	50 °C	-911

Die relative Position des 5'-Endes der Primer ist auf das Start-Codon, meist ATG bezogen. Dabei hat A die Position +1, upstream Regionen haben ein negatives Vorzeichen.

Tab. 6: Oligonukleotide zur Herstellung konditionaler Mutanten mit Hilfe des Xylose-regulierten Systems

Bezeichnung	Sequenz 5`-3`	Annealing-Temperatur	Relative Position
<i>dnaEBamHI</i>	CGG GAT CCG CTG GGA TGA ATT TGA GCA AC	50 °C	-72
<i>dnaEEcoRI</i>	CGG AAT TCG TGT AAC TAA GAC ACG CCA C	50 °C	+766
<i>secEBamHI</i>	CGG GAT CCG TTC AAA GGA TTT GGA GGT TG	50 °C	-221
<i>nusGEcoRI</i>	CGG AAT TCC ACA TAC CAT GAT TCA TCT	50 °C	+249

Tab. 7: Oligonukleotide zur Herstellung konditionaler Mutanten mit Hilfe des pMUTIN4/Pspac-Systems

Bezeichnung	Sequenz 5`-3`	Annealing-Temperatur	Relative Position
<i>dnaEEcoRI2</i>	CGG AAT TCC TTA ACT AAT AGA AAG GGG CC	50 °C	-29
<i>dnaEBamHI2</i>	CGG GAT CCG TGT AAC TAA GAC ACG CCA C	50 °C	+766
<i>pknBEcoRI</i>	CGG AAT TCG TTA CTT TCA TAC TCG CGG	50 °C	-38
<i>pknBBamHI</i>	CGG GAT CCT GTA CAT TCA TCC GTT GCC	50 °C	+571

Tab. 8: Oligonukleotide zur Erstellung konditional letaler Mutanten mit Hilfe von Antisense-RNA

Bezeichnung	Sequenz 5`-3`	Annealing-Temperatur	Relative Position
<i>dnaEEcoRI2</i>	CGG AAT TCC TTA ACT AAT AGA AAG GGG CC	50 °C	-29
<i>dnaEBamHI2</i>	CGG GAT CCG TGT AAC TAA GAC ACG CCA C	50 °C	+766
<i>ligA1EcoRI</i>	CGG AAT TCT TGT TAG CGC AAT TTG CAC C	50 °C	-45
<i>ligA2BamHI</i>	CGG GAT CCT ACG CTT CAT CGA CAT ACC C	50 °C	+2024
<i>ligA3BamHI</i>	CGG GAT CCA TGC TTC ACT TTG CGA ACG C	50 °C	+705

Tab. 9: Oligonukleotide zur Herstellung konditional letaler Mutanten mit Hilfe von pLL30/Pspac/pMJ8426

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Annealing-Temperatur</b>	<b>Relative Position</b>
<i>ligAEcoRI</i> (pLL)	CGG AAT TCA AGG AGG ATT AAG GGA TGG C	50 °C	-15
<i>ligABamHI</i> (pLL)	CGG GAT CCG CTC TTG ATA CAG TTG TAC C	50 °C	+1044
<i>ligAXhoI</i> (pLL)	CCG CTC GAG CCA TAC ACA ATG GTT GGT GG	50 °C	-1084
<i>ligASalI</i> (pLL)	ACG CGT CGA CAG CCA TCC CTT AAT CCT CC	50 °C	+6
<i>ygbP2Eco30</i>	CGG AAT TCG ATA TAG TTG AAT GGA GGA AG	50 °C	-26
<i>ygbP2Bam30</i>	CGG GAT CCA ATA CGA CCT CAC CAA CAC C	50 °C	+924
<i>ygbP2Sal30</i>	ACG CGT CGA CTT CCT CCA TTC AAC TAT ATC	50 °C	-7
<i>ygbP2Xho30</i>	CCG CTC GAG TAT CTA GTG TCA CCT AAT CC	50 °C	-980

Tab. 10: Oligonukleotide für PCR-Analysen, Reverse Transkription und Sonden

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Annealing-Temperatur</b>
<i>cat2</i>	CGA CGG AGA GTT AGG TTA TTG G	52 °C
<i>cat3</i>	GTC ATT AGG CCT ATC TGA C	52 °C
<i>erm10</i>	ACA CCT GCA ATA ACC GTT ACC	50 °C
<i>erm5</i>	CCA TAC CAC AGA TGT TCC	50 °C
<i>erm3</i>	CGG TGA CAT CTC TCT ATT GTG	50 °C
<i>erm4</i>	GGA AGC TGT CAG TAG TAT ACC	50 °C
<i>topBSo1</i>	GAA ATC TTC ACT TCA TCG CC	50 °C
<i>topBSo2</i>	TCC GTC GAT TAT GGA TTA GC	50 °C
<i>topB3</i>	CGT ATT CAG GTG ACG ATG GC	50 °C
<i>pknBSo1</i>	GCT TCC TCC TTA GGT AAA CC	50 °C
<i>pknBSo2</i>	AAA CTG CAG TTA GCA TTG CG	50 °C
<i>pknBSo3</i>	AAG ATG AAG TGC GAT CAC GC	50 °C
<i>pknBSo4</i>	GTA CTA TAA GTC CAG CTG GC	50 °C
<i>pknBSo5</i>	ACA GAT AAA CGT GTG AGT CC	50 °C
<i>pknBSo6</i>	GAT TGA GAA ATC ACA TCA CCC	50 °C
<i>pknBSo7</i>	TTA CAT CAG GTG TCT CTT CG	50 °C
<i>pknBSo8</i>	GAC AAC AGA TGT ACG TAA GG	50 °C
<i>yloO1</i>	GTT CTG TGT GAT GGT ATG GG	50 °C
<i>yloO2</i>	TCG AAT GGT TAT CTA ATG CC	50 °C
<i>dnaERT1</i>	CAC TTG CCA TAA CTG ACA CC	50 °C
<i>dnaERT2</i>	CCA ACA TCT CTA GCA ACT GC	50 °C
<i>ligASo1</i>	TCC ACA ACT TGG ACA ATG GG	50 °C
<i>ligASo2</i>	GAT GGA TAC TTC GTT CAA GG	50 °C
<i>ligART1</i>	GAG GAT AAT CCA TCT GTA CC	50 °C

Fortsetzung Tabelle 10

<i>ligART2</i>	TCA CCT GTT GTT CCA TCA CC	50 °C
<i>ygbP1So1</i>	ATG GGG AAC GTG CCA TTAC C	50 °C
<i>ygbP1So2</i>	AAT GAT TGT GGT GTT TGG CC	50 °C
<i>ygbP1So3</i>	CAA CCT GGT ATG ACT GTT GC	50 °C
<i>ygbP1So4</i>	TCG ACA CCT TCA CTA TGT CC	50 °C
<i>ygbP2So1</i>	GAA ATA CGC TGG TAT TCT AGC	50 °C
<i>ygbP2So2</i>	CAC CTT TTA CAA GTC GAA CC	50 °C
<i>ygbP1Spe11</i>	GGA CAA CAT GAT TTA TGC AGG	50 °C
<i>ychBSo1</i>	CTC ATT AAC GCA CCA TCT GC	50 °C
<i>ychBSo2</i>	AAT CTC GCA TAT CGT GCA GC	50 °C
<i>ychBSo3</i>	AAT CAG ATC CTG CTT CTT CC	50 °C
<i>ychBSo4</i>	CGC TTA AAT GCT GAA GTA GG	50 °C
<i>polASo1</i>	TAT AGC GTC GAC GAT GTA GC	50 °C
<i>polASo2</i>	GAT CAA CGT ATC CAT ACA CG	50 °C
<i>polASo3</i>	TTC AGA AGT GTA TAC AAC CC	50 °C
<i>polASo4</i>	CAA CAA GTT TCA AAT AAT CAA GG	50 °C
<i>16rRNAup</i>	TTG CTT CTC TGA TGT TAG CG	55 °C
<i>16rRNAdown</i>	TCT AAT CCT GTT TGA TCC CC	55 °C
<i>ywcGupPEx1</i>	AGC AAA CCT TCC GTT GAA CC	50 °C
<i>ywcGupPEx2</i>	AAG CTT GCG CTG TAA ATG G	50 °C
<i>ywcGSeq1</i>	GAT TTC ACT GGA CAA CGT GC	50 °C
<i>ywcGSeq2</i>	AGG ATA GAA GCA TAC TAC GC	50 °C
<i>ywcGSo1</i>	GGT AAC TGC TGA AGA TAT GG	50 °C
<i>ywcGSo2</i>	GAA CAT CTC AAT TTG CTG CG	50 °C
<i>ywcGRNASo1</i>	AAT GCT GCA TCG ATT GC ACC	50 °C
<i>ywcGRNASo2</i>	GTA AAG TAT CGA GGA GTG GG	50 °C
<i>ermBPstIpolA</i>	AAC TGC AGC GGT GAC ATC TCT CTA TTG TG	50 °C
<i>ermBBamHIpolA</i>	CGG GAT CCG GAA GCT GTC AGT AGT ATA CC	50 °C
<i>ermBEcoRI</i>	CGG AAT TCG GTG ACA TCT CTC TAT TGT G	50 °C
<i>ermBPstI</i>	AAC TGC AGG GAA GCT GTC AGT AGT ATA CC	50 °C

Tab. 11: Oligonukleotide zur Überexpression von NfrA (YwcG)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5`-3`</b>	<b>Annealing-Temperatur</b>
TrywcGup	ATG TCA GAA CAT GTA TAT AAT CTT GTG	50 °C
ywcGdown	TCG CTG TAT TAA GCC TGA TT	50 °C

Tab. 12: Oligonukleotid für „Primer Extension“-Analyse

Bezeichnung	Sequenz 5`-3`	Modifikation	Annealing-Temperatur
<i>ywcGPEx</i>	ACA ACG TCT TCA CTT AAA GG	5` IRD 800	52 °C

### 3.8 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab.13 dargestellt.

Tab. 13: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften; Insert (Länge, angefügte Restriktionsschnittstellen)	Herkunft/Referenz
pGEM-T	Vektorsystem für die direkte Klonierung von PCR-Produkten, Ap <sup>R</sup> , blau/weiß-Selektion	Promega
pBT2	Shuttle-Vektor, Ap <sup>R</sup> in <i>E. coli</i> , Cm <sup>R</sup> in <i>S. aureus</i>	Brückner et al., 1997
pBT2- <i>xylR</i>	Shuttle-Vektor, Ap <sup>R</sup> in <i>E. coli</i> , Cm <sup>R</sup> in <i>S. aureus</i> , Vektor mit <i>xylR</i> (1683 bp)	Ohlsen, 2001
pRB473	Shuttle-Vektor, Ap <sup>R</sup> in <i>E. coli</i> , Cm <sup>R</sup> in <i>S. aureus</i>	Brückner et al., 1992
pRB473- <i>xylR</i>	Shuttle-Vektor, Ap <sup>R</sup> in <i>E. coli</i> , Cm <sup>R</sup> in <i>S. aureus</i> , Vektor mit <i>xylR</i> (1683 bp)	Ohlsen, 2001
pLL30	Shuttle-Vektor, Spc <sup>R</sup> in <i>E. coli</i> , Tet <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> in <i>S. aureus</i>	Jana et al., 2000
pMJ8426	Shuttle-Vektor, Repressorplasmid, <i>lacI</i> -Repressor; Spc <sup>R</sup> in <i>E. coli</i> , Tet <sup>R</sup> , in <i>S. aureus</i>	Jana et al., 2000
pEC1	pUC18 mit <i>ermB</i> -Kassette, Ap <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	Brückner et al., 1992
pBCKS	Cm <sup>R</sup> , blau/weiß-Selektion	Stratagene
pCRT7/CT-TOPO	Expressionsplasmid, Ap <sup>R</sup>	Invitrogen
pMUTIN4	Ap <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> , <i>lacI</i> -Repressor	Vagner et al., 1998
pGEMT <i>pknB3/4</i>	pGEM-T; upstream Fragment <i>pknB</i> (1006 bp, <i>EcoRI/HindIII</i> )	diese Arbeit
pGEMT <i>ermB1</i>	pGEM-T; <i>ermB</i> (1364 bp, <i>EcoRI, PstI</i> )	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 13

pGEMT $pknB$ 1/2	pGEM-T; downstream Fragment $pknB$ (1018 bp, <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I)	diese Arbeit
pBCKS $\Delta pknB$	pBCKS; $pknB$ (upstream)- <i>ermB</i> - $pknB$ (downstream)	diese Arbeit
pKS $\Delta pknB$	pBT2 zur Deletion von $pknB$ ; $pknB$ (upstream)- <i>ermB</i> - $pknB$ (downstream)	diese Arbeit
pGEMT $topB$ 1/2	pGEM-T; $topB$ downstream Fragment (1126 bp, <i>Pst</i> I/ <i>Eco</i> RI)	diese Arbeit
pGEMT $topB$ 3/4	pGEM-T; $topB$ , upstream Fragment (1163bp, <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI)	diese Arbeit
pKS $\Delta topB$	pBT2 zur Deletion von $topB$ ; $topB$ (upstream)- <i>ermB</i> - $topB$ (downstream)	diese Arbeit
pGEMT $polA$ 1	pGEM-T; downstream Fragment $polA$ 1 (1152 bp, <i>Xba</i> I/ <i>Bam</i> HI)	diese Arbeit
pGEMT $polA$ 2	pGEM-T; upstream Fragment $polA$ 2 (1140 bp, <i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pGEMT $ermB$ 2	pGEM-T; <i>ermB</i> (1364bp, <i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> HI)	diese Arbeit
pKS $\Delta polA$	pBT2 zur Deletion von $polA$ ; $polA$ (upstream)- <i>ermB</i> - $polA$ (downstream)	diese Arbeit
pGEMTy $gbP$ 2A	pGEM-T, downstream Fragment $ygbP$ 2 (763 bp, <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I)	diese Arbeit
pGEMTy $gbP$ 2B	pGEM-T, upstream Fragment $ygbP$ 2 (770 bp, <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pKS $\Delta ygbP$ 2	pBT2 zur Deletion von $ygbP$ 2; $ygbP$ 2(upstream)- <i>ermB</i> - $ygbP$ 2(downstream)	diese Arbeit
pGEMTy $gbP$ 1A	pGEM-T, upstream Fragment $ygbP$ 1 (990 bp, <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pGEMTy $gbP$ 1B	pGEM-T, downstream Fragment $ygbP$ 1 (1031 bp, <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I)	diese Arbeit
pKS $\Delta ygbP$ 1	pBT2 zur Deletion von $ygbP$ 1; $ygbP$ 1(upstream)- <i>ermB</i> - $ygbP$ 1(downstream)	diese Arbeit
pGEMTy $chB$ A	pGEM-T, downstream Fragment $ychB$ (938 bp, <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I)	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 13

pGEMTy $ychB$ BB	pGEM-T, upstream Fragment $ychB$ (935 bp, <i>PstI/HindIII</i> )	diese Arbeit
pKSΔ $ychB$	pBT2 zur Deletion von $ychB$ ; $ychB$ (upstream)- <i>ermB</i> - $ychB$ (downstream)	diese Arbeit
pGEMTy $ycwG1$	pGEM-T; $ycwG$ downstream Fragment (850 bp, <i>BamHI/PstI</i> )	diese Arbeit
pGEMTy $ycwG2$	pGEM-T; $ycwG$ upstream Fragment (837 bp, <i>EcoRI/XbaI</i> )	diese Arbeit
pKSΔ $ycwG$	pBT2 zur Deletion von $ycwG$ ; $ycwG$ (upstream)- <i>ermB</i> - $ycwG$ (downstream)	diese Arbeit
pGEMT $dnaE1$	pGEM-T; 5`- Fragment $dnaE$ (838 bp; <i>BamHI/EcoRI</i> )	diese Arbeit
pKSX $dnaE$	pBT2- <i>xylR</i> , zur konditionalen Mutation von $dnaE$ ; 5`- $dnaE$ (838bp, <i>BamHI/EcoRI</i> )	diese Arbeit
pGEMT $nusG$	pGEM-T; 5`-Fragment $secE/nusG$ (470 bp, <i>BamHI/EcoRI</i> )	diese Arbeit
pKSX $nusG$	pBT2- <i>xylR</i> , zur konditionalen Mutation von $nusG$ ; $secE/5`-nusG$ (470 bp, <i>BamHI/EcoRI</i> )	diese Arbeit
pKSM $pknB$	pMUTIN4 zur konditionalen Mutation von $pknB$ ; 5`- $pknB$ (610 bp, <i>EcoRI/BamHI</i> )	diese Arbeit
pGEMT $dnaE2$	pGEM-T; 5`- $dnaE$ (795 bp <i>EcoRI/BamHI</i> )	diese Arbeit
pKSM $dnaE$	pMUTIN4 zur konditionalen Mutation von $dnaE$ ; 5`- $dnaE$ (795 bp, <i>EcoRI/BamHI</i> )	diese Arbeit
pGEMT $ligA1/3$	pGEM-T; 5`- $ligA$ (750 bp, <i>EcoRI/BamHI</i> )	diese Arbeit
pKSAL $ligA1/3$	pRB473- <i>xylR</i> ; Antisensekonstrukt 5`- $ligA$ (750 bp, <i>EcoRI/BamHI</i> )	diese Arbeit
pGEMT $ligA1/2$	pGEM-T; $ligA$ gesamt (2070 bp, <i>EcoRI/BamHI</i> )	diese Arbeit
pKSAL $ligA1/2$	pRB473- <i>xylR</i> ; Antisensekonstrukt $ligA$ gesamt (2070 bp, <i>EcoRI/BamHI</i> )	diese Arbeit
pKSAd $dnaE$	pRB473- <i>xylR</i> ; Antisensekonstrukt 5`- $dnaE$ (795 bp, <i>EcoRI/BamHI</i> )	diese Arbeit
pGEMT $ligAE/B$	pGEM-T; 5`- $ligA$ (1060 bp, <i>EcoRI/BamHI</i> )	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 13

pBCKSligAX/S	pBCKS; upstream Fragment <i>ligA</i> (1090 bp, <i>XhoI/SaII</i> )	diese Arbeit
pGEMTligAX/S	pGEM-T; upstream Fragment <i>ligA</i> (1090 bp, <i>XhoI/SaII</i> )	diese Arbeit
pKSL <i>ligA</i>	pLL30, zur Fusion von <i>ligA</i> mit Pspac	diese Arbeit
pGEMTygbP2E/B	pGEM-T; 5`- <i>ygbP2</i> (950 bp, <i>EcoRI/BamHI</i> )	diese Arbeit
pGEMTygbP2X/S	pGEM-T; upstream <i>ygbP2</i> (974 bp, <i>XhoI/SaII</i> )	diese Arbeit
pKSL <i>ygbP2</i>	pLL30, zur Fusion von <i>ygbP2</i> an Pspac	diese Arbeit
pKSP <i>ywcG</i>	pCRT7/CT-TOPO; Insert <i>ywcG</i> (753bp)	diese Arbeit
pKSPE <i>ywcG</i>	pGEM-T, mit 5`- <i>ywcG</i> und upstream Region zur Sequenzierung/Primer Extension (861 bp)	diese Arbeit

## 4. Methoden

### 4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

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

Die Bakterien wurden über Nacht unter dem Selektionsdruck des jeweiligen Antibiotikums in 5 ml LB-Medium angezogen. Von der Kultur wurden 2 ml abzentrifugiert und das Pellet wurde in 150 µl Puffer I aufgenommen. Anschließend wurde die gleiche Menge Puffer II dazugegeben, kurz geschwenkt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 150 µl Puffer III dazugegeben und durch Invertieren gemischt. Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis gestellt, um die chromosomale DNA und die Proteine zu fällen. Anschließend wurde 10 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgezogen und mit 315 µl (0,7 Volumen) Isopropanol versetzt, um die Plasmide zu fällen. Die DNA wurde bei einem weiteren Zentrifugationsschritt von 15 min bei 14 000 rpm pelletiert und anschließend erst mit 500 µl 100 % Ethanol und danach mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA ließ man bei Raumtemperatur trocknen und nahm sie anschließend in 50 µl dH<sub>2</sub>O auf. Die mit dieser Methode isolierte Plasmid-DNA konnte nun direkt für eine Restriktionsspaltung oder eine PCR verwendet werden.

<u>Puffer I:</u>	Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM
	RNase A	0,1 mg/ml
<u>Puffer II:</u>	NaOH	0,2 N
	SDS	1 %
<u>Puffer III:</u>	Natriumacetat pH 4,8	3 M

#### 4.1.2 Plasmid-Isolierung aus *S. aureus*

2 ml einer unter entsprechendem Selektionsdruck und in B-Medium mit 1 % Glycin gewachsenen ÜN-Kultur wurden abzentrifugiert und das Pellet in 150 µl Puffer I aufgenommen. Das Pellet wurde gut resuspendiert und zu dem Ansatz wurden 3 µl Lysostaphin (2 mg/ml) gegeben. Das Gemisch wurde für 15-30 min bei 37 °C inkubiert und

dabei gelegentlich invertiert. Anschließend wurden 150 µl Puffer II zugegeben, invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 150 µl Puffer III, und eine 10minütige Inkubation bei RT. Der Ansatz wurde für 10 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 900 µl L6-Puffer und 50 µl Diatomeenerde-Suspension vorgelegt wurden. Das Gemisch wurde gut gevortext und 1 min bei RT stehen gelassen. Die Diatomeenerde wurde von der Flüssigkeit, mit Hilfe eines „Vakuum-Igels“ (Bio Rad), über einen Filter abgetrennt und mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Flüssigkeitsreste wurden durch kurzes Zentrifugieren (30 s) entfernt. Die Filter wurden auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und mit 50 µl dH<sub>2</sub>O 5 min inkubiert. Die Filter wurden dann für eine Minute bei 14 000 rpm zentrifugiert. Die erhaltene Plasmid-DNA kann sofort für Restriktionsspaltungen oder andere Methoden verwendet werden. Bei den Puffern I-III handelt es sich um dieselben Lösungen, die für die Plasmid-Isolation aus *E. coli* verwendet wurden.

L6-Puffer: 100 ml 0,1 M Tris-HCl  
8,8 ml 0,5 M EDTA pH 8,0  
13,2 ml H<sub>2</sub>O  
2,6 ml Triton X-100  
120 g Guanidinthiocyanat

Waschpuffer: 10 ml 5M NaCl  
5 ml 1M Tris-HCL pH 7,5  
2,5 ml 0,5 M EDTA pH 8,0  
ad 250 ml dH<sub>2</sub>O  
+ 250 ml EtOH

Diatomeenerde: 10 g Diatomeenerde  
50 ml H<sub>2</sub>O  
500 µl HCL konz.

#### 4.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. aureus*

Eine Übernachtskultur wurde in 5 ml LB-Medium mit 1 % Glycin angezogen. Es wurden 2 ml der Kultur abzentrifugiert und mit 1 ml TNE gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl TNEX aufgenommen. Der Ansatz wurde nun mit 20 µl Lysostaphin (2 mg/ml) bei 37 °C für 30 min lysiert. Zu dem Ansatz wurden 40 µl Proteinase K (10 mg/ml) gegeben und das Gemisch wurde für 2 h bei 65 °C inkubiert. Man gab anschließend 1/5-Volumen 5 M NaCl zum Ansatz (entspricht ca. 116 µl) und fällte die DNA mit dem 2,5 fachen Volumen 100%igem Ethanol (ca. 1,4 ml). Das Gemisch wurde mehrfach invertiert

und für 15 min bei 12 000 rpm abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 70 % EtOH gewaschen, bei RT für ca. 1 h getrocknet und in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Lagerung von chromosomaler DNA erfolgt bei 4 °C.

<u>TNE:</u>	10 mM TrisHCl pH 8	<u>TNEX:</u>	TNE + 1 % Triton X-100
	10 mM NaCl		
	10 mM EDTA pH 8		

### 4.3 Konzentrations-Bestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte wie für RNA beschrieben. Der Quotient (Ratio) aus OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> sollte bei 1,8 liegen. Erhält man Werte < 1,6 so sind noch Proteinverunreinigungen vorhanden, liegt die Ratio bei 2,0 oder darüber, enthält der gemessene Ansatz RNA-Reste.

### 4.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mit dieser Methode können spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Die zwischen den Primer liegende DNA wird durch mehrere Zyklen von DNA-Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation exponentiell vermehrt. Außerdem kann an die Primersequenz eine gewünschte Restriktionsschnittstelle angefügt werden, die die nachfolgende Klonierung des PCR Produkts erleichtert. Standardmäßig wurden Oligonukleotid-Primer ausgewählt, die etwa 20 Nukleotide lang waren und einen GC-Gehalt von möglichst 50 % aufwiesen. Es ist außerdem darauf zu achten, dass das Primer-Paar keine längeren komplementären Abschnitte aufweist. Eine Standard-PCR enthielt folgende Komponenten:

10 x Taq-Polymerase-Puffer	5 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl
20 mM dNTP-Mix	1 µl
100 ng/µl Template-DNA	1 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
ad dH <sub>2</sub> O	50µl

Die PCR wurde im Thermocycler unter folgenden Richtbedingungen durchgeführt:

1. Denaturierung	„first delay“	2 min	95 °C
2. Denaturierung		30 s	95 °C
3. Primer-Annealing		60 s	45-60 °C
4. Primer-Elongation		30-120 s	72 °C (Richtwert : 60 s je 1000 bp)
5. Elongation	“last delay”	5 min	72 °C

Die Schritte 2-4 werden standardmäßig in 30 Zyklen durchlaufen. Ein Teil des Ansatzes (10 µl) wird dann zur Überprüfung der Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen. Falls eine Polymerase mit „proof reading“ Aktivität erforderlich war, wurde die Pfu-DNA Polymerase (Stratagene) oder der Triple Master Mix (Eppendorf) verwendet. Die genauen Protokolle sind dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen. Bei Bedarf wurden die PCR-Produkte mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und zur Klonierung oder als Sonde verwendet.

Formel zur Berechnung der Primer-Annealing-Temperatur:

$$T_m = 69,3 + 0,4 \% (\text{GC-Gehalt}) - 650 / \text{Länge des Oligos}$$

#### 4.5 Horizontale Gelelektrophorese

Lineare DNA-Fragmente können aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld der Größe nach in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Zur Herstellung eines Gels musste die Agarose im Laufpuffer aufgekocht werden, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Mit einem 1%igen Agarosegel erhält man eine optimale Auftrennung für Moleküle von 1-10 kb. Nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C goss man die Agarose luftblasenfrei in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit 1 x Laufpuffer überschichtet und der Kamm wurde entfernt. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Vol. Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Außerdem wurde ein DNA-Größenmarker mit aufgetragen (1 kb-Leiter, MBI-Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-100 Volt. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

<u>50 x Laufpuffer (TAE)</u>		<u>6 x DNA-Probenpuffer</u>	
Tris	242 g	0,125 g Bromphenolblau	
Eisessig	57,1 ml	0,125 g Xylencyanol	
0,5 M EDTA pH 8	100ml	7,5 g Ficoll(Type 400, Pharmacia)	
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l H <sub>2</sub> O	ad 50 ml dH <sub>2</sub> O	

#### **4.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die DNA wurde unter Verwendung des „Gene Clean Kits“ der Firma BIO 101 aus Agarosegelen eluiert. Das Prinzip dieses Kits beruht darauf, dass die Agarosescheiben geschmolzen werden und die DNA-Fragmente anschließend in Gegenwart eines Salzpuffers an eine spezielle Glasmatrix gebunden werden. Die entsprechende Bande wurde aus dem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Natriumjodid (NaI) vermischt, die Menge an NaI entspricht dem dreifachen Gewicht der Agarose-Bande. Das Gemisch wurde für 10 min bei 55 °C geschmolzen, dabei wurde gelegentlich gevortext. Anschließend wurden 5 µl Glasmilch zu dem Gemisch gegeben, der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Glasmilch mit „New Wash“-Puffer, kann die DNA mit H<sub>2</sub>O eluiert werden. Dazu wurde die Glasmilch mit 5 µl dH<sub>2</sub>O vermengt und nach 5-minütiger Inkubation bei RT abzentrifugiert. Die Zusammensetzung der Puffer ist dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

#### **4.7 Aufreinigung von PCR Fragmenten**

Zur Aufreinigung von PCR Fragmenten wurde der PCR-Purification Kit der Firma Qiagen verwendet. Der PCR-Ansatz wurde mit dem 5-fachen Volumen PB-Puffer vermischt und auf eine „PCR-Purification-Kit-Säule“ gegeben. Das Säulchen wurde kurz abzentrifugiert (45 s, 14 000rpm) und anschließend mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Das Säulchen wurde dann noch einmal kurz trocken zentrifugiert. Danach eluierte man die DNA mit 30-50 µl dH<sub>2</sub>O von der Säule.

#### **4.8 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung der DNA erfolgte entweder am LiCor-Sequenzierer von MWG oder am ABI-Sequenzierer von Perkin Elmer. Beide Methoden basieren auf der Didesoxymethode

nach Sanger. Bei der Sequenzierung am ABI sind die Didesoxynukleotide an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Bei der Methode am LiCor ist dagegen der Primer markiert. Genaue Angabe zur Durchführung der Sequenzierungsreaktion sind dem Handbuch der Hersteller zu entnehmen.

#### **4.9 Restriktion von DNA**

Die Spaltung von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA erfolgt mittels Restriktionsendonukleasen. Die eingesetzte Enzymmenge richtet sich nach der Menge an DNA, die im Reaktionsansatz vorhanden ist. Laut Definition ist eine Unit (U) des Restriktionsenzym in der Lage, bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen 1 µg DNA in einer Stunde vollständig zu spalten. Für jedes Enzym wird vom Hersteller der optimale Puffer mitgeliefert. Bei Verdau mit mehreren Enzymen müssen die Reaktionsbedingungen beider Enzyme berücksichtigt werden. Unter Umständen ist es bei mehreren Enzymen am günstigsten den Restriktionspuffer 10 x One-Phor-All Buffer (Amersham) zu verwenden. Falls die Optima der verwendeten Enzyme weit auseinander liegen, muss die DNA in zwei getrennten Schritten mit dem jeweiligen Enzym verdaut werden. Standardmäßig wurden 1-2 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtansatz von 20 µl, bei einer 1 x Endkonzentration des Puffers und 0,5 µl Restriktionsenzym verdaut. Der Ansatz wurde unter optimalen Bedingungen (meist 37 °C) für 2 Stunden inkubiert.

#### **4.10 Southern-Hybridisierung**

##### **4.10.1 Gelelektrophorese**

Zur Analyse chromosomaler DNA im Southern-Blot wurden 10 µg DNA mit dem Restriktionsenzym über Nacht bei geeigneter Temperatur (meist 37 °C) verdaut. Die gespaltene DNA wurde auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und im UV-Licht mit einem Lineal fotografiert. Die DNA wurde im Anschluss durch einen Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert.

##### **4.10.2 Kapillarblot**

Die Methode des Kapillarblots wird für den Northern-Blot beschrieben. Das DNA-Gel muss allerdings vor dem Blotten vorbehandelt werden. Das Gel wurde nacheinander in Lösung I (Depurinierungslösung), Lösung II (Denaturierungslösung) und Lösung III (Neutralisierungslösung) für je 15 min geschwenkt. Der Transfer der DNA auf die

Nylonmembran erfolgte im Anschluss mit 20 x SSC über Nacht. Die DNA wurde durch UV-Licht auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgt ebenfalls mit dem ECL-System (Amersham) und wie für den Northern-Blot beschrieben.

<u>Lösung I (Depurinierungslösung):</u>	0,25 N HCl
<u>Lösung II (Denaturierungslösung):</u>	0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl
<u>Lösung III (Neutralisierungslösung):</u>	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,5

#### 4.11 Klonierung von PCR Produkten: pGEM-T Vektor System

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde das pGEM-T Vektor System (Promega) verwendet. Der Vektor liegt in linearisierter Form vor und trägt 3' Thymidin-Überhänge. Dadurch ist eine besonders effiziente Ligation von PCR-Fragmenten mit 5'-Adenin-Überhängen möglich. Die Multiple Cloning Site des Vektors liegt in dem Gen für die  $\alpha$ -Peptid-Region des Enzymes  $\beta$ -Galaktosidase. Durch Insertionsinaktivierung ist eine einfache Blau/Weiß-Selektion auf IPTG/X-Gal Indikatorplatten möglich.

<u>Standardansatz:</u>	2 x T4 DNA Ligationspuffer	5 $\mu$ l
	pGEM-T Vektor	1 $\mu$ l
	PCR-Produkt	3 $\mu$ l
	T4 DNA-Ligase	1 $\mu$ l
	dH <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu$ l

Der Ansatz wurde gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Ligationsansatz kann dann für die Transformation eingesetzt werden.

#### 4.12 Ligation von Restriktionsfragmenten

Die T4-DNA Ligase katalysiert auch die Ligation von (ds) DNA-Molekülen, die mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden. Für diese „sticky end“ Klonierungen sollte der zu liegende Vektor zu dem DNA-Fragmente (Insert) in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 vorliegen. Daneben wurden 10 x Ligasepuffer (New England Biolabs) und 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase zu den Fragmenten gegeben. Das Endvolumen betrug 10  $\mu$ l, die Ligation wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Bei geeigneter Kombination der Restriktionsschnittstellen konnten auch 3 Fragmente gleichzeitig in einen

Vektor kloniert werden, das molare Verhältnis von Vektor zu den Inserts betrug dann 1:3:3:3. Das Gesamtvolumen wurde auf 15 µl erhöht und es wurden 2 µl T4-DNA-Ligase zugegeben.

#### **4.13 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Vektoren, die nur mit einem Restriktionssystem behandelt wurden, müssen dephosphoryliert werden, um eine Religation zu verhindern. Dabei werden die 5'-terminalen Phosphatgruppen an der Schnittstelle entfernt. Zu einem Restriktionsansatz wurde nach einer Stunde Inkubation mit dem entsprechenden Restriktionsenzym 1 µl alkalische Phosphatase (CIP, „calf intestinal phosphatase“; New England Biolabs) gegeben und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „Gene Clean Kits“ (Q-BIO gene) aufgereinigt.

#### **4.14 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* und *S. aureus***

##### **4.14.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen**

1 ml einer Übernachtskultur wurde in 49 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 unter Schütteln bei 37 °C wachsen gelassen. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis gestellt und anschließend in Greinerröhrchen abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wird mit 25 ml eiskalter, steriler CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde wieder in 2,5 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und für eine Stunde auf Eis gestellt. Danach gab man 520 µl 87 % Glycerin dazu (Endkonzentration Glycerin: ca. 12 %-15 %). Die Bakterien wurden in Aliquots von je 150 µl bei -80 °C gelagert.

##### **4.14.2 Herstellung elektrokompenter *S. aureus*-Zellen**

50 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5-0,7 unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Alle folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei RT für 10 min bei 5000 rpm. Die Bakterien wurden in 50 ml Greinerröhrchen abzentrifugiert und zuerst mit 50 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 10 ml 10%igem Glycerin. Das Bakterienpellet wurde dann in 5 ml 10%iger Glycerinlösung aufgenommen und für 15 min bei RT inkubiert. Die

Bakterien wurden erneut abzentrifugiert und das Pellet wurde in 0,5 ml 10%igem Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspension wird in Aliquots zu je 70 µl bei -80 °C gelagert.

#### **4.14.3 Transformation von CaCl<sub>2</sub>-kompetenten *E. coli*-Zellen**

Ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit dem entsprechendem Ligationsansatz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschritt bei 42 °C für 90 s. Anschließend wird das Reaktionsgefäß sofort für 5 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde mit LB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und zur phänotypischen Expression für 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden danach abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min) und ca. 700 µl vom Überstand wurden verworfen. In der verbleibenden Flüssigkeit wurden die Bakterien resuspendiert und auf zwei Selektionsplatten ausplattiert.

#### **4.14.4 Transformation elektrokompetenter Staphylokokken**

Ein Aliquot elektrokompetenter *S. aureus* wurde bei RT aufgetaut und mit dem Ligationsansatz vermischt. Die Bakterien wurden mit der DNA für 15 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltdurchmesser gefüllt und mit einer Spannung von 1,8 kV elektroporiert. Sofort nach der Elektroporation wurden 390 µl LB-Medium zu dem Ansatz gegeben. Der gesamte Ansatz wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 2 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz auf 2 Selektionsplatten ausplattiert.

#### **4.14.5 Entsalzen von Plasmiden für die Elektroporation**

Salze können aus dem zu transformierenden Plasmiden durch die „Schwimmfilterdialyse“ entfernt werden. Eine Petrischale wurde mit dH<sub>2</sub>O gefüllt. Auf die Wasseroberfläche wurde ein Filterchen mit 0,025 µm Porendurchmesser und einer Größe von 13 mm Durchmesser (Millipore) mit der glänzenden Seite nach oben gelegt. Auf die Oberfläche des Filters wurden 10-20 µl des Plasmides pipettiert und für 20 min dialysiert. Der Plasmid-Tropfen wird anschließend von dem Filter abpipettiert und kann sofort für die Elektroporation verwendet werden.

#### 4.15 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die Bakterien einer Übernachtskultur ließ man bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,0 bei 37 °C im Schüttler wachsen. Die Kultur wurde anschließend mit frischem LB-Medium 1:10<sup>3</sup> verdünnt. Gleichzeitig wurde eine Antibiotikaverdünnungsreihe hergestellt. In einer 96-„well“ Mikrotiterplatte mit Rundboden wurden 150 µl LB-Medium je Vertiefung vorgelegt. In die erste Vertiefung gab man das entsprechende Antibiotikum mit der zu überprüfenden Höchstkonzentration an Antibiotikum, meist 256 µg/ml. Von der ersten Vertiefung aus wurden 150 µl in die zweite Vertiefung pipettiert, aus der zweiten Vertiefung in die Dritte, usw. Die Verdünnungsreihe wurde über 12 Vertiefungen fortgesetzt. Bei jedem Schritt wurde das Antibiotikum 1:2 verdünnt. Für jedes Überpipettieren ist eine neue Spitze zu verwenden. Als Wachstumskontrolle blieb eine Vertiefung antibiotikafrei. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 20 µl der verdünnten Bakteriensuspension beimpft und für 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Definitionsgemäß ist der MHK-Wert die kleinste Konzentration eines Antibiotikums, die noch in der Lage ist das Wachstum eines Keimes zu hemmen.

#### 4.16 Sensitivitätstest gegenüber Wasserstoffperoxid

Die Übernachtskultur der zu untersuchenden Bakterien wurde in frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,0 angezogen. Eine Probe der Bakterienkultur wurde dann mit LB-Medium 1:10 verdünnt und 100 µl dieser Bakteriensuspension wurde auf LB-Platten ausplattiert. Aus Whatman-Papier wurden Löcher von ca. 5 mm Durchmesser ausgestanzt. Das Whatmanpapier wurde mit UV-Licht sterilisiert und in die Mitte der LB-Platte mit den frisch ausgestrichenen Bakterien gelegt. Auf das Whatmanpapier wurden 15 µl einer 3 %  $H_2O_2$  Lösung pipettiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Größe der Hemmhöfe um den mit  $H_2O_2$  getränkten Filter ist ein Maß für die Sensitivität der Bakterien gegenüber  $H_2O_2$ .

#### 4.17 Transduktion

Bei der Transduktion wird DNA durch Phagen von einem Bakterium in ein anderes übertragen. Die Transduktion macht man sich zu nutze, um Plasmide in den schwer transformierbaren *S. aureus* Stamm 8325 zu bekommen. Rekombinante Plasmide wurden daher zuerst in den restriktionsnegativen *S. aureus* Stamm RN4220 elektroporiert und von da mittels des Phagen  $\Phi 85$  in den *S. aureus* Stamm 8325 transduziert.

#### 4.17.1 Herstellung des Phagenlysats

Der Donor Stamm, *S. aureus* RN4220 mit dem entsprechenden Plasmid wurde über Nacht, in 5 ml LB-Medium unter Schütteln mit entsprechendem Selektionsdruck angezogen. Am nächsten Morgen wurden 25 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zu der Kultur gegeben. Das Phagenlysats wurde in Phagenpuffer verdünnt (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>). Je 200 µl der Übernachtskultur des Donorstammes wurden in 6 Kapsenbergröhrchen pipettiert und zu jedem Röhrchen wurden 100 µl einer Verdünnungsstufe sowie unverdünntes Phagenlysats pipettiert. Ein Röhrchen blieb frei von Phagen. Dies diente zur Kontrolle, dass unter den gewählten Bedingungen bakterielles Wachstum stattfindet. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden zu jedem Ansatz 4 ml flüssiger 55 °C warmer Weichagar (mit 5 mM CaCl<sub>2</sub>) gegeben, kurz geschwenkt und sofort auf eine LB-Platte gegossen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Weichagar von der Agarplatte, die die beste Bakterien- Lyse aufwies abgekratzt, in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt und mit 1 ml Phagenpuffer vermischt. Der Ansatz wurde gut gevortext. Anschließend wurden die Greinerröhrchen abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4 °C), und der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm Millipore Filter). Im Überstand können neben intakten Phagen auch Phagenpartikel vorhanden sein die das entsprechende Plasmid beinhalten.

#### 4.17.2 Transduktion des Empfängers

Der Empfängerstamm *S. aureus* 8325 wurde in 5 ml LB-Medium über Nacht angezogen. Am nächsten Morgen wurden 25 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zur Kultur gegeben. Das im ersten Schritt gewonnene Phagenlysats wurde wie oben beschrieben (10<sup>-1</sup>-10<sup>-4</sup>) verdünnt und mit dem Empfängerstamm vermischt. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurden 3 ml flüssiger, 55 °C warmer Weichagar (mit 20 mM NaCitrat) zu dem Bakterien-Phagen Gemisch gegeben, kurz geschwenkt und sofort auf eine LB-Selektionsplatte mit entsprechendem Antibiotikum gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei entsprechender Temperatur, meist 30 °C. Aufgrund des Selektionsdrucks können nur Bakterien wachsen, die mit dem Plasmid transduziert wurden. Erste Kolonien erscheinen meist nach 36-48 h.

Phagenpuffer : LB-Medium mit 5 mM CaCl<sub>2</sub>

Weichagar: LB-Medium mit 0,6 % Agar

#### **4.18 Arbeiten mit RNA**

Beim Arbeiten mit RNA ist es wichtig, dass alle verwendeten Puffer und Verbrauchsmaterialien RNase-frei sind. Es sollte immer mit Handschuhen gearbeitet werden und alle Lösungen sollten mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser angesetzt werden. DEPC Wasser wird hergestellt, indem 1 ml DEPC je Liter destilliertem Wasser hinzugefügt wird. Das Gemisch wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend für 30 min autoklaviert.

##### **4.18.1 Isolierung von RNA**

Zur Isolierung der RNA wurden mindestens 4 ml Bakterienkultur mit der doppelten Menge RNA-protect (Qiagen) vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Pellet wurde in 1 ml RLT-Puffer (mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt; Qiagen) aufgenommen. Die Bakterien wurden mechanisch durch Glaskügelchen (Lysing Matrix E, Bio 101) aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgt in dem dafür vorgesehenem Gerät „Fast Prep FP120“ der Firma Bio 101. Die Proben wurden 2 min auf Eis abgekühlt und danach für 10 min bei 14 000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand (ca. 800  $\mu$ l) wurde mit dem gleichen Volumen 100 % EtOH vermischt und auf ein RNA-Säulchen (RNeasy-Kit, Qiagen) aufgetragen. Die Proben wurden mit 700  $\mu$ l RW1-Puffer und zweimal mit je 500 $\mu$ l RPE- Puffer (Qiagen) gewaschen. Die RNA wurde einmal mit 50  $\mu$ l und ein weiteres Mal mit 35  $\mu$ l dest. H<sub>2</sub>O von den Säulen eluiert. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert. Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

##### **4.18.2 DNase-Verdau der RNA**

Ein DNase-Verdau wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

10  $\mu$ l OPA (One phor all)-Puffer (Amersham)  
5  $\mu$ l DNaseI (Roche)  
85  $\mu$ l RNA

Der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt, kurz abzentrifugiert und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der DNase-Verdau kontrolliert, indem

eine PCR-Reaktion durchgeführt wurde. Als Template diente ein Mikroliter des DNase-Verdau. War der DNase-Verdau erfolgreich, so darf bei einer PCR kein Produkt entstehen. Als Positivkontrolle der PCR-Reaktion diente genomische DNA. Falls noch DNA in den RNA-Proben vorhanden war, muss der DNase-Verdau wiederholt werden. Für das weitere Arbeiten mit der RNA muss diese aufgereinigt werden.

#### **4.18.3 Aufreinigung der RNA**

Nachdem der DNase-Verdau durchgeführt wurde, muss die RNA für weitere Versuche aufgereinigt werden. Hierfür wurde der RNeasy Mini-Kit (Qiagen) verwendet. Der gesamte Ansatz des DNase-Verdau (100 µl) wurde mit 350 µl RLT-Puffer (mit 10 µl/ml Mercaptoethanol) versetzt und gut gevortext. Anschließend wurde 250 µl Ethanol zugegeben und der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt und auf eine RNeasy Mini-Kit Säule gegeben. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Ansatz zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Die Säule wurde für 2 min trocken zentrifugiert und die RNA wurde mit 40 µl H<sub>2</sub>O. von der Säule eluiert. Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

#### **4.18.4 Konzentrations-Bestimmung von RNA**

Die RNA-Konzentration und Reinheit (=Proteinfreiheit) kann mittels Messung der optischen Dichte am Photometer bestimmt werden. Die Bestimmung der RNA Konzentration beruht darauf, dass Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzen. Die RNA Probe wurde 1:40 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und die Extinktion wurde bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Die Konzentration wird vom Photometer in µg/ml angegeben. Der Quotient (Ratio) OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> sollte bei 2,0 liegen.

#### **4.18.5 Reverse Transkription**

Zur reversen Transkription von RNA wurde SuperScript III RNaseH<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (Invitrogen) verwendet. Standardmäßig wurden 2 µg RNA pro Ansatz umgeschrieben:

- 2 µg RNA
- 200 ng random Hexamer-Primer (Amersham)
- 1 µl dNTP Gemisch (10 mM je Nucleotid)
- ad 13 µl dH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 3 min auf Eis gestellt.

Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und folgende Komponenten wurden hinzugegeben:

4 µl 5 × First-Strand Buffer  
1 µl 0,1 M DTT  
1 µl RNaseOUT  
1 µl SuperScript III RT

Der Ansatz wurde durch auf- und abpipettieren gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die reverse Transkription im Heizblock bei 50 °C für eine Stunde. Die Reaktion wurde anschließend durch Inkubation bei 70 °C für 15 min inaktiviert. Die cDNA konnte dann direkt als Template für anschließende PCR Analysen verwendet werden.

#### 4.18.6 Primer Extension Assay

Um den Startpunkt eines Transkripts herauszufinden und damit auch die vorangehende Promotoren-Sequenz zu identifizieren, wurden Primer Extension Experimente durchgeführt. Die dafür benötigte RNA wurde aus dem *S. aureus* Stamm 8325 oder aus dem Stamm MA12 gewonnen. Die Bakterienkultur wurde dazu bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 angezogen und zu diesem Zeitpunkt mit 7 % Ethanol induziert. Nach 20-minütiger Inkubation mit Ethanol wurde aus 8 ml Bakterienkultur die RNA isoliert. Die RNA wurde zunächst mit DNase I verdaut. Für die sich anschließende reverse Transkription wurden 15 µg RNA eingesetzt. Zunächst wurde der spezifische IR-markiert Primer *ywcGPEX* (5'IR800-ACA ACG TCT TCA CTT AAA GG-3') an die RNA angelagert. Vier pmol des Primers wurden mit 15 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl inkubiert.

Reaktionsansatz:	RNA	15 µg
	Primer (2 pmol/µl)	2 µl
	dH <sub>2</sub> O	ad 15 µl

Das Primer-Annealing wurde nach folgendem Programm im Thermocycler durchgeführt:

Primer-Annealing:	90 °C	2 min
	85 °C	7 min
	65 °C	7 min
	45 °C	7 min
	30 °C	7 min

Nach Anlagerung des Primers an die RNA werden die Reagenzien für die reverse Transkription zum Reaktionsansatz zugefügt. Für die Reverse Transkription wurde die reverse Transkriptase Superscript III (Invitrogen) verwendet.

Reverse Transkription:	dNTP (20mM)	4 µl
	5 x First-strand-buffer	6 µl
	0,1 M DTT	1,5 µl
	RNase OUT	1,5 µl
	Superscript III	2 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 90 min bei 52 °C inkubiert. Anschließend wurde zu diesem Ansatz 3 µl RNase-Puffer (3 ng/µl RNaseA in 0,2 M EDTA pH 8) gegeben. Dieses Gemisch wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert, um die RNA zu entfernen. Die cDNA wurde danach mit Ethanol gefällt. Der Reaktionsansatz wurde mit 1/10 des Volumens (3,3 µl) 2,5 M NaAcetat versetzt und das dreifache Volumen an eiskaltem Ethanol (100 µl) wurde zugegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Die cDNA wurde dann für 15 min abzentrifugiert und zweimal mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und in 1 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Für die Auftragung der Reaktion auf das Sequenziergel wurden außerdem 3 µl Stoppuffer (Epicentre Technologies) zu der Reaktion gegeben. Je 0,5 µl und 1,5 µl der Reaktion wurden zur Analyse auf das Sequenziergel aufgetragen. Gleichzeitig wurde eine Sequenzierungsreaktion mit dem gleichen IR-markierten Primer *ywcGPEx* durchgeführt und benachbart zur Primer Extension Reaktion aufgetragen. Die Analyse der Sequenz wurde am LiCor (Modell 4000, MWG-Biotech) durchgeführt.

#### 4.18.7 Relative Quantifizierung der Gen-Expression mit Hilfe der Real-Time PCR

Zur Detektion doppelsträngiger DNA mittels Real-Time PCR wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet, der sich spezifisch in doppelsträngige DNA

einlagert. Die Zunahme an doppelsträngiger DNA während der PCR kann so direkt durch die Zunahme der Fluoreszenz verfolgt werden. Für die Auswertung der Real-Time PCR ist der PCR-Cyclus entscheidend, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal deutlich über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dieser Zyklus wird als CT-Wert (Cycle of Threshold) bezeichnet. Zunächst muss die PCR für jedes Primer-Paar optimiert werden, insbesondere muss die optimale Annealing-Temperatur ermittelt werden. Die Real-Time PCR Amplifizierungs-Effizienz wird ermittelt, indem eine Verdünnungsreihe der cDNA hergestellt wird. Für die *nfrA* Primer wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$ - $10^{-5}$  hergestellt, für die *16 SrRNA*-Primer wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^{-2}$ - $10^{-6}$  hergestellt. Für jede Verdünnung wird der CT-Wert ermittelt und in einer Eichgerade wird der CT-Wert über die jeweilige cDNA-Verdünnungsstufe aufgetragen. Mit Hilfe der MyiQ-Software wird diese Gerade gezeichnet und die Steigung der Eichgerade wird von der Software ermittelt. Anhand der Steigung kann die PCR-Effizienz nach folgender Gleichung ermittelt werden:

$$\text{PCR-Effizienz: } E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

(Die PCR-Effizienz für die *nfrA*-Primer ergab:  $E = 1,94$ , für die *16SrRNA*-Primer war  $E = 1,9$ .)

Um die Expression eines Gens in zwei Proben zu vergleichen muss für jede Probe der CT-Wert mit Gen-spezifischen Primern ermittelt werden. Die Differenz der CT-Werte der zu vergleichenden Proben ist die Grundlage zur mathematischen Bestimmung der relativen Expression. Zur Normalisierung der Proben ist es erforderlich mit jeder Probe eine PCR-Reaktion mit einem Haushaltsgen (Referenz) durchzuführen, dessen Expression sich unter den entsprechenden Bedingungen nicht ändern sollte. Die Differenz des CT-Wertes für das Referenzgen sollte nahezu Null sein. Außerdem kann kontrolliert werden, dass in jedem PCR-Ansatz die gleiche Menge an cDNA vorhanden war. Leichte Unterschiede werden in der Gleichung zur relativen Quantifizierung berücksichtigt (Pfaffl, 2001):

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CT}_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CT}_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

Bei den Untersuchungen zur Induktion der Transkription von *nfrA* nach Zugabe unterschiedlicher Substanzen wurden zwei Zeitpunkte miteinander verglichen. Zu jedem Zeitpunkt wurde RNA isoliert. Der Nullzeitpunkt war unmittelbar vor Zugabe der Substanz bei einer OD<sub>600</sub> 0,5-0,7. Nach 20 min wurde aus derselben Kultur nochmals RNA isoliert. Die RNA wurde wie beschrieben mit DNaseI behandelt und revers transkribiert. Jede PCR wurde in Duplikaten durchgeführt. Für die PCR mit *nfrA*-Primern wurde die cDNA 1:5 verdünnt. Für die Amplifikation der *16SrRNA*-cDNA wurde die cDNA 1:10<sup>4</sup> verdünnt. Die relative Expression wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{nfrA})^{\Delta CT_{nfrA}(0\text{min}-20\text{min})}}{(E_{16SrRNA})^{\Delta CT_{16SrRNA}(0\text{min}-20\text{min})}}$$

Nach jeder Real-Time PCR Amplifikation wurde eine Schmelzpunkt-Analyse durchgeführt. Für jedes Primer-Paar darf nur ein spezifisches Produkt mit einem spezifischen Schmelzpunkt nachweisbar sein. Da sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green auch in Primer-Dimere einlagert, muss sichergestellt sein, dass kein Fluoreszenzsignal von Primer-Addukten herrührt. Um sicher zu sein, dass keine unspezifischen Produkte amplifiziert wurden, kann die PCR-Reaktion zusätzlich zur Schmelzpunkt-Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen werden.

#### 4.18.8 Expressionsanalyse mit Hilfe von Microarrays

Die auf dem Microarray gespotteten DNA-Sequenzen repräsentieren 2334 ORFs des *S. aureus* Stammes N315. Bei den DNA-Sequenzen handelt es sich um PCR-Fragmente. Die Microarrays wurden von der Firma Scienion, Berlin erworben. Zur Transkriptom-Analyse wurde die RNA aus den entsprechenden Staphylokokken bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 isoliert und die gesamte RNA wurde mit random Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Bei der reversen Transkription erfolgte die Markierung der cDNA durch den Einbau fluoreszenzmarkierter dNTPs (dCTP-Cy3 oder dCTP-Cy5).

##### 4.18.8.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die RNA wurde nach Anleitung des Qiagen RNeasy Mini Kits isoliert, anschließend wird ein DNaseI-Verdau durchgeführt (wie oben beschrieben). Für die reverse Transkription

wurde die reverse Transkriptase SuperScriptIII (Invitrogen) verwendet. Für die cDNA-Synthese wurden 10 µg RNA mit 1 µg random Hexamer-Primer in einem Gesamtvolumen von 10 µl vermischt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min auf Eis gestellt. Für die reverse Transkription wurden anschließend folgende Komponenten hinzupipettiert:

- 4 µl 5 × First-Strand Buffer
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl dNTP-Mix (je 8 mM dATP, dGTP, dTTP; 6mM dCTP)
- 1 µl markierte dNTP (2 mM dCTP-Cy3 oder dCTP-Cy5)
- 1 µl SuperScriptIII (200 U/µl)

Der Ansatz wurde bei 50 °C für 60 min im Dunkeln inkubiert, dann wurde ein weiterer Microliter SuperScript III zum Ansatz gegeben und für weitere 50 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 2 µl 2,5 M NaOH und durch Inkubation für 15 min bei 65 °C abgestoppt. Zur Neutralisation wurden dann 12,5 µl Tris-HCl (1,0 M; pH 7,5) zum Ansatz gegeben. Die so hergestellten Sonden wurden nach Anleitung des PCR-Purification Kits über Säulchen aufgereinigt. Die Sonden wurden mit 30 µl dH<sub>2</sub>O von den Säulchen eluiert.

#### **4.18.8.2 Überprüfung der Qualität der Sonden**

Die Qualität der Sonden wurde auf einem 2%igen Agarosegel überprüft. Je 1 µl von der markierten cDNA (Cy-3 oder Cy-5) wurde mit 2 µl 86 % Glycerin und 8 µl dH<sub>2</sub>O vermischt. Die Proben wurden auf das Agarosegel aufgetragen und für 4 Stunden bei 80 V im Dunkeln aufgetrennt. Das Gel wurde am Phosphoimager analysiert. Es sollten mehrere scharfe Banden unterschiedlicher Größe zu erkennen sein, außerdem sollte die Fluoreszenz der Cy-3 als auch der Cy-5 markierten cDNA gleich stark sein. Fluoreszierende diffuse Wolken am unteren Rand des Agarose-Gels weisen darauf hin, dass die Sonden mit freien, fluoreszierenden Nukleotiden (dCTP-Cy3 und dCTP-Cy5) kontaminiert sind, in diesem Fall müssen die Sonden nochmals nach Anleitung des PCR-Purification Kits aufgereinigt werden.

#### **4.18.8.3. Hybridisierung**

Die Sonden wurden in der Speed Vac eingetrocknet und in je 5 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die beiden markierten Sonden wurden mit 35 µl warmem Hybridisierungspuffer (Scienion,

Berlin) gemischt und für 5 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde in die Mitte des Microarrays pipettiert und dieser wurde sofort luftblasenfrei mit einem Deckgläschen versiegelt. Es ist besonders darauf zu achten, dass alle verwendeten Gegenstände sauber sind und möglichst staubfrei gearbeitet wird. Der Microarray sollte schon vor Zugabe der Sonden in die Hybridisierungskammer gelegt werden. Die 4 Löcher in der Hybridisierungskammer wurden mit 15 µl dH<sub>2</sub>O gefüllt und die Kammer wurde fest verschlossen. Der Microarray wurde für 2 Tage bei 50 °C im Wasserbad inkubiert.

#### **4.18.8.4 Waschen des Microarrays**

Die Waschpuffer I-IV wurden vorbereitet und durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße filtriert. Der Microarray wurde aus der Hybridisierungskammer genommen, das Deckgläschen wurde vorsichtig durch senkrecht Auf- und Abbewegen im Puffer I vom Microarray gelöst. Anschließend wurde der Array für je 3 min in Puffer I, II und III im Dunkeln gewaschen. Der Puffer III wurde auf 45 °C vorgewärmt. Der Microarray wurde anschließend noch einmal kurz in Waschpuffer IV getaucht. Um überschüssigen Puffer vom Array zu entfernen muss dieser sofort für 2 min bei 800 rpm zentrifugiert werden. Anschließend lässt man den Array für eine Stunde im Dunkeln trocknen.

Die Waschpuffer für die Microarrays wurden mit Lichrosolv H<sub>2</sub>O (Merck) in einem Endvolumen von 250 ml angesetzt:

20 x SSC

3 M NaCl

300 mM Natriumcitrat

Waschpuffer III

0,1 x SSC

Waschpuffer I

2 x SSC

0,1 % SDS

Waschpuffer IV

0,05 x SSC

Waschpuffer II

0,2 x SSC

#### **4.18.8.5 Auswertung der Microarrays**

Die hybridisierten Microarrays wurden mit dem GenePix 4000b Microarray-Scanner (Molecular Dynamics) eingelesen und mit der dazugehörigen Software GenePix Pro 4.0 sowie der Software Excel (Microsoft) ausgewertet.

#### **4.18.9 Northern-Hybridisierung**

Zur Analyse der RNA im Northern Blot, wird diese zunächst im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet.

##### **4.18.9.1 RNA-Gelelektrophorese**

Für ein 1,2 %iges Agarose/Formaldehyd-Gel wurden 4,2 g Agarose in 304,5 ml DEPC-H<sub>2</sub>O aufgeköcht und im Wasserbad auf 60 °C abgekühlt. Es wurden 35 ml 10 x MOPS-Puffer und 10,5 ml 37 %iges Formaldehyd dazugegeben und in einen Gelschlitten gegossen. Dann ließ man das Gel für 45 min erkalten und füllte 1 x MOPS-Puffer in die Gelkammer bis das Gel vollständig bedeckt ist. Das Gel sollte 30 min im Laufpuffer equilibrieren. Die RNA-Proben wurden folgendermaßen vorbereitet: 10 µg RNA in 10-20 µl dH<sub>2</sub>O wurden mit der doppelten Menge RNA-Ladepuffer (Peqlab) gemischt, 5 min bei 65 °C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Gel mit den Proben beladen und in einer separaten Spur wurde ein RNA-Größenmarker („low range“, Peqlab) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 3 h bei einer Spannung von 120 V und maximaler Stromstärke. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 30 min in H<sub>2</sub>O gewässert, um das Formaldehyd auszuwaschen. Da der RNA-Ladepuffer Ethidiumbromid enthält, das sich in die RNA einlagert, kann die RNA im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde zusammen mit einem Lineal fotografiert. Es sollten zwei scharfe rRNA-Banden (16S und 23S) sichtbar sein.

10 x MOPS-Puffer: 41,8 g MOPS wurden in 800 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und 16,6 ml 3 M Na-Acetat und 20 ml 0,5 M EDTA pH 8 wurden dazugegeben. Die Lösung wird auf pH 7,0 eingestellt und auf 1000 ml mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert und autoklaviert. Der Puffer wurde im Dunkeln bei RT aufbewahrt.

#### **4.18.9.2 Northern Blot**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Gesamtzell-RNA erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran durch einen Kapillar-Blot. Vor dem Blotten wird das Gel 30 min in 20 x SSC equilibriert. Die RNA wurde durch die entstehenden Kapillarkräfte aus dem Gel auf die Nylonmembran transferiert. Der Transfer erfolgte für etwa 16 Stunden. Die RNA muss anschließend durch UV-Licht auf die Membran fixiert werden.

#### **4.18.9.3 Markierung von Sonden mit dem ECL-System**

Das ECL-System (Enhanced Chemiluminescence Labelling and Detection System, Amersham) ist eine zuverlässige Methode zur Detektion komplementärer DNA-Stränge. Die denaturierten DNA- oder RNA-Sonden werden mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase markiert. Die Peroxidase ist mit einem positiv geladenen Polymer komplexiert, das sich durch Ladungskräfte locker an die negative geladene Sonden-DNA bindet. Diese ionische Bindung wird durch Zugabe von Glutaraldehyd zu einer chemischen Bindung umgewandelt, so dass die Sonden-DNA fest mit der Peroxidase verbunden ist. Standardmäßig wurden 200-400ng der Sonden-DNA (PCR-Produkt oder Restriktionsfragment) in 10 µl dH<sub>2</sub>O für 5 min bei 100 °C erhitzt und sofort 5 min auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 10 µl des Labelling-Reagenz und nach kurzem Mischen wurden 10 µl Glutaraldehyd zugegeben. Der Ansatz wurde gut gemischt, kurz abzentrifugiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Sonde wurde sofort auf den Northern Blot gegeben.

#### **4.18.9.4 Hybridisierung, Waschen und Entwicklung des Blots**

Der Blot wurde kurz in 5 x SSC geschwenkt und in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben. Der Blot wurde 1-2 Stunde in ca. 25 ml Hybridisierungspuffer (Hyb-Puffer/ Gold) bei 42 °C vorhybridisiert. Diese Vorhybridisierung dient dazu alle unspezifischen Bindungsstellen der Nylonmembran abzudecken. Anschließend gab man die markierte Sonde auf den Blot und es folgte eine Inkubation für ca. 16 Stunden bei 42 °C. Die Hybridisierungslösung wurde anschließend verworfen. Die Membran wurde zweimal 5 min mit 5 x SSC bei RT gewaschen. Danach erfolgten zwei Waschschrte bei 50 °C mit Waschpuffer I. Anschließend wurde der Blot nochmals für 2 x 5 min bei RT mit 5 x SSC gewaschen. Nachdem der Waschpuffer entfernt wurde, kann der Blot nun mit der Detektionslösung bedeckt werden. Die Detektionslösung wurde im Verhältnis 1:1 aus zwei

Einzellösungen hergestellt, die im Kit enthalten sind und 1 min auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Lösung verworfen und die Membran wurde von überschüssiger Detektionslösung mit Hilfe von Whatmanpapier befreit. Der Blot wurde möglichst schnell in Frischhaltefolie eingeschlagen und in der Dunkelkammer mit einem ECL-Hyperfilm bedeckt. Die Detektionslösung 1 zerfällt in Wasserstoffperoxid, dem Substrat der Peroxidase. Das in der Detektionslösung enthaltene Luminol wird daraufhin oxidiert, wobei es zu einer Lichtreaktion und zum Aussenden von blauem Licht kommt, das auf dem der Membran aufgelegten Film sichtbar gemacht werden kann. Je nach Signalstärke verbleibt der Film 1 min oder über Nacht auf der Membran. Genauere Angaben sind dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

#### Waschpuffer I

0,5 x SSC

0,4 % SDS

#### Hybridisierungspuffer

Hyb-Puffer (Gold; ECL-Kit) 500 ml

NaCl 14,61 g

Blocking Reagenz 25 g

### **4.19 Klonierung und Aufreinigung des NfrA-Proteins**

#### **4.19.1 Beschreibung des Systems pCRT7/TOPO zur Proteinexpression**

Für die Klonierung, die Überexpression und die Aufreinigung des Proteins wurde das System „pCRT7 TOPO TA Expression Kit“ (Invitrogen) verwendet. Der Vektor „pCRT7/CT-TOPO“ verfügt über einen T7-Promotor und eine Ribosomen-Bindestelle (RBS) und codiert außerdem für eine C-terminale Polyhistidin Region und einen Transkriptionsterminator (T7-Terminator). Zur Selektion des Vektors diente ein  $\beta$ -Lactamase Gen, welches Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt. Hinter die RBS wurde die codierende Sequenz (ORF) des *nfrA*-Gens kloniert, beginnend mit dem ATG-Startcodon und ohne Stopcodon. Das *nfrA*-Transkript wurde am C-Terminus um die Polyhistidin-Region verlängert, die 6 Histidinreste umfasst und der Aufreinigung des rekombinaten Proteins dient. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe von Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA-Agarose). Über die Histidinreste wurde das rekombinante Protein reversibel an die Nickel-NTA-Agarose Matrix gebunden. Mit geeignetem Puffer kann das Protein gewaschen und anschließend eluiert werden. Zur Expression des rekombinaten Proteins wurde das Plasmid in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3)pLys

transformiert. Dieser Stamm trägt den lysogenen Lambda Phagen DE3. Der Phage trägt das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors, außerdem trägt er das *lacI*-Gen. Der LacI-Repressor reprimiert die Expression der T7-RNA Polymerase durch Bindung an die *lac*-Operator-Sequenz im *lacUV5* Promotor. Durch Zugabe des Induktors Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) wurde der Repressor LacI inaktiviert. Die Expression der T7-Polymerase wurde induziert und damit auch die Expression des rekombinanten Proteins ermöglicht. Genauere Informationen sind dem Handbuch zu entnehmen.

#### 4.19.2 Expression des Proteins zu verschiedenen Zeiten nach Induktion

Zur Expression des Proteins wurden 10 ng der Plasmid-DNA in  $\text{CaCl}_2$ -kompetente *E. coli* BL(DE3)pLysS Zellen transformiert. Die gesamte Transformation wurde in 10 ml LB-Medium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin und 34  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol über Nacht inkubiert. Zunächst wurde die Expressionsstärke des Proteins nach verschiedenen Zeiten untersucht, dazu wurden 500  $\mu\text{l}$  der Übernachtskultur mit 10 ml LB-Medium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin und 34  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol versetzt. Die Kultur wurde bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,54 angezogen und anschließend mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Eine Stunde bis fünf Stunden nach Induktion wurden je 500  $\mu\text{l}$  Proben aus der induzierten Bakterienkultur entnommen. Zu den gleichen Zeiten wurden aus einer nicht induzierten Bakterienkultur Proben entnommen und im Protein-Gel untersucht. Dazu wurden die Proben abzentrifugiert, das Pellet wurde in  $1\times$ Laemmli-Puffer aufgenommen und kräftig gevortext. Die Suspension wurde für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend eine Minute bei höchster Drehzahl abzentrifugiert. Eine geeignete Menge des Überstandes (ca. 4  $\mu\text{l}$ ) wurde auf das denaturierende SDS-Polyacrylamidgel Gel aufgetragen.

#### 4.19.3 Isolierung und Aufreinigung des rekombinanten Proteins

Zur Aufreinigung des Proteins wurde der Expressionsvektor erneut in die BL(DE3)pLysS-Zellen transformiert. Vier Milliliter der Übernachtskultur wurden mit 200 ml LB-Medium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin und 34  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol versetzt und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5-0,6 angezogen. Die Kultur wurde zu diesem Zeitpunkt mit 1 mM IPTG induziert. Die Bakterien wurden für weitere 5 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und das Zell-Pellet wurde über Nacht bei -80 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde am darauffolgenden Tag auf Eis für 15 min aufgetaut und

in 6 ml Lysispuffer resuspendiert. Das gleiche Volumen an Glasperlen (Durchmesser: 0,25-0,5mm; Roth) wurde zu den Bakterienzellen gegeben und 1 µl Benzonase (10 000 U/ml; Merck) wurde zugesetzt. Das Gemisch wurde für 10 min im Kühlraum gevortext. Die Suspension wurde anschließend bei 6000rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt. Die Glasperlen wurden nochmals mit 2 ml Lysispuffer gewaschen und der Überstand aus diesem Waschschrift wurde mit dem vorherigen Überstand vereinigt. Daraus ergaben sich ca. 6 ml Zelllysate, das nochmals bei 13000 rpm für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert wurde, um Zelltrümmer möglichst vollständig zu entfernen. Das gesamte Zelllysate (6 ml) wurden mit 1,5 ml Ni-Agarose versetzt und bei 4 °C für eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Das gesamte Gemisch wurde auf eine Säule (Ni-NTA-Spin-Column) geladen. Der gesamte Durchfluß wurde aufgefangen und für die später Gelelektrophorese aufbewahrt. Die Säule wurde dreimal mit je 4 ml Waschpuffer gewaschen, der 40 mM Imidazol enthielt. Anschließend wurde das Protein mit Elutionspuffer von der Säule freigesetzt. Die Elution erfolgte in 5 aufeinanderfolgenden Schritten mit je 500 µl Elutionspuffer. Der Elutionspuffer enthielt 250 mM Imidazol. Imidazol bindet wie Histidin an die Ni-NTA-Matrix der Säule. Steigt die Imidazol-Konzentration auf 250 mM werden die Histidinreste von der Matrix verdrängt und das Protein löst sich von der Säule. Von jeder Fraktion wurden Aliquots für die anschließende Analyse in der Gelelektrophorese aufbewahrt. Von der Gesamtlysate-Fraktion und den Wasch-Fraktionen wurden je 10 µl bei der Gelelektrophorese aufgetragen von den Elutions-Fraktionen je 5 µl. Die Aufbewahrung des gereinigten Proteins erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

#### Lysis-Puffer

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
10 mM Imidazol  
pH (8,0) mit NaOH

#### Elutionspuffer

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
250 mM Imidazole  
pH 8,0 mit (HCl)

#### Waschpuffer

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
40 mM Imidazol  
pH (8,0) mit NaOH

#### 4.19.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der Expression des *nfrA*-Gens wurden Gesamtzelllysate oder Zellysatüberstände auf ein denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Größenmarker diente der „Full Range Rainbow recombinant protein molecular weight marker“ (Amersham).

##### 4.19.4.1 Herstellung eines Polyacrylamidgels

Zur Untersuchung der *nfrA*-Expression wurde ein 12%iges Proteingel verwendet.

<u>Trenngel:</u>	Acrylamid/bis-Acrylamid (30 %/ 0,4 %)	3,3 ml
	1,5 M Tris-HCL-Puffer (pH 8,8)	2,5 ml
	10 % SDS-Lösung	0,1 ml
	Aqua dest.	4,0 ml
	TEMED	0,004 ml
	10 % Ammoniumpersulfat	0,1 ml

Das Trenngelgemisch wurde sofort in die Gießvorrichtung pipettiert und mit Isopropanol überschichtet.

<u>Sammelgel:</u>	Acrylamid/bis-Acrylamid (30 %/ 0,4 %)	0,83 ml
	0,5 M Tris-HCL-Puffer (pH 6,8)	0,63 ml
	10 % SDS-Lösung	0,05 ml
	Aqua dest.	3,4 ml
	TEMED	0,005 ml
	10 % Ammoniumpersulfat	0,05 ml

Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels für 30 min wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt.

Die Proben für das Proteingel wurden in 1× Laemmli-Puffer aufgetragen. Bei Bedarf wurden die Proben mit Phosphatpuffer verdünnt.

4× Laemmli-Puffer:

5 ml β-Mercaptoethanol

2 ml 3,125 M Tris/HCl (pH 6,8)

8 ml 25 % SDS

10 ml 86 % Glycerin

20 mg Bromphenolblau

**4.19.4.2 Elektrophorese-Lauf**

Für die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld wurde die Apparatur Bio Rad-Mini-ProteanII Cell (BioRad) verwendet. Der Elektrophorese-Lauf erfolgte bei konstanten 32 mA, für zwei Gele oder bei 24 mA bei einem Gel.

10×SDS –Laufpuffer:

Tris 30 g

Glycin 144 g

SDS 10 g

Aqua dest. ad 1 l

**4.19.4.3 Anfärben des Gels**

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur genommen und für 30 min in der Färbelösung (Coomassie-Blue) geschwenkt. Danach wurde für 30 min entfärbt. Das Gel wurde eingescannt oder in dH<sub>2</sub>O aufbewahrt.

Färbelösung:

0,05 % Coomassie-Blue R 250

50 % Ethanol

10% Eisessig

40 % Aqua dest.

Entfärbelösung:

5 % Ethanol

7 % Eisessig

88 % Aqua dest.

**4.19.5 Dialyse des Proteins NfrA**

Zur Messung der Enzymaktivität wurde das Protein in einen 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,8) überführt. Das Protein-Eluat wurde in einen Dialyseschlauch (ZelluTrans, MWCO= 12000-14000 kDa; Roth) gegeben und dreimal gegen einen Liter Phosphatpuffer dialysiert. Der erste Dialyseschritt erfolgte für eine Stunde, der zweite Schritt erfolgte über Nacht. Der

Puffer wurde noch ein drittes Mal erneuert und die Dialyse wurde für eine weitere Stunde fortgesetzt. Die Dialyse wurde im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt.

Phosphatpuffer:

0,5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	277,8 ml
1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	161,1 ml
NaCl	8,7 g
Aqua dest.	ad 3 l
pH 6,8	

#### 4.19.6 Messung der enzymatischen Aktivität von NfrA und K<sub>M</sub>-Wert Bestimmung

Die Oxidation von NADPH in NADP<sup>+</sup> kann am Photometer verfolgt werden. Die reduzierte Substanz NADPH besitzt ein Absorptionsmaximum bei 340 nm, dieses Absorptionsmaximum fehlt der oxidierten Form. Bei der Umwandlung von NADPH in NADP<sup>+</sup> verringert sich die Absorption bei 340 nm. Zur Bestimmung der Enzym-Aktivität wurde die Konzentrationsänderung von NADPH in Anwesenheit des Enzyms gemessen. Mit Hilfe der Konzentrationsabnahme von NADPH, und der damit verbundenen Absorptionsabnahme innerhalb einer bestimmten Zeit ließ sich die Geschwindigkeit, mit der die enzymatische Reaktion abläuft, ermitteln.

Die Anfangsgeschwindigkeiten (NADPH Verbrauch pro Zeiteinheit) wurden mit Hilfe des Lambert-Beer Gesetzes errechnet

$$\Delta E = \varepsilon \times \Delta c \times d$$

$\Delta E$  = ermittelte Extinktionsänderung

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient von NADPH

bei 340nm =  $6,2 \times 10^3$  (l  $\times$  mol<sup>-1</sup>  $\times$  cm<sup>-1</sup>)

$d$  = Schichtdicke, 1 cm

$\Delta c$  = Änderung der NADPH-Konzentration

Mit Hilfe des Photometers wurde die Extinktionsänderung in einem Zeitintervall von  $\Delta t = 1$  min gemessen. Für die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion  $v_0$  ergab sich dann:

$$v_0 = \Delta c / \Delta t = \Delta E / \epsilon \times d \times \Delta t = \Delta E / 6,2 \times 10^3 \times \Delta t \text{ (mol} \times \text{l}^{-1} \times \text{min}^{-1}\text{)}$$

$$v_0 = \Delta E \times 0,16 \text{ (}\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}\text{)}$$

Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ist abhängig von der Substratkonzentration (NADPH). Die Anfangsgeschwindigkeit für die NADPH-Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  wurden bestimmt. Der Kehrwert der Anfangsgeschwindigkeiten wurde gegen den Kehrwert der Substratkonzentration in einem Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt. Das Diagramm ergab eine Gerade, die die Abszisse im Punkt  $-1/K_M$  schneidet. Aus diesem Schnittpunkt lässt sich die Michaelis-Konstante ( $K_M$ ) bestimmen. Die Michaelis-Konstante ist die Substratkonzentration, bei der eine enzymkatalysierte Reaktion mit der Hälfte ihrer Maximalgeschwindigkeit abläuft. Die enzymatische Reaktion wurde in Phosphatpuffer mit 50 mM NaCl (pH 6,8) in einer Küvette (Dicke = 1 cm) bei Raumtemperatur (21 °C) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml. Alle Lösungen wurden auf Eis aufbewahrt. Die Oxidation von NADPH wurde bei gleichbleibender Konzentration von FMN (100  $\mu\text{M}$ ) photometrisch gemessen. Für jede Substratkonzentration (15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  NADPH) wurden mindestens drei Messungen durchgeführt. Der Phosphatpuffer wurde mit NADPH und dem Enzym gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Kurz vor der Messung wurde FMN zu dem Gemisch gegeben. Da die Reaktion sehr schnell abläuft wurden maximal 2 Proben parallel gemessen. Als Leerwert diente Phosphatpuffer mit FMN, als Kontrollwert diente Phosphatpuffer mit NADPH und FMN ohne Enzym. Das Photometer bestimmte automatisch alle 10 Sekunden die Extinktion und errechnet die Extinktionsänderung ( $\Delta E$ ) innerhalb einer Minute. Die gesamte Messreihe wurde einmal mit 4  $\mu\text{l}$  Enzym und einmal mit 8  $\mu\text{l}$  Enzym durchgeführt. Das Enzym hatte eine Konzentration von 0,52 ng/ $\mu\text{l}$ . Die Proteinkonzentration wurde mit Roti-Nanoquant (Roth) bestimmt. Einzelheiten der Protein-Konzentrationsbestimmung sind der Gebrauchsanweisung zu entnehmen. Anstelle von NADPH wurden auch Messungen mit NADH durchgeführt oder FMN wurde gegen FAD ausgetauscht. Außerdem wurde die Reduktase-Aktivität des Enzyms gegenüber Nitrofurazon, Nitrofurantoin, Eisencyanid und DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)) gemessen. Die enzymatische Reaktion wurde in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  NADPH und 20  $\mu\text{M}$  FMN durchgeführt. Folgende molare Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) wurden verwendet: Nitrofurazon, Messung bei 400 nm,  $\epsilon =$

12,96 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>; Nitrofurantoin, Messung bei 420 nm,  $\epsilon = 12,0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Ferricyanid bei 420 nm,  $\epsilon = 1,0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; DTNB, Messung bei 412 nm,  $\epsilon = 13,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.20 Erstellung einer Wachstumskurve

Zum Erstellen einer Wachstumskurve musste zunächst eine Übernachtskultur der entsprechenden Bakterien angezogen werden. Standardmäßig wurde die Übernachtskultur in Kapsenbergröhrchen mit 5 ml LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum unter Schütteln bei 37 °C angezogen. Am nächsten Morgen wurden 50 ml LB-Medium in 100 ml Kölbchen mit der Übernachtskultur inokuliert. Die OD<sub>600</sub> wurde zum Nullzeitpunkt auf 0,05 eingestellt. Die Kultur wurde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Jede Stunde erfolgte die Entnahme von 1 ml Bakterienkultur. Von dieser Probe wurde die optische Dichte bei 600 nm bestimmt (OD<sub>600</sub>).

#### 4.21 Klonierungsstrategien

##### 4.21.1 Herstellung von Deletionsmutanten

Die Deletionsmutanten wurden hergestellt, indem die codierende Sequenz des Zielgens durch die Sequenz der Erythromycin-Resistenzkassette ausgetauscht wurde. Dazu mussten zuerst Fragmente upstream und downstream des Zielgens amplifiziert werden. Diese Fragmente waren zwischen 700-1100 bp lang. Die Fragmente wurden zunächst in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert. An die Primer wurden Restriktionsschnittstellen angefügt, über die die Fragmente nach einem Restriktionsverdau wieder aus dem Vektor pGEM-T herausgespalten wurden. Anschließend wurden die Fragmente in den Temperatursensitiven Shuttle-Vektor pBT2 umkloniert. Die Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, dass die Erythromycin-Resistenzkassette von dem upstream Fragment und dem downstream Fragment flankiert wurde. Die Erythromycin-Resistenzkassette wurde entweder aus dem Vektor pEC1 herausgespalten, oder mit Primern, an die die benötigten Schnittstellen angehängt wurden, aus dem pEC1 Vektor mittels PCR amplifiziert. Alle Klonierungen erfolgten zuerst in *E. coli* K12. Der Shuttle-Vektor pBT2 mit den entsprechenden Fragmenten wurde danach in den restriktionsnegativen *S. aureus* Stamm RN4220 transformiert. Der Vektor wurde dann mittels Phagentransduktion (Phage  $\Phi$ 85) in den *S. aureus* Stamm 8325 überführt. Das Vektorkonstrukt wurde nach jedem Schritt durch Plasmid-Minipräparation überprüft. Im Stamm *S. aureus* 8325 wurde das entsprechende

Zielgen durch homologe Rekombination gegen die Erythromycinkassette ausgetauscht. Durch dreimaliges Überimpfen der Bakterienkultur und Kultivierung bei 42 °C ging der Temperatur-sensitive Shuttle-Vektor verloren und das Rekombinationsereignis wurde begünstigt (Brückner et al., 1997). Potentielle Deletionsmutanten konnten durch ihr Wachstumsverhalten vorselektiert werden. Die Deletionsmutanten wuchsen, nach Erwerb der Erythromycin-Resistenzkassette, auf Erythromycin, waren aber nach Verlust des Shuttle-Vektors pBT2 sensitiv gegenüber Chloramphenicol. Klone die dieses Wachstumsverhalten zeigten wurden zunächst durch Southern Blot-Analyse überprüft.

#### 4.21.2 Herstellung konditional letaler Mutanten mit Hilfe des Vektors pBT2-*xylR*

Bei dieser Methode wurde der wildtypische Promotor des Zielgens durch die Promotor/Operator-Region des *xylAB*-Operons aus dem Xylose-Operon (*Staphylococcus xylosus*) ersetzt. Das Gen für den Xylose-Repressor (*xylR*) wurde ebenfalls vor das Zielgen integriert. In Abwesenheit von Xylose bindet der Xylose-Repressor an die Promotor/Operator Sequenz und verhindert die Transkription nachfolgender Gene. Zudem unterdrückt die Gegenwart von 0,5 % Glukose die Gen-Expression durch Katabolit-Repression. In Gegenwart von 0,5 % Xylose ist der Xylose-Repressor inaktiv, und fällt von der Promotor/Operator Sequenz ab. Die Transkription der nachfolgenden Gene kann, in Abwesenheit von Glukose, stattfinden (Rohrer et al., 1999).

Zunächst wurden etwa 450-800 bp des 5'-Bereiches des Zielgens mittels PCR amplifiziert. Dabei ist zu beachten, dass die Ribosomenbindestelle des Zielgens in dem Fragment enthalten ist, nicht jedoch der wildtypische Promotor. An die Primer wurden bereits die entsprechenden Schnittstellen zur Klonierung des Fragments (*EcoRI*/ *BamHI*) angefügt. Das Fragment wurde zunächst in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert und anschließend durch die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* herausgespalten und mit dem Temperatur-sensitiven Shuttle-Vektor pBT2-*xylR* ligiert. Die Klonierung erfolgte zunächst in *E. coli*. Die Vektorkonstrukte wurden durch Plasmid Mini-Präparation überprüft und anschließend in den *S. aureus* Stamm RN4220 transformiert. Darauf folgt die Transduktion des Plasmides in den *S. aureus* Stamm 8325 mit Hilfe des Phagen  $\Phi 85$ . Durch homologe Rekombination des klonierten Fragmentes und der entsprechenden homologen Region auf dem Chromosom kommt es zur Insertion des Vektors pBT2-*xylR* vor dem Zielgen (Single Crossover). Der wildtypische Promotor des Zielgens wurde dadurch von dem zugehörigen ORF entfernt und das Xylose-Regulon gelangt vor das Zielgen. Durch Temperaturerhöhung

auf 42 °C und dreimaliger Subkultivierung sollte der nicht integrierte, Temperatur-sensitive Vektor verloren gehen (Brückner et al., 1997). Die Insertionsmutanten waren aufgrund der Insertion des Vektors pBT2-*xyIR* Chloramphenicol resistent und wurden durch Southern Blot-Analyse überprüft.

#### 4.21.3 Herstellung konditional letaler Mutanten mit Hilfe des pMUTIN4/Pspac-Systems

Bei dem Pspac-Promotor handelt es sich um einen chimären Promotor aus der *lac* Operator Region von *E. coli* fusioniert an den Promotor des SPO1 Phagen von *B. subtilis*. Der Pspac-Promotor, sowie der LacI-Repressor sind auf dem Plasmid pMUTIN4 codiert, *lacI* wird konstitutiv exprimiert. Der LacI-Repressor bindet an die *lac*-Operator-Sequenz im Pspac-Promotor und verhindert die Transkription nachgeschalteter Gene. Durch Zugabe von IPTG kann die Gen-Expression an Pspac induziert werden. Die Substanz IPTG bindet an den LacI-Repressor, der daraufhin seine Konformation verändert und von der *lac*-Operatorsequenz abfällt (Zhang et al., 2000).

Zunächst wurden 600-800 bp vom 5'-Bereich des Zielgens mittels PCR amplifiziert. Dabei ist zu beachten, dass die Shine-Dalgarno-Region in der Sequenz vorhanden ist, nicht aber der eigene Promotor des Zielgens. An die Primer wurden die benötigten Restriktionsschnittstellen angehängt. Das Fragment wurde zunächst in das Plasmid pGEM-T kloniert. Danach wurde das Fragment in den Vektor pMUTIN4 überführt. Die Klonierung erfolgt in *E. coli*, ein  $\beta$ -Lactamase-Gen ermöglichte die Selektion der pMUTIN4 positiven Klone. Das Plasmid wurde durch Plasmid-Mini-Präparation überprüft und anschließend in den restriktionsnegativen Stamm *S. aureus* RN4220 transformiert. Der Vektor pMUTIN4 verfügt nicht über einen gram-positiven Replikationsursprung und kann nicht in Staphylokokken replizieren. Unmittelbar nach der Elektroporation des Vektors in die Staphylokokken muss die homologe Rekombination zwischen dem klonierten 5'-Bereich des Zielgens im Vektor und der entsprechenden chromosomalen Sequenz stattfinden. Durch die Insertion des Vektors vor dem Zielgen wird der ursprüngliche Promotor von dem zugehörigen ORF entfernt und der Pspac-Promotor gelangt vor die Zielsequenz. Der Vektor pMUTIN4 trägt eine Erythromycin-Resistenzkassette. Nach der Elektroporation wurden die Staphylokokken auf Erythromycin-haltigen Agar-Platten

angezogen. Nur Klone, die den Vektor ins Chromosom integriert hatten, sollten wachsen und wurden durch Southern Blot-Analyse genauer untersucht.

#### 4.21.4 Herstellung konditional letaler Mutanten mit Hilfe von Antisense-RNA

Bei dieser Methode sollte die Expression des Zielgens durch die Synthese der entsprechenden Antisense-RNA gehemmt werden. Dazu wurde die DNA-Sequenz des Zielgens oder ca. 800 bp aus dem 5'-Bereich des Zielgens, in Antisense-Orientierung hinter die Xylose-induzierbare Promotor/Operator Region (aus *Staphylococcus xylosus*) kloniert (siehe 4.21.2). Sowohl die Promotor/Operator-Region des Xylose-Operons, als auch das Gen für den Xylose-Repressor (*xylR*) befanden sich auf dem Plasmid pRB473. Das Plasmid wurde zunächst in *E. coli* kloniert und anschließend in den *S. aureus* Stamm RN4220 elektroporiert. Der Vektor trägt eine Ampicillin (*bla*)-Resistenzkassette für die Selektion in *E. coli* sowie eine Chloramphenicol (*cat*)-Resistenzkassette zur Selektion in *S. aureus*. Die Vektorkonstrukte wurden nach jedem Klonierungsschritt durch Plasmid-Minipräparation überprüft. Durch Zugabe von 0,5 % Xylose zum Medium und in Abwesenheit zusätzlicher Glukose, sollte die Transkription der Antisense-RNA induziert werden. Die Xylose bindet an den Xylose-Repressor, der daraufhin seine Konformation ändert und von der *xyl*-Operator-Region abfällt. Die Synthese der Antisense-RNA findet statt und das Wachstum der Bakterien sollte gehemmt sein, falls die Antisense-RNA ein essentielles Gen betrifft (Ji et al., 2001; Forsyth et al., 2002).

#### 4.21.5 Herstellung konditional letaler Mutanten mit dem pLL30/Pspac/pMJ8426-System

Das Plasmid pLL30 ist ein Shuttle-Vektor mit Temperatur-sensitivem Replikationsursprung im gram-positivem Wirt (Jana et al., 2000). Der Vektor verfügt über zwei Multiple-Cloning-Sites (MCS). Zwischen den beiden MCS befindet sich eine Insertionskassette, die sowohl eine Chloramphenicol (*cat*)-Resistenzkassette, eine Terminatorregion, als auch den regulierbaren Promotor Pspac enthält. In die MCS „downstream“ des Pspac-Promotors wurden ca. 1000 bp des 5'-Bereiches des Zielgens oder die komplette Sequenz des Zielgens ohne Promotor aber mit Shine-Dalgarno-Sequenz kloniert. In die andere MCS wurde ein Fragment von ca. 1000 bp, das sich upstream des Zielgens befindet, kloniert. Die Fragmente wurden zuerst mit PCR amplifiziert, die für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen wurden an die Primer angefügt. Die Fragmente wurden zunächst

in den Vektor pGEM-T kloniert und anschließend in den Vektor pLL30 überführt. Die Klonierung erfolgte in *E. coli*. Eine Spectinomycin-Resistenzkassette (*spc*) diente zur Selektion in *E. coli*. Das fertige Vektorkonstrukt wurde dann in den Stamm *S. aureus* RN4220 transformiert. Nach jedem Schritt wurde das Vektorkonstrukt durch Plasmid-Minipräparation überprüft. In den Staphylokokken sollte dann ein doppeltes Rekombinationsereignis innerhalb der beiden klonierten Fragmente in der MCS und der entsprechenden homologen Region auf dem Chromosom stattfinden. Durch ein doppeltes Rekombinationsereignis gelangt der Pspac-Promotor vor das Zielgen. Außerdem wurde auch die Chloramphenicol-Resistenzkassette (*cat*) vor dem Zielgen integriert und diente zur Selektion der Insertionsmutanten. Durch dreimaliges Subkultivieren der Bakterien bei 42 °C sollte das Plasmid verloren gehen und das doppelte Rekombinationsereignis begünstigt sein. Das Plasmid pLL30 trägt eine Tetrazyklin-Resistenzkassette zur Selektion in *S. aureus*. Nach erfolgreicher Rekombination und nach Verlust des Plasmides bei 42 °C ist eine Vorselektion der rekombinaten Klone möglich, da sie Chloramphenicol-resistent und nach Verlust des Plasmides Tetrazykline-sensitiv sind. Klone, die dieses Wachstumsverhalten zeigten, wurden durch Southern Blot-Analyse überprüft. In den Insertionsmutanten wurde das Zielgen unter dem Einfluß des Pspac-Promotors konstitutiv exprimiert. Zur Regulation der Gen-Expression wurde das Plasmid pMJ8426 in die Mutanten eingebracht. Auf diesem Plasmid ist der Lactose-Repressor (LacI) codiert, der an die *lac* Operator-Region in Pspac bindet und die Transkription unterdrückt. Durch Zugabe von IPTG kann die Transkription induziert werden. Die Substanz IPTG bindet an den Repressor LacI, der Repressor ändert daraufhin seine Konformation und fällt von der *lac*-Operator Region ab. Dadurch ist die Transkription an Pspac möglich.

#### 4. 22 Verwendete Computerprogramme und Websites

- [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
  - Pubmed
  - BLAST N, BLAST P (Altschul, 1997)
  - ORF finder
  - BLAST 2 sequences
  - CD-Search
  - genomische Sequenz *S. aureus* N315, Mu50, MW2
- [www.tigr.org](http://www.tigr.org)
  - genomische Sequenz *S. aureus* COL

- [www.genome.ou.edu](http://www.genome.ou.edu)  
-genomische Sequenz *S. aureus* 8325
- [www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)  
-genomische Sequenz *S. aureus* MSSA252, MRSA476
- <http://genoliste.pasteur.fr>  
-genomische Sequenzen von *E. coli* und *B. subtilis*
- [www.genome.ad.jp](http://www.genome.ad.jp)  
-KEGG (Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes)
- [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)  
-ProtParam tool

-Vektor NTI Suite (Infor Max)

-GenePix Pro 4.0 (Molecular Dynamics)

-MyiQ, Single-Color-Real-Time PCR Detection System, Version 1.0 (Bio Rad)

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Herstellung und Charakterisierung von Deletionsmutanten

#### 5.1.1 Untersuchungen zu *nfrA* (SA0367)

##### 5.1.1.1 Deletion von *nfrA* (*ywcG*)

Das *ywcG*-Gen codiert für eine Oxidoreduktase, die von Moch et al. (1998) in *B. subtilis* charakterisiert wurde. Das Gen *ywcG* wurde in *B. subtilis* in *nfrA* umbenannt (Moch et al., 2000). Zu Beginn dieser Arbeit wurde das zu *nfrA* orthologe Gen SA0367 aus *S. aureus* ebenfalls *ywcG* genannt und später ebenfalls in *nfrA* umbenannt. Zunächst wurde die codierende Sequenz des *nfrA*-Gens (756 bp) in *S. aureus* durch die Sequenz der Erythromycin-Resistenzkassette (*ermB*, 1346 bp) ausgetauscht. Wie bereits beschrieben, (siehe Methoden 4.21.1) wurden je ein DNA Fragment upstream und downstream des Zielgens amplifiziert und flankierend zur *ermB*-Kassette in den Vektor pBT2 kloniert. Nachdem das Plasmid in den Zielstamm *S. aureus* 8325 transduziert wurde, sollte durch ein doppeltes Crossover zwischen den beiden Sequenzen auf dem Plasmid und den entsprechenden homologen Sequenzen auf dem Chromosom des Empfängers das *nfrA*-Gen gegen die *ermB*-Kassette ausgetauscht werden. An die Primer wurden die für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen angehängt. Für das upstream Fragment wurden die Primer *ywcGEcoRI* und *ywcGXbaI* verwendet. Das Fragment umfasste 837 bp. Das downstream Fragment wurde mit den Primern *ywcGPstI* und *ywcGBamHI* amplifiziert und war 850 bp lang. Die *ermB* Kassette wurde aus dem Vektor pGEMTermB1 mit den Enzymen *EcoRI* und *PstI* herausgespalten. Das Ereignis eines doppelten Crossovers ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

Nach einem erfolgtem doppeltem Crossover sind nur noch 11 bp des *nfrA*-Gens am 3`-Ende vorhanden. Zusätzlich zum Open Reading Frame (ORF) wurden 140 bp upstream des *nfrA* ORFs deletiert. In diesem Bereich liegt keine Protein-codierende Sequenz. Putative Deletionsmutanten können anhand ihrer erworbenen Resistenz gegenüber Erythromycin vorselektiert werden, außerdem sollten die Deletionsmutanten nach dreimaliger Subkultivierung bei 42 °C, den Vektor pBT2 verloren haben und Chloramphenicol sensitiv sein. Klone, die dieses Wachstumsverhalten zeigten wurden durch Southern Blot-Analysen überprüft. Durch Hybridisierung mit entsprechenden Sonden konnte nachgewiesen werden, dass die *ermB*-Kassette in das Genom integriert war und das Zielgen dabei deletiert wurde

(Abb. 3). Die *ermB*-Sonde wurde mit den Primern *erm3* und *erm4* hergestellt, die Sonde umfasste 1364 bp der *ermB*-Kassette. Außerdem wurden eine weitere Sonde mit den Primern *ywcGSo1* und *ywcGSo2* hergestellt, diese Sonde umfasste 390 bp aus dem *nfrA*-ORF. Eine dritte Sonde wurde mit den Primern *ywcGEcoRI* und *ywcGXbaI* synthetisiert, diese Primer wurden auch zur Klonierung des upstream Fragmentes von *nfrA* (*ywcG*) verwendet.

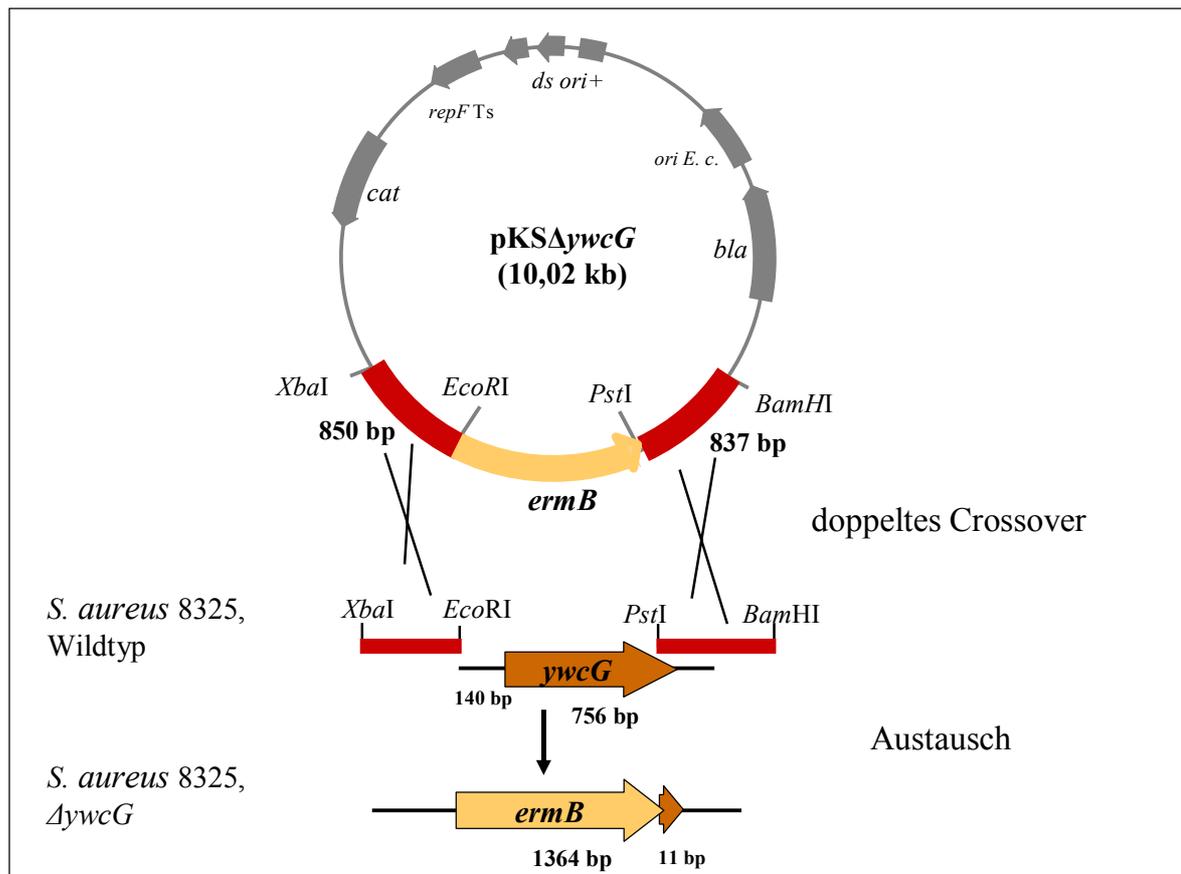


Abb. 2: Schematische Darstellung des doppelten Crossovers zur Deletion von *ywcG* (*nfrA*). Upstream und downstream Fragmente des Zielgens, mit der Länge 850 bp und 837 bp, flankieren die Erythromycin-Resistenzkassette (*ermB*) auf dem Shuttle-Vektor pBT2. Bei homologer Rekombination der identischen Sequenzen auf dem Plasmid und der chromosomalen DNA des Zielstammes kommt es zum Austausch des Zielgens *nfrA* durch die Erythromycin-Resistenzkassette *ermB*. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

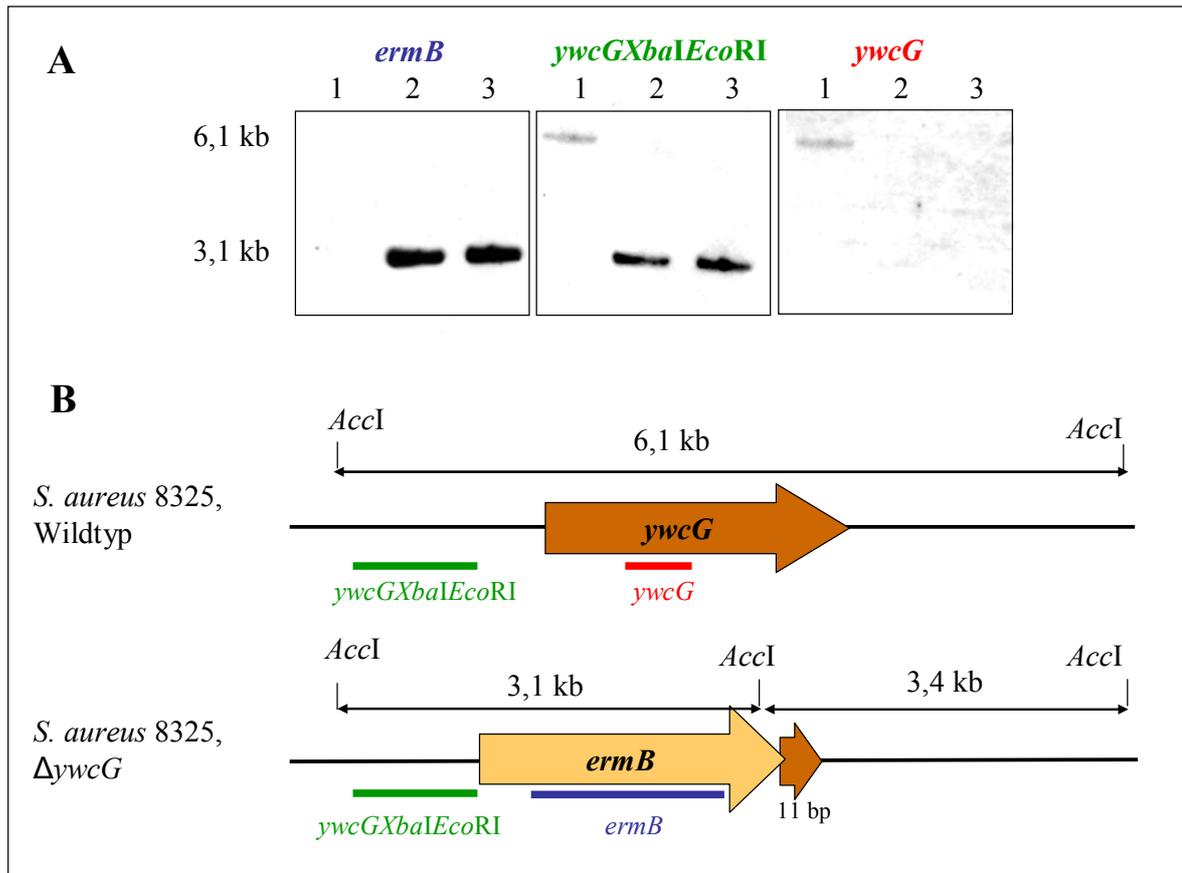


Abb. 3: (A) Southern-Hybridisierungen der *nfrA* (*ywcG*)-Nullmutanten im Vergleich zum Wildtyp. Spur 1: Wildtypische chromosomale DNA aus *S. aureus* 8325; Spur 2 und 3: Chromosomale DNA aus *S. aureus* 8325  $\Delta nfrA$ . (B) schematische Darstellung des mutierten Bereichs auf dem Chromosom. Die chromosomale DNA der Mutanten und des Wildtyp-Stammes wurde mit dem Enzym *AccI* gespalten. Die Bereiche, mit denen die verwendeten Sonden in (A) hybridisieren, sind durch farbige Balken gekennzeichnet.

Die Deletion des *nfrA*-Gens wurde auch auf Transkriptionsebene im Northern Blot und mittels RT-PCR nachgewiesen. Für beide Methoden wurde die RNA aus einer Bakterienkultur bei einer  $OD_{600}$  von 1,0 isoliert. Die Sonden für den Northern Blot wurden mit den Primern *ywcG*So1 und *ywcG*So2 sowie zum Nachweis der Erythromycin-Kassette mit den Primern *erm3* und *erm4* hergestellt. Für die RT-PCR wurde zuerst die reverse Transkription mit „random“ Hexamer-Primern (Amersham) durchgeführt. Die anschließende Nachweis-PCR erfolgte ebenfalls mit den Primern *ywcG*So1 und *ywcG*So2. Das Primer-Paar *dnaERT1* und *dnaERT2* diente als Kontroll-PCR zum Nachweis gleicher Mengen RNA in dem Ausgangsmaterial (Abb. 4).

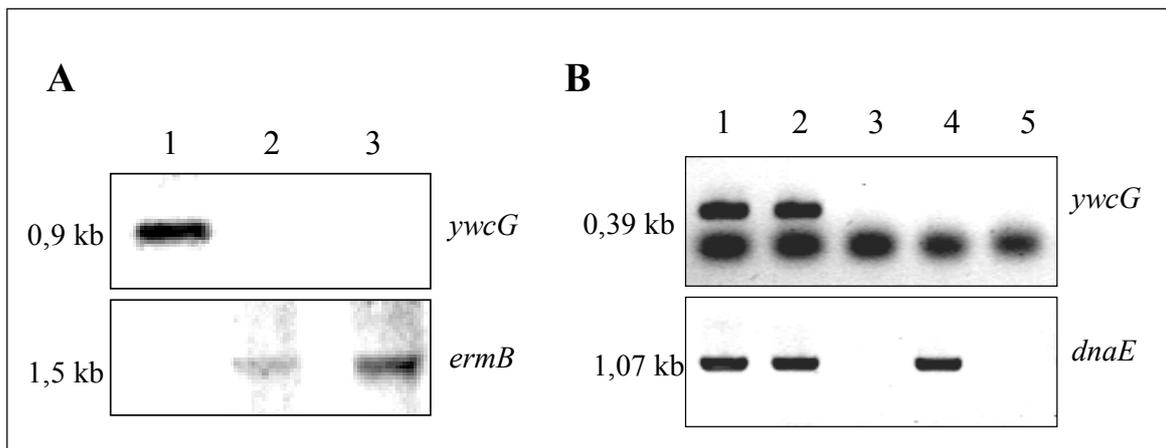


Abb. 4: Northern Blot Analyse (A) und RT-PCR-Analyse (B) der *ywcG(nfrA)*-Nullmutante. (A) Je 10  $\mu\text{g}$  RNA aus Wildtyp und Mutante wurden in je eine Spur des Gels aufgetragen und nach dem Blotten der RNA auf eine Nylonmembran mit den angegebenen Sonden (*ywcG* und *ermB*) hybridisiert. Spur 1: RNA aus Wt, Spur 2 und 3: RNA aus  $\Delta ywcG$ . (B) Je 2  $\mu\text{g}$  RNA aus Wildtyp und Mutante wurden mit random Hexamer-Primern umgeschrieben. Die Nachweis PCR erfolgte mit den Primern *ywcG*So1 und *ywcG*So2, sowie *dnaERT1* und *dnaERT2*. Spur 1: PCR-Produkt von genomischer DNA; Spur 2: PCR-Produkt von cDNA aus Wt, Spur 3: Kontroll-PCR von RNA aus Wt, Spur 4: cDNA aus  $\Delta ywcG$ , Spur 5: Kontroll-PCR mit RNA aus  $\Delta ywcG$ .

Die Ergebnisse der Southern Hybridisierung, der Northern Hybridisierung und der RT-PCR weisen eindeutig nach, dass das Zielgen *nfrA* durch die Erythromycin-Resistenzkassette *ermB* ausgetauscht wurde und kein *nfrA*-Transkript in den Bakterien vorhanden ist. Das Protein NfrA ist daher für *S. aureus* nicht essentiell.

### 5.1.1.2 Charakterisierung der *nfrA*-Deletionsmutante

Wachstumsexperimente in LB-Medium bei 37 °C und 42 °C zeigten keine Wachstumsverminderung der *nfrA(ywcG)*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5). Die zu *nfrA* homologen Gene *nfsA* in *E. coli* (Paterson et al., 2002; Liochev et al., 1999) und *nfrA* in *B. subtilis* (Mostertz et al., 2004) werden durch oxidativen Stress induziert. Daher wurde zunächst die Sensitivität von Wildtyp und der  $\Delta nfrA$ -Mutante gegenüber Wasserstoffperoxid verglichen. Falls das NfrA-Protein eine wichtige Rolle bei der Bewältigung von oxidativem Stress spielt, würde man eine erhöhte Sensitivität der  $\Delta nfrA$ -Mutante gegenüber dem Wildtyp erwarten. Ein mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  getränkter Filter wurde auf eine Agarplatte mit einem frisch ausgestrichenen Bakterienrasen gelegt. Die Versuchsdurchführung wurde unter 4.16 beschrieben. Die Größe der Hemmhöfe um den mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  getränkten Filter ist ein Maß für die Sensitivität der Bakterien gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Hemmhöfe der gewachsenen Kulturen unterschieden sich nicht zwischen Wildtyp *S. aureus* 8325 und der isogenen *nfrA*-Nullmutante.

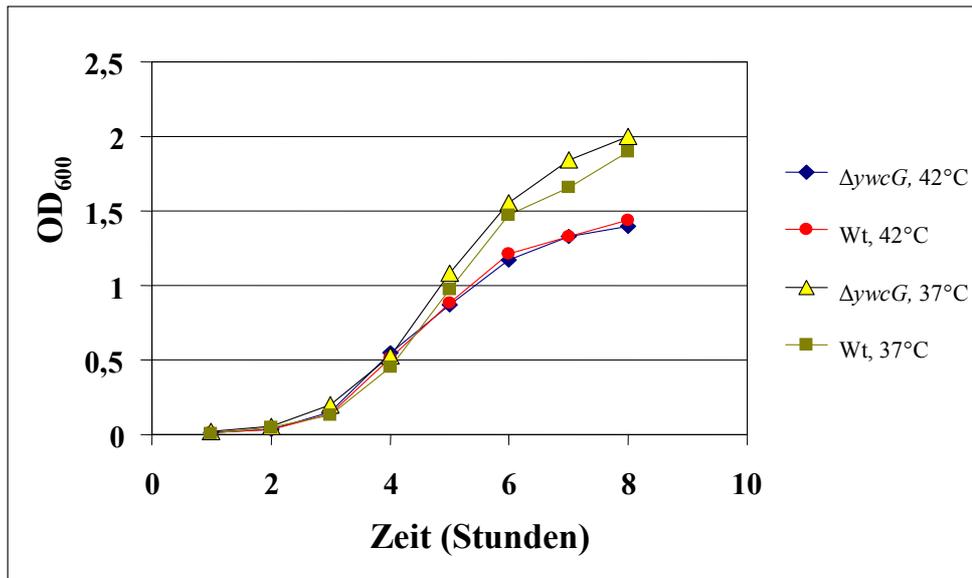


Abb. 5: Wachstumskurven vom Wildtyp *S. aureus* 8325 und der isogenen *ywcG(nfrA)*-Deletionsmutante. Die Wachstumskurve wurde in LB-Medium bei 37 °C und 42 °C aerob unter Schüttel durchgeführt.

Die Sensitivität der *nfrA*-Deletionsmutante gegenüber Diamide wurde ebenfalls untersucht. Diamide ist ein spezifisches Oxidants für Thiole und verursacht Disulfid-Brücken Bildung. Dieser Disulfid-Stress kann als eine Form von oxidativem Stress angesehen werden, da ein Haupteffekt von reaktiven Sauerstoff-Molekülen die Oxidation von Thiolen zu Disulfiden ist. (Leichert et al., 2003). In einer 96-well Platte wurden über 12 Stufen Verdünnungsreihen von Diamide, beginnend mit einer Diamide-Konzentration von 16 µg/ml, angelegt. In jede Vertiefung einer Verdünnungsreihe wurde entweder der Wildtyp *S. aureus* 8325 oder die isogene *nfrA*-Deletionsmutante pipettiert. Die Versuchsdurchführung entspricht einer MHK-Bestimmung (Vergleiche 4.15). Die beimpfte 96-well Platte wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Sowohl für Wildtyp als auch für die Mutante betrug die MHK 0,5 µg/ml Diamide.

Außerdem wurde die MHK von *S. aureus* 8325 Wildtyp und Mutante für die organische Nitro-Verbindung Nitrofurantoin bestimmt (siehe 4.15). Für den Wildtyp betrug die MHK **4 µg/ml**. Die MHK der *ΔnfrA*-Mutante betrug **8 µg/ml**. Die erhöhte Resistenz der Deletionsmutante gegenüber dem Wildtyp deutet auf eine Nitroreduktase-Aktivität des NfrA-Proteins hin.

Die Empfindlichkeit der *nfrA*-Deletionsmutante gegenüber Ethanol wurde ebenfalls mit dem Wildtyp verglichen, dazu wurden Wachstumskurven bei 37 °C mit verschiedenen Konzentrationen von Ethanol durchgeführt. In Gegenwart von 5 % Ethanol war kein

Unterschied im Wachstum zwischen Wildtyp und Mutante zu erkennen. Erst bei höheren Ethanol-Konzentrationen von 6,5 % zeigte die *nfrA*-Deletionsmutante einen geringen Wachstumsnachteil (Abb. 6).

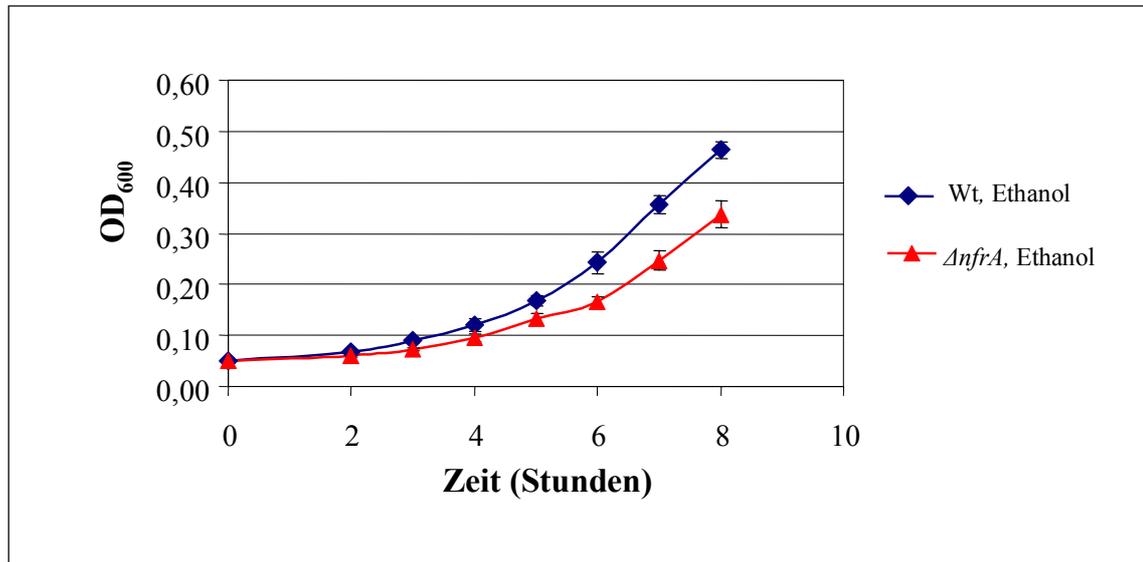


Abb. 6: Wachstumskurve bei 37°C in LB-Medium in Gegenwart von 6,5% Ethanol unter Schütteln. Blaue Symbole: Wachstum *S. aureus* 8325, Wildtyp. Rote Symbole: *S. aureus* 8325,  $\Delta nfrA$ . Die Standardabweichung aus drei getrennt durchgeführten Experimenten ist angegeben.

Das Wachstum der Deletionsmutante  $\Delta nfrA$  wurde außerdem unter anaeroben Bedingungen untersucht. Wildtyp *S. aureus* 8325 und die isogene  $\Delta nfrA$ -Mutante wurden auf LB-Platten ausgestrichen und im Anaerobiertopf (Anaerocult, Merck) bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. Es konnten keine Wachstumsunterschiede dieser beiden Stämme unter den beschriebenen Bedingungen festgestellt werden. Die beiden Stämme wurden außerdem auf ihre hämolytische Aktivität untersucht. Wildtyp und Mutanten wurden auf Blutplatten (LB-Platten mit 5 % Kaninchenblut) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Hämolysehöfe um den gewachsenen Bakterienausstrich waren für beide Stämme gleich groß. Es konnte kein Unterschied in der hämolytischen Aktivität der beiden Stämme erkannt werden (Daten nicht gezeigt).

### 5.1.1.3. Expression von *nfrA* im Verlauf der Wachstumskurve

Die *nfrA*-Deletionsmutante unterschied sich phänotypisch vom Wildtyp nur in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Ethanol und Nitrofurantoin. Um das *nfrA*-Gen näher zu charakterisieren, wurden im Folgenden Expressionsanalysen im Wildtyp durchgeführt. Das Gen *nfrA* wurde in *B. subtilis* während des gesamten vegetativen Wachstums exprimiert. Jedoch wurde zu Beginn der stationären Phase auf Transkriptionsebene (Northern-

Hybridisierung) eine verstärkte Expression von *nfrA* festgestellt (Moch et al., 1998). In *S. aureus* wurde zunächst die Expression des *nfrA*-Gens im Verlauf der Wachstumskurve durch Northern-Hybridisierung analysiert. Für die Hybridisierung des Blots wurde dieselbe *nfrA*-Sonde verwendet, wie unter 5.1.1.1 beschrieben, zur Herstellung der *16SrRNA*-Sonde wurden die Primer *16rRNAup* und *16rRNAdown* verwendet, die Sonde umfasste 710 bp. Zum Erstellen der Wachstumskurve wurden 5 ml einer Übernachtskultur von *S. aureus* 8325 in LB-Medium unter Schütteln bei 37 °C angezogen. Am nächsten Morgen wurde eine frische 50 ml Kultur mit der Übernachtskultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,02 angeimpft und bei 37 °C weiter kultiviert. Zu verschiedenen Wachstumsphasen wurden Proben für die RNA-Isolierung entnommen und die optische Dichte wurde bei 600 nm gemessen. Das *nfrA*-Gen von *S. aureus* wurde in jeder Wachstumsphase exprimiert. Eine leichte Zunahme der Expression von *nfrA* war während der späten exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> zwischen 1,1 und 1,2) zu erkennen. In der späten exponentiellen Phase erhöhte sich die Expression von *nfrA*, verglichen mit der Expression in der frühen exponentiellen Phase und der stationären Phase, auf das 2-3-fache (Abb. 7). Diese Beobachtung wurde durch RT-PCR Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).

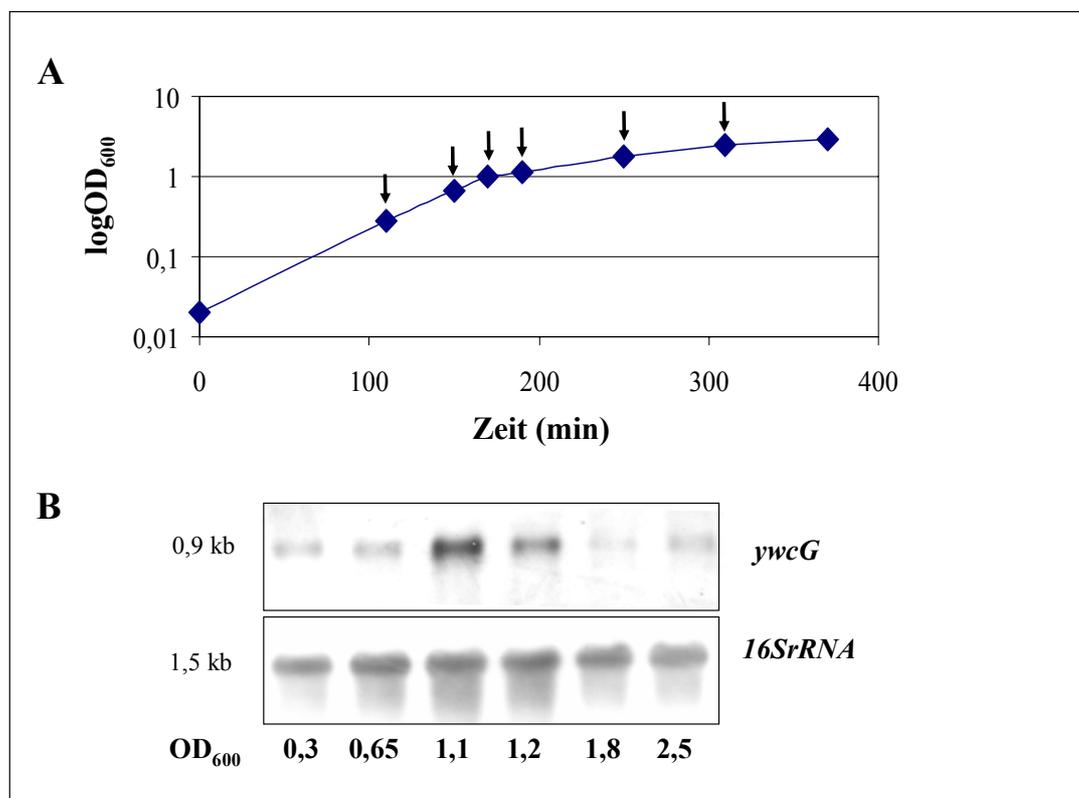


Abb. 7: Expression des *nfrA* (*ywcG*)-Gens im Verlauf des Wachstums. (A) Wachstumskurve des Wildtyps *S. aureus* 8325 bei 37°C in LB-Medium, aerob. Die Zeitpunkte der Probenentnahme für die RNA-Isolation sind durch Pfeile markiert. (B) Northern Hybridisierung der RNA. Die OD<sub>600</sub>, bei der die jeweiligen RNA isoliert wurde, ist angegeben. Der Blot wurde mit der *ywcG*-Sonde sowie mit der *16SrRNA*-Sonde hybridisiert.

#### 5.1.1.4 Stress-vermittelte Induktion der Expression von *nfrA*

Die Expression von *nfrA* wird in *B. subtilis* durch Hitze induziert (Moch et al., 2000). Außerdem gibt es Hinweise aus Microarray-Experimenten, das *nfrA* in *B. subtilis* auch durch oxidativen Stress ( $H_2O_2$  und Paraquat) induziert wird (Mostertz et al., 2004). Im wildtypischen Stamm *S. aureus* 8325 sollte nun ebenfalls untersucht werden, ob verschiedene Arten von Stress die Expression von *nfrA* beeinflussen. Die Bakterienkulturen wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,7 aerob unter Schütteln bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. Nachdem die Kulturen auf die angegebene  $OD_{600}$  0,5-0,7 herangewachsen waren, wurde eine Kultur dem entsprechenden Stress ausgesetzt. Zur Kontrolle blieb parallel dazu eine Kultur unbehandelt. Zur Anwendung von Hitze-Stress wurde die Bakterienkultur im Wasserbad bei 48 °C kultiviert. Außerdem wurde der Effekt von Wasserstoffperoxid (7,5 mM und 33 mM), von Diamide (1 mM), von Nitrofurantoin (8 µg/ml) und von Ethanol (6,5 %) auf die Expression von *nfrA* getestet. Zum Zeitpunkt 0 min, unmittelbar vor der Stress-Induktion, als auch 5 min und 20 min nach der Stress-Einwirkung wurde die RNA isoliert und durch RT-PCR analysiert. Mindestens zwei getrennte RNA-Isolationen wurden für jede Bedingung ausgewertet. Die Menge an *nfrA* Transkript nach 5 min und 20 min wird in Relation zum Zeitpunkt 0 min angegeben. Die Transkriptmenge zum Nullzeitpunkt wurde auf 1 gesetzt. Für jeden Ansatz wurden 2 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Die Nachweis-PCR erfolgte mit den Primern *ywcGSo1* und *ywcGSo2*. Ein weiterer PCR Ansatz mit den *16SrRNA* Primern *16rRNAup* und *16rRNA*down, wie unter 4.18.7 beschrieben, diente zur Normalisierung der Proben. Diese Induktionsexperimente wurden sowohl im *S. aureus* Stamm 8325 und *S. aureus* Stamm MA12 durchgeführt (Abb. 8a, 8b). In einem weiteren Versuchsansatz wurde der *S. aureus* Stamm 8325 erneut verschiedenen Stressbedingungen, wie oben beschrieben, ausgesetzt. Zum Zeitpunkt 0 min, unmittelbar vor der Stress-Induktion, und 20 min nach der Stress-Einwirkung wurde die RNA isoliert. Die RNA wurde bei diesem Ansatz durch Northern Blot-Analysen untersucht (Abb. 9).

Die Expression von *nfrA* wurde nicht durch die Einwirkung von Hitze induziert. Es konnte keine erhöhte Expression festgestellt werden, nachdem die Kultur 5 min oder 20 min bei 48 °C inkubiert wurde (Abb. 8a, 8b). Auch Northern Blot-Analysen zeigten keine Expression von *nfrA* durch Hitze-Stress (Abb. 9).

In Gegenwart von Wasserstoffperoxid war nur eine geringe Induktion der *nfrA*-Expression festzustellen. Eine Endkonzentration von 7,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Kultur hatte keinen Einfluss auf die Expression von *nfrA*. Erst bei sehr hohen Konzentrationen von 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte eine 3-4-fache Zunahme des Transkripts nach 20 min Inkubation festgestellt werden (Abb. 8). Auch im Northern Blot konnte nur eine geringe Induktion der *nfrA*-Expression bei Behandlung mit 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> festgestellt werden (Abb. 9).

Außerdem wurde die Expression von *nfrA* nach Behandlung mit Diamide (Disulfid-Stress) untersucht. Bereits 5 min nach Behandlung mit Diamide steigt die Expression von *nfrA* auf das 5-fache, nach 20 min auf das 12-15-fache an (Abb. 8).

Die Substanz Nitrofurantoin kann ebenfalls oxidativen Stress auslösen. Nitrofurantoin wird durch zelluläre Enzyme zum freien Radikal reduziert. Unter aeroben Bedingungen reagiert das Nitrofurantoin-Radikal mit Sauerstoff dabei bildet sich wieder die Ausgangssubstanz Nitrofurantoin und gleichzeitig entsteht das Superoxid-Radikal. In Gegenwart von Nitrofurantoin verstärkt sich die Expression von *nfrA* nach 5 min auf das 3-fache, nach 20 min auf das 8-fache (Abb. 8). Die Induktion der Transkription von *nfrA* durch Nitrofurantoin wurde auch im Northern Blot bestätigt (Abb. 9). Nitrofurantoin wird in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Die Zugabe des Lösungsmittels zur Bakterienkultur hatte keinen Einfluss auf die Expression von *nfrA* (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von *nfrA* wird außerdem durch Ethanol induziert; 5 min nach Zugabe von Ethanol erhöht sich die Expression von *nfrA* auf das 2-3 fache, nach 20 min auf das ca. 14-15 fache (Abb. 8). Die Induktion der Expression von *nfrA* durch Ethanol ist abhängig von der Ethanolkonzentration und kann bei Behandlung der Zellen mit 10 % Ethanol auf das 25-fache induziert werden. Der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Ethanol auf die Expression von *nfrA* wurde ermittelt. Dabei wurde die Menge des *nfrA* Transkripts 20 min nach Einwirkung von Ethanol mit dem Zeitpunkt 0 min, vor Zugabe von Ethanol, verglichen. Die Zugabe von Ethanol zur Kultur erfolgte wieder bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6. Die RNA wurde sowohl im Northern Blot als auch durch RT-PCR analysiert (Abb. 10). Dieselben Primer wie für Abb. 8 beschrieben wurden verwendet. Die Induktion der *nfrA*-Expression durch Ethanol findet auch statt, wenn die Kultur erst in der stationären Phase (OD<sub>600</sub> 2,8) dem Stressor ausgesetzt wird (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von *nfrA* wurde im selben Maße wie durch Ethanol auch durch Isopropanol induziert und wurde mit RT-PCR und im Northern Blot analysiert. Eine Behandlung der Bakterien mit 6,5 % Isopropanol in der exponentiellen Phase führte zur 15-20-fachen Induktion der Expression von *nfrA* innerhalb von 20 min (Abb. 9).

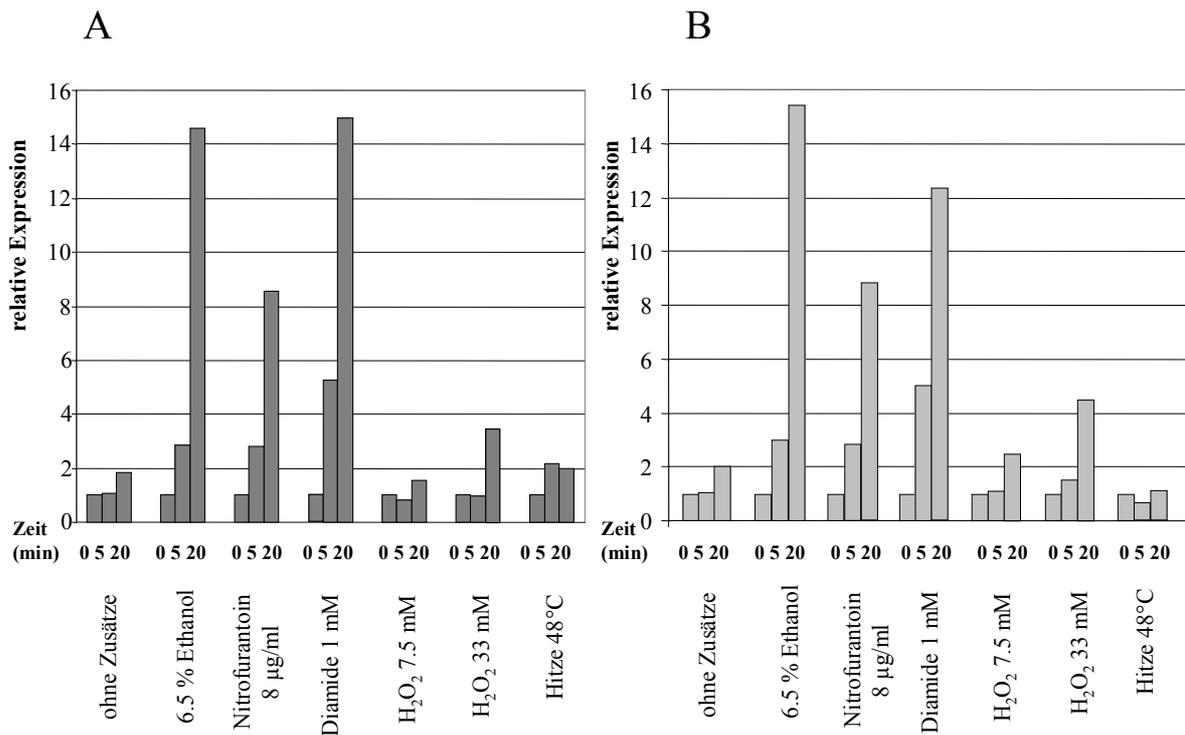


Abb. 8: RT-PCR zur Bestimmung der relative Expression des *nfrA*-Gens nach Einwirkung von Stress. Die Bakterienkultur wurde bei einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,7 verschiedenen Arten von Stress ausgesetzt. Zum Nullzeitpunkt, unmittelbar vor Stresseinwirkung, sowie zu den Zeitpunkten 5 min und 20 min in Gegenwart des Stressors wurde RNA isoliert. 2 µg RNA von jeder Probe wurde in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR quantifiziert. Die relative Expression gibt die Zunahme des *nfrA*-Transkripts nach Einwirkung von Stress relativ zum Nullzeitpunkt an. Die relative Expression zum Nullzeitpunkt wurde auf eins gesetzt. Jedes Diagramm zeigt Mittelwerte aus 2 getrennten Experimenten. (A) *S. aureus* 8325 (B) *S. aureus* MA12.

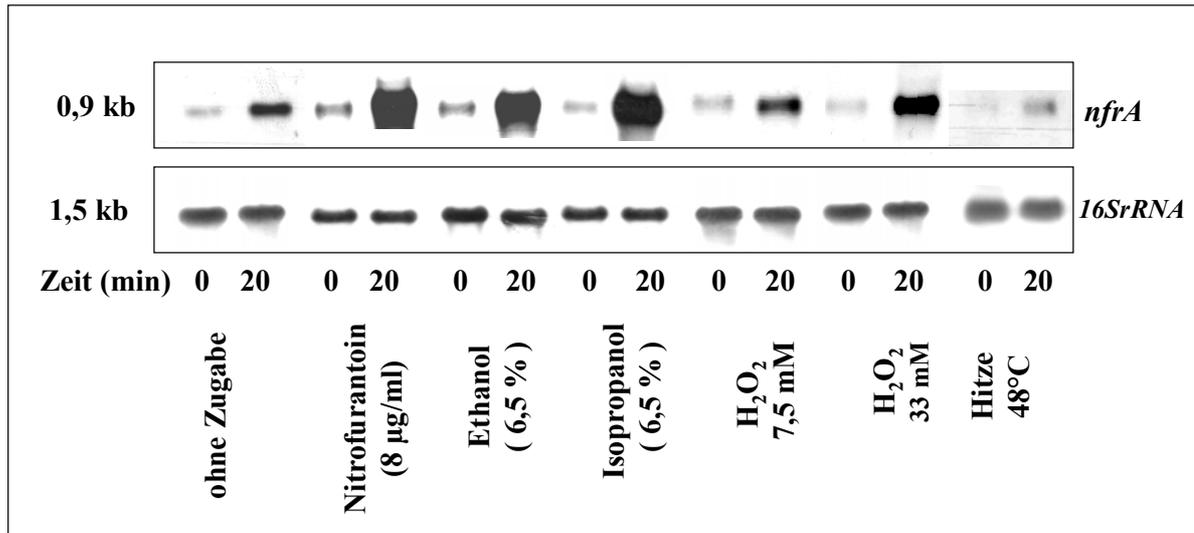


Abb. 9: Northern Blot-Analysen der *nfrA*-Expression nach Induktion mit verschiedenen Stressoren in *S. aureus* 8325.

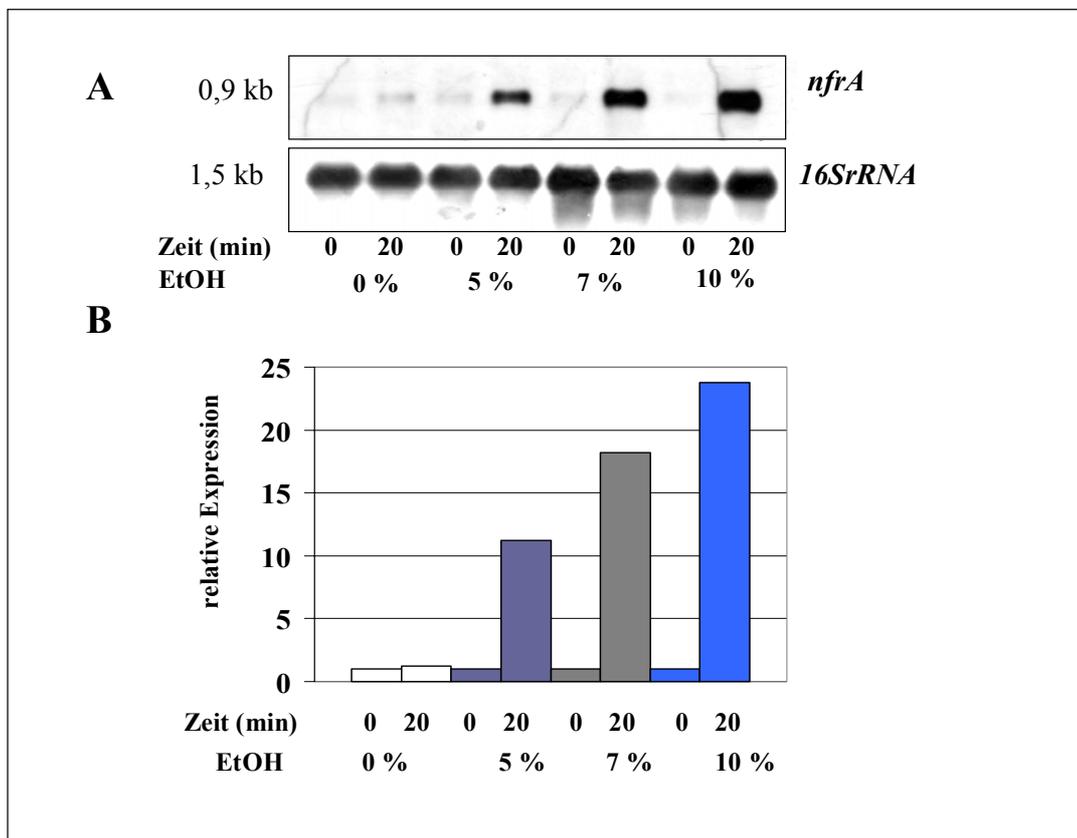


Abb. 10: (A) Northern Hybridisierung mit RNA aus Ethanol-behandelten *S. aureus* 8325-Zellen. In jede Spur wurde 12 µg RNA aufgetragen. Der Blot wurde mit den angegebenen Sonden hybridisiert. Die RNA wurde unmittelbar vor Zugabe von Ethanol (0 min) und 20 min nach Zugabe von Ethanol isoliert. Die Endkonzentration von Ethanol in der jeweiligen Kultur ist ebenfalls angegeben. (B) RT-PCR-Analyse derselben RNA-Proben. 2 µg RNA wurden mit random Hexamer-Primer umgeschrieben. Die Nachweis-PCR erfolgt mit *ywcG*- bzw. *16SrRNA*-spezifischen Primern. Die relative Expression von *ywcG* (*nfrA*) wird als Vielfaches der Transkriptmenge vom 20 min-Zeitpunkt zum 0 min-Zeitpunkt angegeben. Die Transkriptmenge von *ywcG* zum Nullzeitpunkt wurde gleich 1 gesetzt. Die *16SrRNA* diente zur Normalisierung der Proben (wie unter 4.18.7 beschrieben).

Außerdem wurde die Expression von *nfrA* unter Einwirkung von osmotischem Stress durch 5 % NaCl oder 5 % Glukose untersucht. Die Bakterien wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 mit Salz oder Glukose versetzt. Die RNA-Isolation erfolgte 2 min und 20 min nach Zugabe des Stressors zur Bakterienkultur. Als Positiv-Kontrolle wurde die *nfrA*-Expression durch Ethanol induziert und ebenfalls im Northern Blot zum Vergleich aufgetragen (Abb. 11). Die Expression von *nfrA* wird nicht durch 5 % Glukose oder 5 % NaCl induziert.

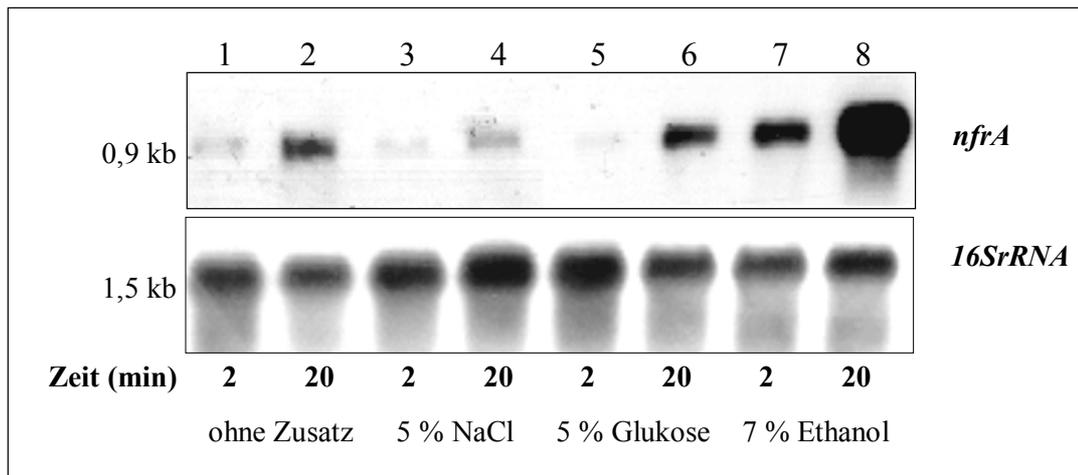


Abb. 11: Northern Hybridisierung mit RNA aus Stress-behandelten Zellen von *S. aureus* 8325 Wildtyp. Die Bakterien wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7 mit verschiedenen Substanzen behandelt. In jede Spur wurden 10 µg RNA aufgetragen. Spur 1 und 2: Kontrolle, RNA aus Bakterien, die keinem Stress ausgesetzt waren, Spur 3 und 4: RNA aus Zellen, die mit 5 % NaCl behandelt wurden. Spur 5 und 6: RNA aus Zellen, die mit 5 % Glukose behandelt wurden. Spur 7 und 8: RNA aus Ethanol-behandelten Zellen. Die RNA wurde 2 min und 20 min nach Zugabe der Substanzen isoliert. Die Hybridisierung des Blots erfolgte mit den angegebenen Sonden.

#### 5.1.1.5 Rolle von SigB bei der Stress-vermittelten Induktion von *nfrA*

Der alternative Sigma Faktor SigB ist in *S. aureus* an der allgemeinen Stress-Antwort beteiligt. Zum SigB Regulon gehört eine Vielzahl von Genen, die durch Hitze-Stress, oxidativen Stress und Säure-Stress induziert werden und zum Überleben der Bakterien unter diesen schädlichen Umwelteinflüssen beitragen (Gertz et al., 2000; Chan et al., 1998; Kullik et al., 1997; Horsburgh et al., 2002). Der Stamm *S. aureus* 8325 trägt eine 11 bp Deletion im *rsbU*-Gen. RsbU codiert für eine Phosphatase, die an der Aktivierung von SigB beteiligt ist. Die SigB-vermittelte Stress-Antwort in *S. aureus* 8325 ist durch den Defekt in *rsbU* maßgeblich eingeschränkt. Um herauszufinden, ob die RsbU-vermittelte Aktivierung von SigB für die Expression von *nfrA* bei oxidativem Stress oder Hitze-Stress benötigt wird, wurden die Induktions-Experimente im *S. aureus* Stamm MA12 wiederholt. Dieser Stamm besitzt ein intaktes *rsbU*-Gen und sollte in der SigB-vermittelten Stressantwort nicht eingeschränkt sein (Rachid et al., 2000). Die Induktions- Experimente wurden wie unter 5.1.1.4. beschrieben

durchgeführt. Die RNA wurde sowohl im Northern Blot als auch durch die RT-PCR analysiert. In dem *S. aureus* Stamm MA12 konnte, wie in dem *S. aureus* Stamm 8325, keine Induktion des *nfrA*-Gens durch oxidativen Stress oder durch Hitze-Stress festgestellt werden. Jedoch wurde im *S. aureus* Stamm MA12 die Expression von *nfrA* ebenfalls durch Ethanol, Nitrofurantoin und Diamide induziert (Abb. 8). Das Induktionsmuster in dem *S. aureus* Stamm MA12 entspricht dem Muster im *S. aureus* Stamm 8325 (Abb. 8). Diese Beobachtung legt nahe, dass die RsbU Phosphatase nicht an der Regulation des *nfrA*-Gens beteiligt ist.

Weitere Faktoren könnten an der Aktivierung des alternativen Sigma Faktor SigB beteiligt sein (Palma and Cheung, 2001). Um auszuschließen, dass SigB bei der Stress-vermittelten Induktion von *nfrA* eine direkte oder indirekte Rolle spielt, wurde die Expression von *nfrA* im *S. aureus*-Stamm MA12 mit der Expression im Stamm MA12.2 verglichen. Der *S. aureus*-Stamm MA12.2 ist die isogene *sigB*-Deletionsmutante vom Stamm *S. aureus* MA12 (Rachid et al., 2000). Die Bakterien wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,7 mit 6,5 % Ethanol behandelt. Zwei Minuten und zwanzig Minuten nach Zugabe von Ethanol wurde RNA isoliert und im Northern Blot analysiert. Zur Kontrolle wurde RNA aus unbehandelten Bakterien aufgetragen (Abb. 12). Die Expression von *nfrA* wurde in beiden Stämmen gleich stark induziert. Die Ethanol-vermittelte Induktion von *nfrA* ist unabhängig von SigB.

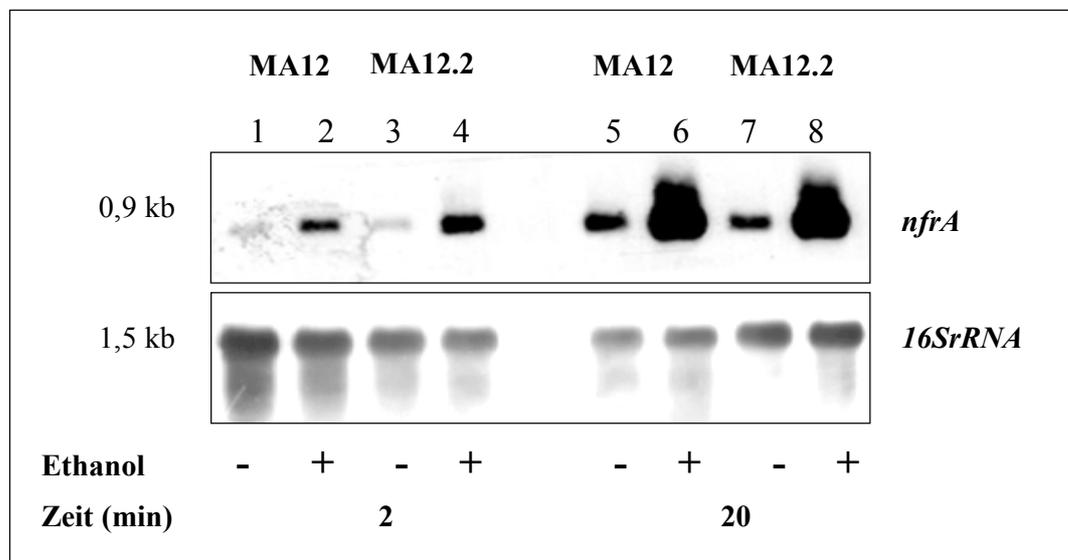


Abb. 12: Northern Hybridisierung von Ethanol-behandelten und unbehandelten Bakterien. In jeder Spur des Agarosegels waren 12 µg RNA aufgetragen. Die Zugabe von Ethanol ist durch ein „+“ gekennzeichnet. Die Zeitpunkte der RNA-Isolation sind ebenfalls angegeben. Spur 1, 2, 5, 6: RNA aus *S. aureus* MA12 (Wt); Spur 3, 4, 7, 8: RNA aus *S. aureus* MA12.2 ( $\Delta sigB$ ).

### 5.1.1.6 Untersuchung der Promotor-Struktur von *nfrA*

Zur Analyse des Transkriptions-Startpunktes von *nfrA* wurden Primer Extension-Experimente durchgeführt. Die RNA zur Primer Extension-Analyse wurde aus logarithmisch wachsenden und mit Ethanol induzierten *S. aureus* 8325 Zellen gewonnen (wie in den Methoden beschrieben). Parallel zur Primer Extension-Reaktion wurde die 5'-Region des *nfrA*-Gens sequenziert. Um die 5'-Region des *nfrA*-Gens zu sequenzieren, wurde dieser Bereich mit den Primern *ywcGupPEX1* und *ywcGupPEX2* amplifiziert und in den pGEM-T Vektor kloniert. Für die Primer Extension-Reaktion und die parallel durchgeführte Sequenzierung wurde der Primer *ywcGExtension* verwendet (Abb. 13).

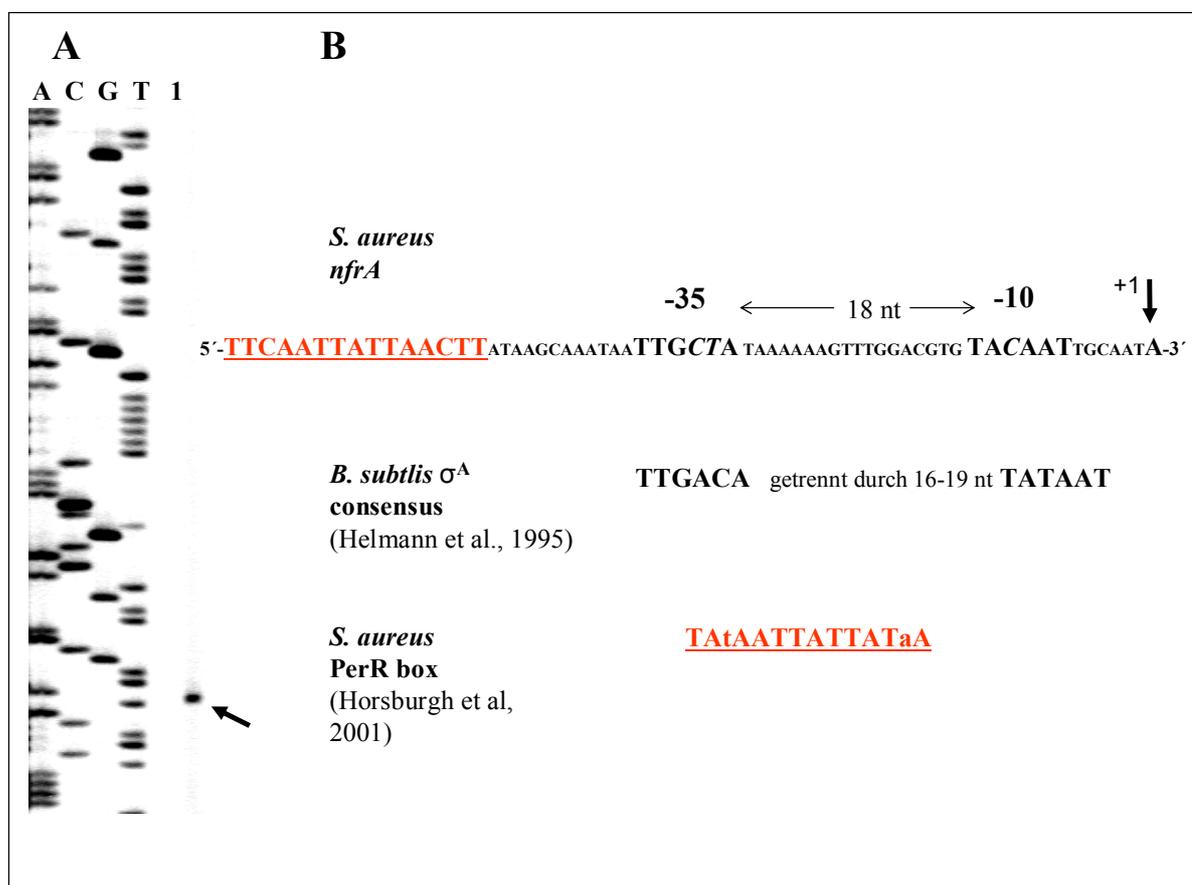


Abb. 13: (A) Primer Extension-Analyse des *nfrA*-Transkripts. Die RNA wurde aus Ethanol-induzierten Zellen bei einer  $OD_{600}$  von 0,9 isoliert. Das Produkt der Primer Extension-Reaktion (Pfeil) wurde parallel zur Sequenzierungsreaktion, die mit demselben Primer durchgeführt wurde, auf ein denaturierendes Gel aufgetragen. (B) Nukleotidsequenz des *nfrA*-Promotors. Das Transkript beginnt mit einem Adenin (Position +1). Die putative -10 Box und -35 Box des Promotors sind durch dick gedruckte Buchstaben hervorgehoben. Die Promotor Sequenz wird mit der SigA Consensus-Sequenz aus *B. subtilis* verglichen. Von der Consensus-Sequenz abweichende Nukleotide sind kursiv gedruckt. Eine putative PerR-Box, upstream des Promotors wurde rot hervorgehoben.

### 5.1.1.7 Biochemische Charakterisierung des NfrA-Proteins

#### 5.1.1.7.1 Überexpression und Aufreinigung von NfrA

Zur biochemischen Charakterisierung von NfrA wurde das Protein in *E. coli* überexprimiert. Die Sequenz des „Open Reading Frames“ von *nfrA*, ohne Stop-Codon, wurde mit den Primern Tryw<sub>c</sub>Gup und yw<sub>c</sub>Gdown amplifiziert und in den Vektor pCRT7/CT-TOPO kloniert. Das Protein wurde als His-Tag-Fusionsprotein exprimiert und über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Wie in den Methoden beschrieben, wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,54 induziert. Fünf Stunden nach der Induktion war die Expression des rekombinanten Proteins am stärksten. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Bakterienkultur geerntet und das Protein wurde isoliert und aufgereinigt (Abb. 14). Die errechnete Größe des NfrA-Proteins beträgt 28,6 kDa. Das rekombinante Protein vergrößert sich durch den terminalen His-Tag um 3,3 kDa auf 32 kDa.

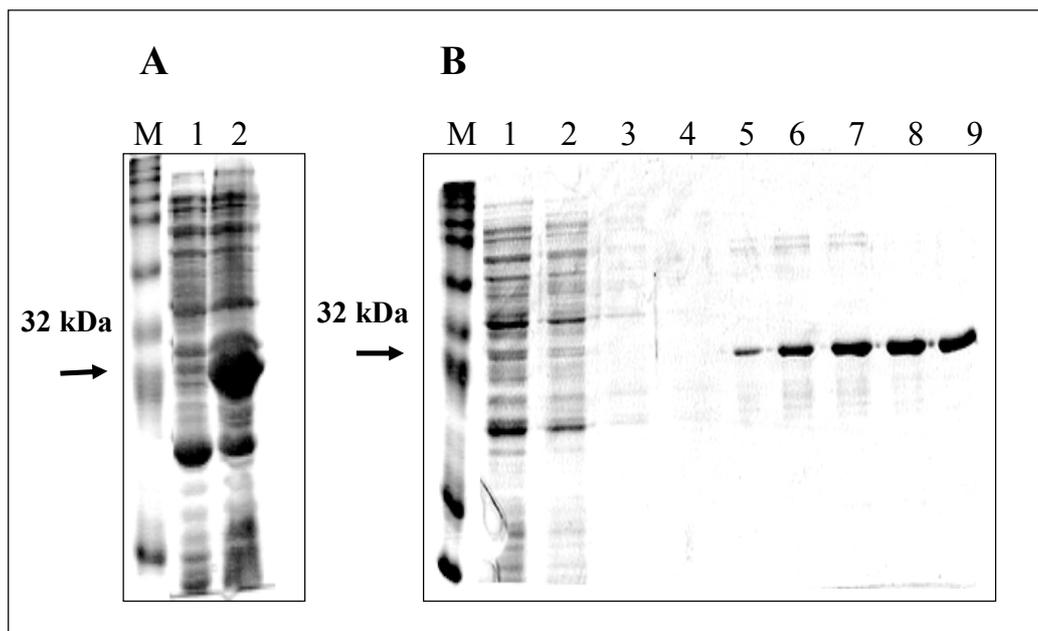


Abb. 14: Überexpression und Aufreinigung des NfrA-Proteins. (A) Die Expression des rekombinanten Proteins wurde durch IPTG induziert und in einem denaturierenden Proteingel analysiert. Das rekombinante Protein ist 32 kDa groß. Spur 1: Lösliche Proteinfraction aus Bakterienkultur ohne Zugabe von IPTG. Spur 2: Lösliche Proteinfraction aus IPTG-behandelter Bakterien Kultur. (B) Das rekombinante Protein wurde über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt. Spur 1: Erster Durchfluss des Gesamtzelllysats; Spur 2-4: Durchfluss nach dem Waschen der Säule mit 40 mM Imidiazol; Spur 5-9: Das Protein wurde mit 250 mM Imidazol von der Säule eluiert. Nur die Fraktionen 8 und 9 wurden für die biochemische Charakterisierung des Proteins verwendet.

### 5.1.1.7.2 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von NfrA

Das gereinigte Protein (nur Fraktion 8 und 9; Abb. 14) wurde zur biochemischen Charakterisierung des Proteins verwendet. Die zu NfrA homologen Proteine NfsA in *E. coli* und NfrA in *B. subtilis* sind als NADPH-abhängige Oxidoreduktasen charakterisiert worden (Moch et al., 1998; Zenno et al., 1996). Daher wurde zunächst die Aktivität des gereinigten Proteins NfrA in Gegenwart von NADPH und FMN gemessen. Die Oxidation von NADPH (und NADH) wurde photometrisch bestimmt. Die Absorption von NADPH besitzt bei 340 nm ein Maximum. Dieses Maximum fehlt der oxidierten Form. Das Enzym NfrA überträgt die Elektronen von NADPH auf FMN, dabei verringert sich die Absorption bei 340 nm. Die Abnahme der NADPH-Konzentration und damit der Absorption innerhalb einer gewissen Zeit ist gleichbedeutend mit der Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion. Die Anfangsgeschwindigkeit mit der eine enzymatische Reaktion abläuft ist abhängig von der Konzentration des Substrates (NADPH). Die Anfangsgeschwindigkeiten für die NADPH-Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  wurden bestimmt. Für jede Substratkonzentration wurden mindesten drei Messungen durchgeführt. Der Kehrwert der Anfangsgeschwindigkeiten wurde gegen den Kehrwert der Substratkonzentrationen in einem Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt. Das Diagramm ergab eine Gerade, die die Abszisse im Punkt  $-1/K_M$  schneidet. Aus diesem Schnittpunkt lässt sich die Michaelis-Konstante ( $K_M$ ) bestimmen (Abb. 15). Die Michaelis-Konstante ist die Substratkonzentration, bei der eine Enzym-katalysierte Reaktion mit der Hälfte ihrer Maximalgeschwindigkeit abläuft. Wie in den Methoden (4.19.6) beschrieben, wurde die enzymatische Reaktion in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,8), bei Raumtemperatur (21 °C) und in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt. Der  $K_M$ -Wert für die Oxidation von NADPH wurde in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  FMN bestimmt (Abb. 15). Die Michaelis-Konstante wurde mit 17  $\mu\text{M}$  errechnet. Wurde anstelle von 100  $\mu\text{M}$  FMN die gleiche Menge FAD verwendet, fand keine enzymatische Reaktion statt. Auch in Gegenwart von NADH anstelle von NADPH konnte keine enzymatische Aktivität festgestellt werden (Abb. 16). Nach Hitzebehandlung des Enzyms bei 70 °C für 10 min konnte auch bei Verwendung von NADPH und FMN keine enzymatische Aktivität mehr nachgewiesen werden.

Außerdem wurde die Reduktase-Aktivität von NfrA gegenüber den organischen Nitroverbindungen Nitrofurazon und Nitrofurantoin sowie gegenüber Eisencyanid und DTNB (5,5'-Dithiol-(2-Nitrobenzoesäure) gemessen. DTNB ist ein Disulfid, das durch

Reduktion in zwei Moleküle des Thiols TNB (Thionitrobenzoesäure) gespalten werden kann. Die Reduktion der Substrate wurde durch die Absorptionsänderung am Spektrometer bei geeigneter Wellenlänge verfolgt. Die genaue Versuchsdurchführung wurde unter 4.19.6 beschrieben. Das Enzym zeigt sowohl Nitroreduktase-Aktivität als auch eine geringe Disulfid-Reduktase Aktivität (Tab. 14). Ähnliche Reduktionseigenschaften wurden für das zu NfrA zu 37 % identische Enzym NfsA aus *E. coli* beschrieben (Zenno et al., 1996).

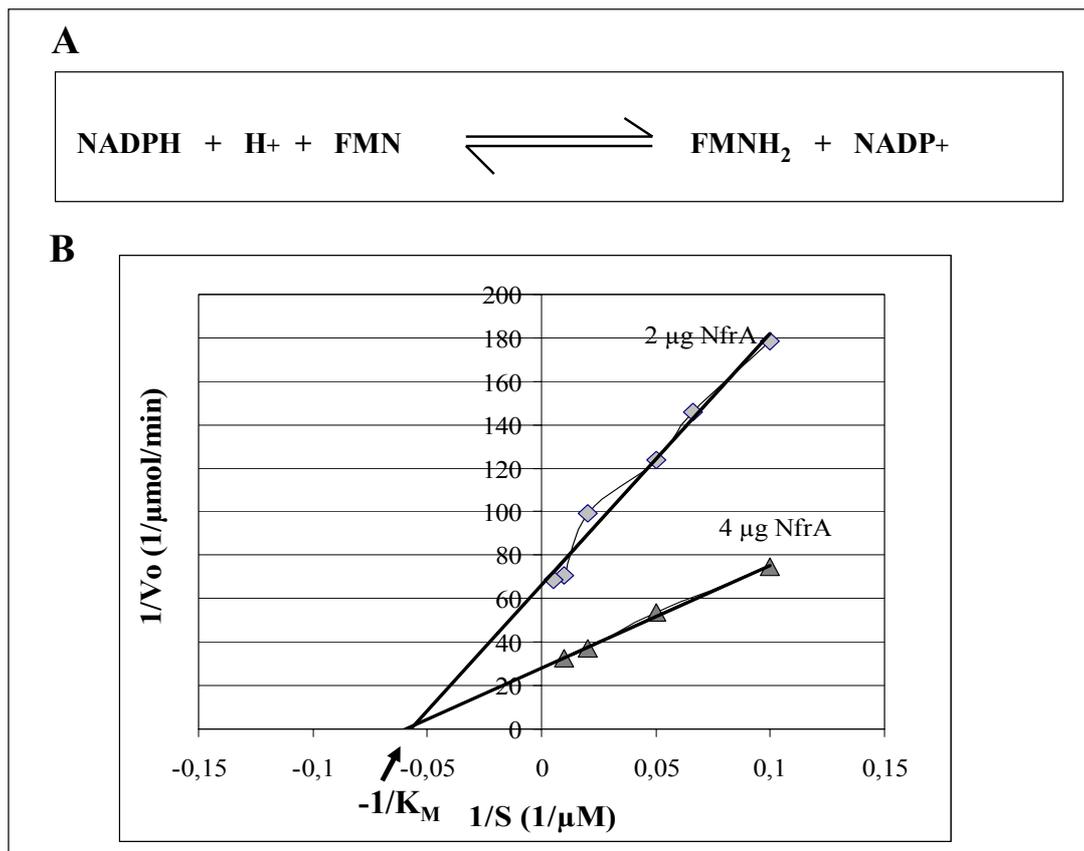


Abb. 15: Biochemische Charakterisierung von NfrA. (A) Darstellung der von NfrA katalysierten Reaktion. (B) Lineweaver-Burk Diagramm zur Bestimmung des  $K_M$ -Wertes der Oxidation von NADPH in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  FMN durch NfrA. Der  $K_M$ -Wert wurde für 2 verschiedene Proteinmengen bestimmt. Der  $K_M$ -Wert betrug 17  $\mu\text{M}$  bei 21°C und pH 6,8.

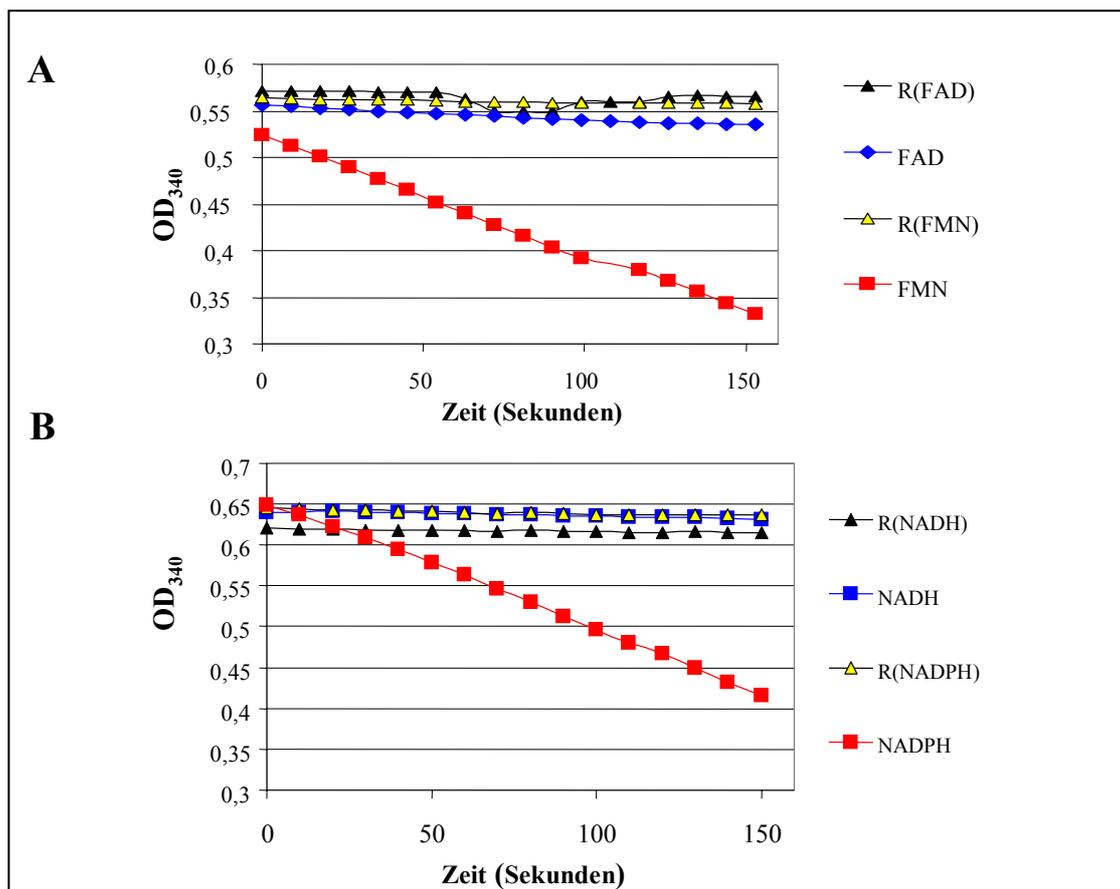


Abb. 16: Oxidation von NADPH oder NADH durch NfrA (YwcG) in Gegenwart von FMN oder FAD. (A) Oxidation von 100 µM NADPH in Gegenwart von 100 µM FMN oder 100 µM FAD. (B) Oxidation von 100 µM NADPH oder 100 µM NADH in Gegenwart von 100 µM FMN. Zur Kontrolle wurden die OD<sub>340</sub> der verwendeten Nukleotide ohne Zugabe von Enzym gemessen: R(FAD), Lösung mit 100 µM NADPH und 100 µM FAD; R(FMN), Lösung mit 100 µM NADPH und 100 µM FMN; R(NADH), Lösung mit 100 µM FMN und 100 µM NADH; R(NADPH), Lösung mit 100 µM FMN und 100 µM NADPH.

Tab. 14: Elektronen Akzeptor-Spezifität von NfrA im Vergleich mit NfsA.

Elektronen Akzeptor	Reduktase Aktivität (µmol/min/mg Protein)	
	NfrA	NfsA*
FMN	16	1
Nitrofurazon	20	73
Nitrofurantoin	15	82
Ferricyanide	97	251
DTNB	0,12	n.b.

(\*Die Ergebnisse zu NfsA stammen aus der Arbeit von Zenno et al., 1996; n.b.- nicht bestimmt)

Für alle enzymatischen Reaktionen war die Zugabe des Cofaktors FMN notwendig. Spektrophotometrische Untersuchungen des gereinigten Proteins ergaben die für ein Protein typischen maximalen Absorptionsmaxima bei 214 nm und 280 nm. Eine Lösung des Cofaktors FMN dagegen weist Absorptionsmaxima bei 224 nm, bei 268 nm, bei 375 nm und 448 nm auf (Abb. 17). Diese Daten deuten darauf hin, dass der Cofaktor FMN nur locker an das Protein gebunden vorliegt und während der Aufreinigung des Enzyms verloren gegangen war.

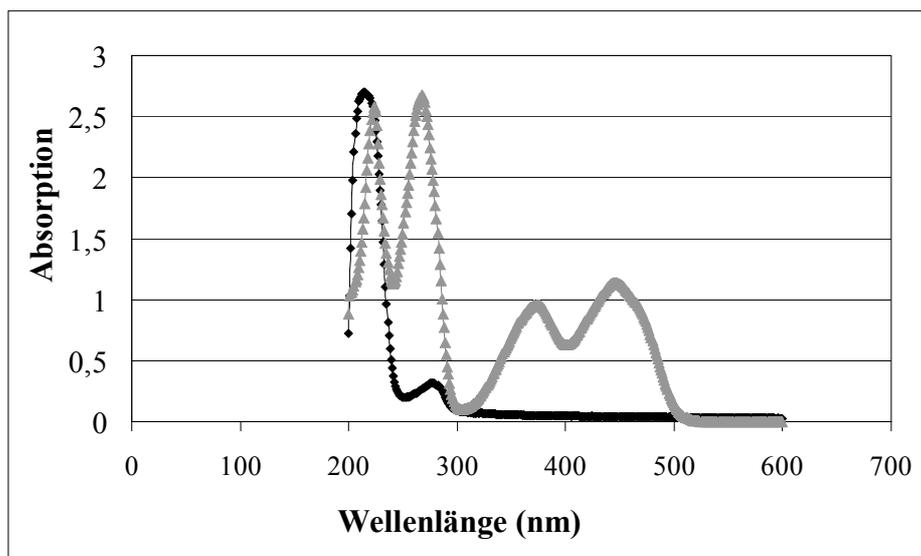


Abb. 17: Absorptionsspektrum von gereinigtem NfrA-Protein und freiem FMN. Schwarze Symbole zeigen das Absorptionsspektrum von NfrA bei einer Konzentration von 0,3 mg/ml (9,4  $\mu$ M), graue Symbole von FMN (10  $\mu$ M). Die Spektren wurden bei pH 6,8 in 0,1 M NaPO<sub>4</sub> Puffer gemessen. Die Protein (NfrA)-Lösung hatte Absorptionsmaxima bei 214 nm und 280 nm. Die Absorptionsmaxima von FMN liegen dagegen bei 224 nm, 268 nm, 375 nm und 448 nm.

#### 5.1.1.8. Chromosomale Lokalisation des *nfrA*-Gens

Das Gen *nfrA* (SA0367) wird als monocistronische Einheit transkribiert. Die Transkriptgröße wurde durch Northern Hybridisierung auf ca. 900 bp geschätzt. Der ORF besteht aus 756 bp, die in 251 Aminosäuren translatiert werden. Die genetische Umgebung von *nfrA* ist in allen 7 *S. aureus*-Stämmen (*S. aureus* 8325, N315, Mu50, MW2, MRSA252, MSSA476 und COL) die bislang sequenziert wurden konserviert (Abb. 18).

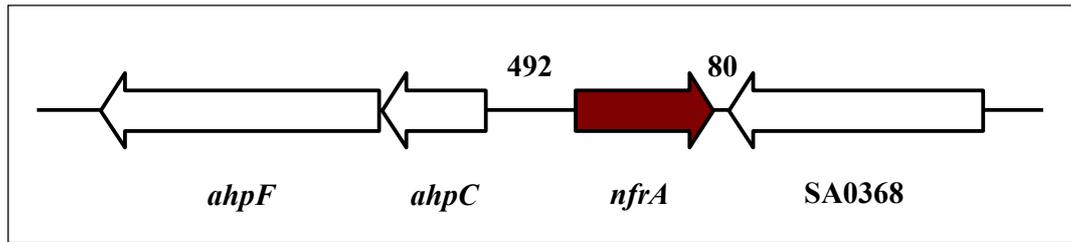


Abb. 18: Schematische Darstellung der chromosomalen Lokalisation des *nfrA*-Gens. Das *nfrA*-Gen wird monocistronisch transkribiert. Das Transkript ist etwa 900 bp lang. Die benachbarten Gene sind auf dem DNA-Minus-Strang codiert. Die Distanz zu den benachbarten ORFs ist in schwarzen Zahlen angegeben. Die Gene *ahpC* und *ahpF* bilden ein Operon. *AhpC* und *AhpF* codieren jeweils für die kleine und große Untereinheit der Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase. SA0368 codiert für ein hypothetisches Protein mit Ähnlichkeit zu einem  $H^+/Na^+$ -Glutamat-Symport-Protein.

## 5.1.2 Untersuchungen zu *pknB* (SA1063)

### 5.1.2.1 Deletion von *pknB* (Ser/Thr-Kinase)

Das Protein SA1063 von *S. aureus* weist Homologien zu Ser/Thr-Protein-Kinasen auf. Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine Ser/Thr-Kinase in *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben, die zu SA1063 zu 30 % identisch ist und als *pknB* bezeichnet wurde (Av-Gay et al., 1999). Aus diesem Grund wurde SA1063 in dieser Arbeit auch *pknB* genannt. Zunächst wurde die codierende Sequenz von SA1063 (1995 bp) in *S. aureus* deletiert, indem sie gegen die codierende Sequenz der *ermB*-Kassette ausgetauscht wurde. Die Durchführung wurde bereits unter 4.21.1 beschrieben und für *nfrA* in Abb. 2 schematisch dargestellt. Das upstream-Fragment wurde mit den Primern *pknBEcoRI* und *pknBHindIII* amplifiziert und war 1006 bp groß, für das downstream-Fragment wurden die Primer *pknBBamHI* und *pknBPstI* verwendet. Das downstream-Fragment war 1018 bp lang. Die *ermB*-Kassette wurde über die Schnittstellen *EcoRI* und *PstI* zwischen die beiden Fragmente kloniert, die *ermB*-Kassette wurde aus dem Vektor pGEMTermB1 isoliert. Der komplette ORF SA1063 ist 1995 bp lang, nach erfolgtem doppeltem Crossover bleiben noch 363 bp vom 3'-Ende des ORFs erhalten. Am 5'-Ende wurden 5 nt zusätzlich zum ORF deletiert. Die Mutanten wurden durch Southern Hybridisierung (Abb. 19) und RT-PCR (Abb. 20) überprüft. Zur Herstellung der *ermB*-Sonde für die Southern Hybridisierung wurden die Primer *erm3* und *erm4* verwendet. Eine weitere Sonde war das zur Klonierung verwendete upstream-Fragment *pknBEcoRI/HindIII*. Außerdem wurde eine Sonde verwendet, die im deletierten Bereich von SA1063 (*pknB*) hybridisiert. Die Primer zur Amplifizierung dieser Sonde waren *pknBS01* und *pknBS02*. Die Sonde umfasste 745 bp.

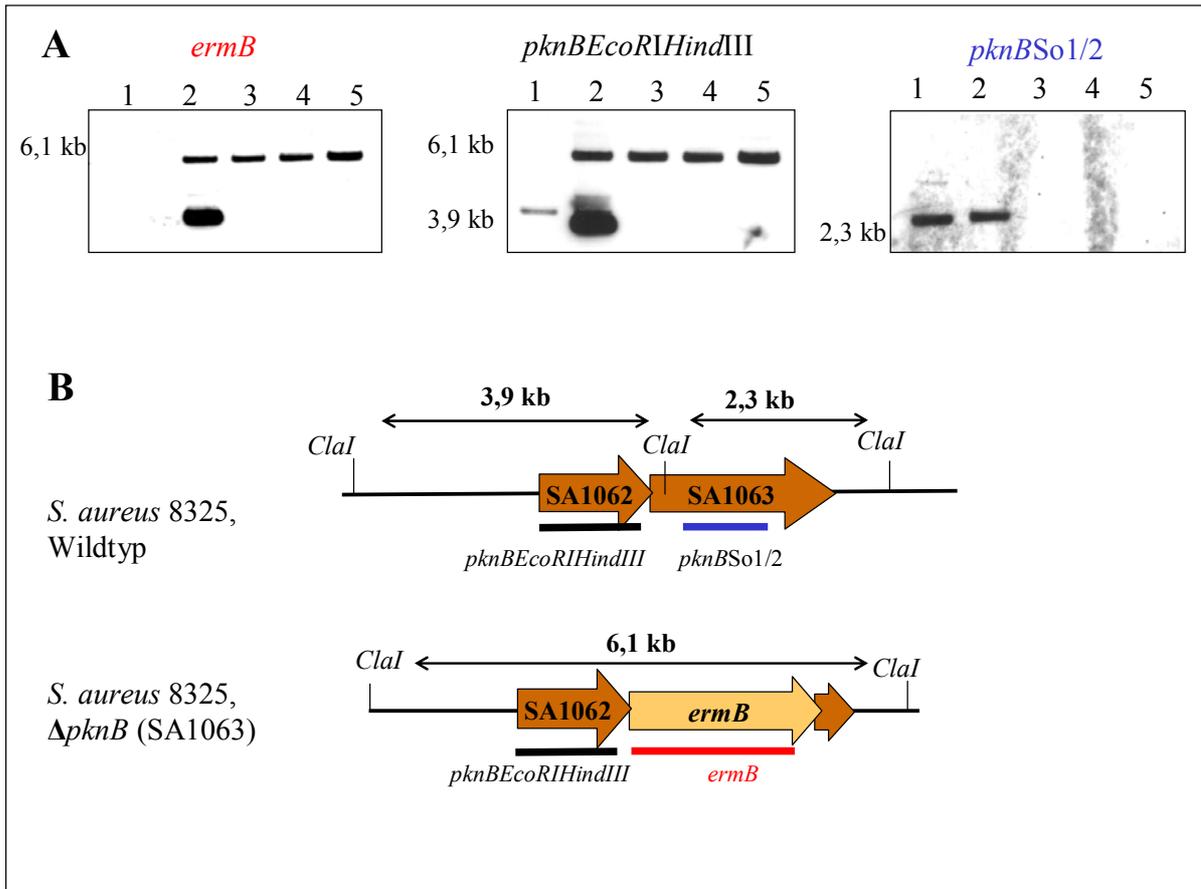


Abb. 19: (A) Southern-Hybridisierungen zur Überprüfung der *pknB*-Deletionsmutante. Spur 1: Chromosomale DNA vom Wildtyp; Spur 2: Chromosomale DNA vom Wildtyp mit Plasmid pKS $\Delta$ *pknB*; Spur 3-5: Chromosomale DNA von  $\Delta$ *pknB*-Mutanten. (B) Schematische Darstellung der mutierten chromosomalen Region. Die chromosomale DNA der Mutanten und des Wildtyp-Stammes wurde mit dem Enzym *Cla*I gespalten. Die Bereiche, mit denen die verwendeten Sonden in (A) hybridisieren, sind durch einen Balken gekennzeichnet.

### 5.1.2.2 Chromosomale Lokalisation des *pknB* (SA1063)-Gens

Der ORF der putativen Ser/Thr-Kinase SA1063 liegt downstream des ORFs SA1062, der für eine putative Ser/Thr-Phosphatase codiert. Die beiden aneinandergrenzenden ORFs überlappen mit 4 Nukleotiden. Es wurde im Folgenden untersucht, ob die beiden ORFs in einem Operon transkribiert werden, außerdem wurde die Abwesenheit von SA1063 (*pknB*) in der *pknB*-Deletionsmutante bestätigt. Dazu wurde die Gesamt-RNA bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 aus dem Wildtyp und der *pknB*-Deletionsmutante isoliert. 2  $\mu$ g der RNA wurden mit random Hexamer-Primer in cDNA umgeschrieben und mit den in Abb. 20 angegebenen spezifischen Primern analysiert. Die Primer zum Nachweis des *dnaE*-Transkripts (*dnaERT1* und *dnaERT2*) dienen zur Kontrolle, dass etwa die gleiche Menge cDNA in den Proben vorhanden war.

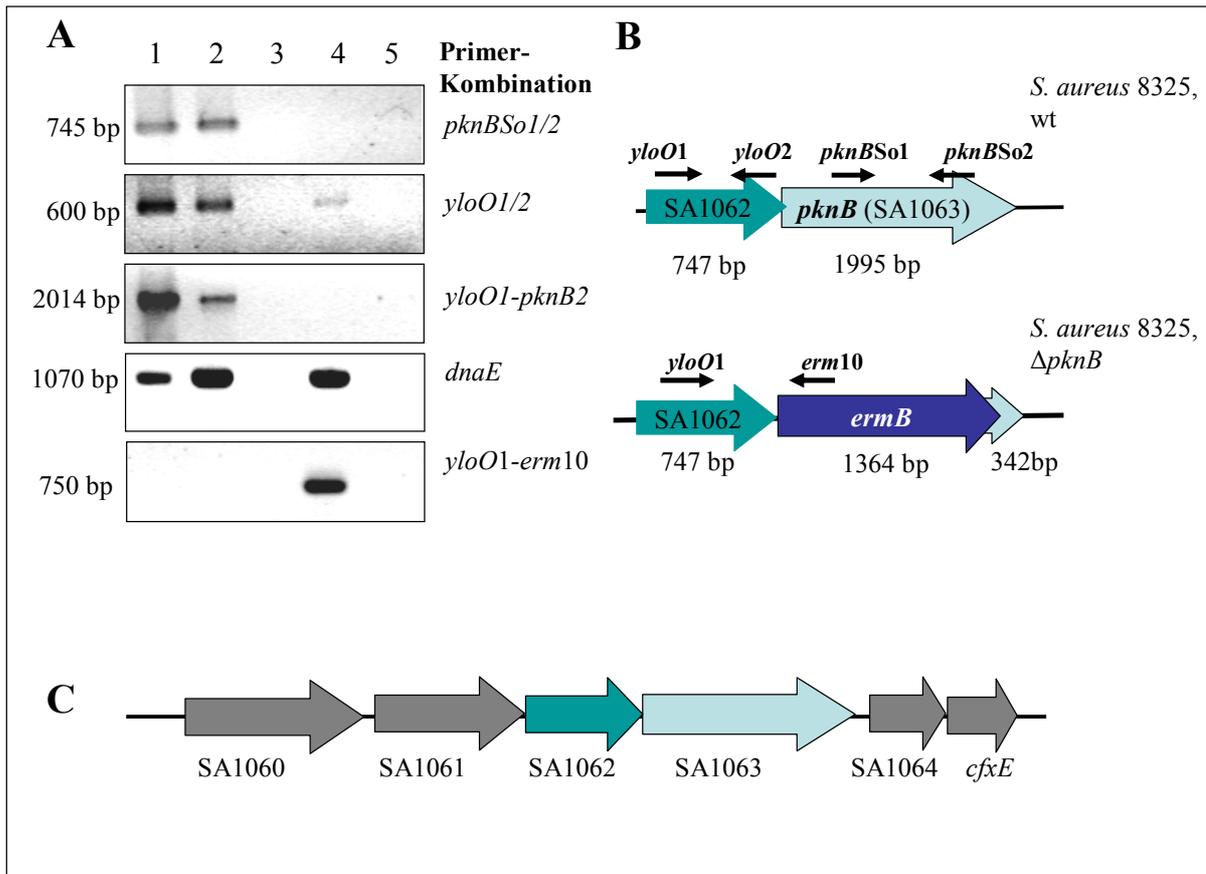


Abb. 20: (A) RT-PCR Analyse der  $\Delta pknB$  Deletionsmutante. Der ORF SA1063 (*pknB*) und ORF SA1062 (*yloO*) bilden eine Transkriptionseinheit. Spur 1: Genomische DNA aus Wildtyp *S. aureus* 8325; Spur 2: cDNA aus Wildtyp *S. aureus* 8325; Spur 3: Kontroll-PCR mit RNA aus Wt; Spur 4: cDNA aus  $\Delta pknB$ -Mutante; Spur 5: Kontroll-PCR mit RNA aus  $\Delta pknB$  (B) Schematische Darstellung des SA1062-*pknB* Operons. Die Bindungsstellen der in (A) verwendeten Primer sind angegeben. (C) Schematische Darstellung der chromosomalen Umgebung des SA1062-*pknB* Operons. Gene in dieser Region wurden noch nicht charakterisiert. Die Bezeichnung der ORFs sind auf den Stamm *S. aureus* N315 bezogen. SA1060: Hypothetisches Protein, ähnlich zu RNA-Bindungsprotein SUN; SA1061: Konserviertes hypothetisches Protein; SA1062: Hypothetisches Protein, ähnlich zu Ser/Thr-Phosphatasen; SA1063: Hypothetisches Protein, ähnlich zu Ser/Thr-Kinasen; SA1064: Konserviertes hypothetisches Protein; *cfxE*: Ribulose-5-Phosphat 3-Epimerase.

Aus den RT-PCR Analysen geht hervor, dass *pknB* (SA1063) in einem Operon mit einer putativen Ser/Thr-Phosphatase (*yloO*, SA1062) transkribiert wird. Die codierende Sequenz der putativen Phosphatase überlappt im C-terminalen Ende mit der angrenzenden Kinase mit 4 Nukleotiden. Bei der Konstruktion der Deletionsmutante wurden 9 Nukleotide vom C-Terminus dieser angrenzenden Phosphatase deletiert. Es ist aber anzunehmen, dass die Phosphatase-Aktivität dadurch nicht vollständig verloren geht. In der *pknB*-Deletionsmutante ist das Transkript der Phosphatase (SA1062) nachweisbar, es existiert ein gemeinsames Transkript von SA1062 und der *ermB* Kasette (*yloO1-erm10*). PknB ist für *S. aureus* nicht essentiell. In der Deletionsmutante ist kein *pknB*-spezifisches Transkript nachweisbar (Abb. 20).

### 5.1.2.3 Charakterisierung der *pknB*-Deletionsmutante

Wachstumsexperimente in LB-Medium bei 37 °C, 30 °C oder 42 °C zeigten keine Unterschiede im Wachstum zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta pknB$ -Mutante. Hinweise auf eine mögliche Funktion von *pknB* kommen von Untersuchungen von De Lencastre et al. (1999). In der genannten Arbeit wurde eine Transposonmutagenese (Tn551) in *S. aureus* COL durchgeführt, mit dem Ziel Insertionsmutanten aufzufinden, die eine verringerte Resistenz gegenüber Methicillin aufweisen. (Die Resistenz gegenüber Methicillin in MRSA-Stämmen ist im Allgemeinen auf das *mecA*-Gen zurückzuführen, das das Penicillin-Bindungsprotein PBP2A codiert. Das Protein PBP2A ist unempfindlich gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika. Allerdings spielen neben der *mecA*-Determinante weitere Gene zur Ausbildung einer hohen Methicillin-Resistenz eine Rolle. Zahlreiche Transposon-Insertionsmutanten wurden isoliert, die eine verringerte Methicillin-Resistenz aufweisen, ohne dass *mecA* von der Mutation betroffen ist. Diese Mutanten werden *fem*-Mutanten genannt (factor essential for methicillin resistance) und betreffen meistens Gene, die bei der Zellwandsynthese beteiligt sind, oder bei der allgemeinen Stressantwort eine Rolle spielen. In der Arbeit von De Lencastre et al. (1999) wurden zwei Transposon-Insertionsmutanten in *pknB* beschrieben, die die Methicillin-Resistenz des wildtypischen *S. aureus* Stammes COL von einer MHK 1600  $\mu\text{g/ml}$  auf eine MHK von 12-25  $\mu\text{g/ml}$  reduzierte. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurde die *pknB*-Mutation in den Methicillin-resistenten *S. aureus* Stamm COL mittels des Phagen  $\Phi 85$  transduziert. Die Übertragung der Mutation wurde durch Southern Hybridisierung bestätigt. Anschließend wurde die MHK verschiedener Antibiotika in den wildtypischen Stämmen *S. aureus* COL und *S. aureus* 8325 und der entsprechenden isogenen *pknB*-Deletionsmutante bestimmt (Tab. 15).

Tab. 15: MHK der wildtypischen *S. aureus* Stämme 8325, COL und der entsprechenden isogenen *pknB* (SA1063) - Deletionsmutanten; (\*n.b.= nicht bestimmt).

Antibiotikum	MHK (µg/ml)			
	<i>S. aureus</i> COL, Wt	<i>S. aureus</i> COL, $\Delta pknB$	<i>S. aureus</i> 8325, Wt	<i>S. aureus</i> 8325, $\Delta pknB$
Methicillin	256	16	0,25	0,125
Cefepim	n.b.*	n.b.*	0,5	0,125
Vancomycin	2	2	1	1
Teicoplanin	1	0,5	0,5	0,5
Ciprofloxacin	n.b.*	n.b.*	0,125	0,125
Bacitracin	n.b.*	n.b.*	64	64

Die  $\Delta pknB$ -Mutante zeigt eine deutlich verringerte Resistenz gegenüber den  $\beta$ -Lactamantibiotika Methicillin und Cefepim. Möglicherweise spielt *pknB* bei der Zellwandsynthese eine Rolle. Anhand von lichtmikroskopischen Beobachtungen konnte allerdings keine veränderte Zellmorphologie der *pknB*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Eine auf die Aminosäuresequenz gestützte Analyse (NCBI, conserved Domain Search) des PknB-homologen (SA1063) Proteins von *S. aureus* 8325, ließ verschiedene Domänen im PknB-Protein erkennen. Das Protein weist im C-Terminus 3 putative PASTA-Domänen (Penicillin-binding protein and Serine/Threonine-Kinase associated domain, Yeats et al., 2002) auf. Außerdem wurde eine putative Transmembran-Domäne, bestehend aus 19 Aminosäuren, gefunden (Abb. 21). PknB von *S. aureus* könnte ein Transmembran-Protein darstellen, dessen C-Terminus mit den PASTA-Domänen einen extrazellulären Sensor bildet. Dieser Sensor könnte das unbekannte Signal durch die Membran weiterleiten und den N-Terminus, die Ser/Thr-Kinase aktivieren.

Um Hinweise darauf zu bekommen welche Signale von PknB in das Zellinnere des Bakteriums weitergeleitet werden, wurde das Transkriptom der *pknB*-Deletionsmutante mit dem Transkriptom des Wildtyps verglichen. Aus dem Wildtyp *S. aureus* 8325 und der *pknB*-Mutante wurde bei einer OD<sub>600</sub> 1,0 RNA isoliert. Die Durchführung der Microarray-Experimente wurde unter 4.18.8 beschrieben. Die Microarrays wurden mit GenePix Pro 4.0 (Molecular Dynamics) und in Excel (Microsoft) ausgewertet. Die GenePix Pro Software ermittelt die Ratio der Fluoreszenzsignale der beiden auf dem Array hybridisierten cDNA-Populationen (wt/ $\Delta pknB$ ). Nur Gene die eine Ratio über 2,0 oder unter 0,5 aufwiesen wurden in die Auswertung aufgenommen (Tab. 16, Tab. 17). Außerdem wurden nur Spots,

deren Signalstärke doppelt so hoch war wie die des Hintergrunds zur Auswertung zugelassen. Drei getrennte Microarray-Versuche wurden ausgewertet.

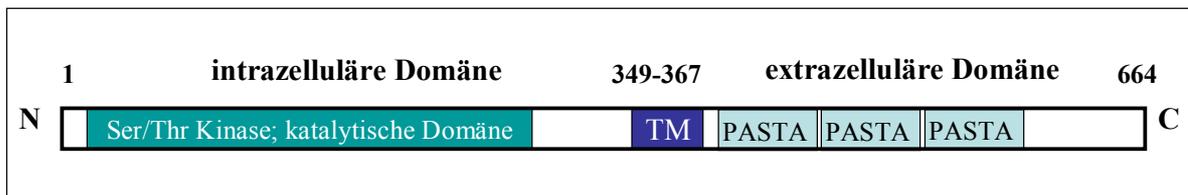


Abb. 21: Schematische Darstellung des PknB (SA1063)-Proteins aus *S. aureus* 8325. PASTA: Penicillin-binding protein and Serine/Threonine kinase-assoziierte Domäne; TM: Transmembran-Domäne.

Tab. 16: Mittels Microarray-Experimente ermittelten Gene, die in der *S. aureus* 8325  $\Delta$ *pknB*-Mutante stärker exprimiert werden als im isogenen Wildtyp.

ID	Gen-Name	Funktion	Ratio Wt/ $\Delta$ <i>pknB</i>
SA1659	<i>prsA</i>	Peptidyl-Prolyl-Isomerase	0,31 ± 0,02
SA1691	<i>sgtB</i>	Hypothetisches Protein, Ähnlichkeit mit monofunktionaler Glykosyltransferase	0,38 ± 0,16
SA1700	<i>vraR</i>	Zwei-Komponenten Response Regulator	0,34 ± 0,16
SA1701	<i>vraS</i>	Zwei-Komponenten Histidin Kinase	0,38 ± 0,18
SA1702		Putatives Membranprotein	0,38 ± 0,015
SA1703		Hypothetisches Protein	0,32 ± 0,18
SA1021	<i>mraZ</i>	Hypothetisches Protein, konserviert in Bakterien	0,45 ± 0,21
SA1022	<i>mraW</i>	Putative S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase	0,56 ± 0,06
SA0172		Hypothetisches Protein, Ähnlichkeit mit Membranprotein LmrP	0,31 ± 0,09
SA0173		Hypothetisches Protein, Ähnlichkeit mit Surfactin Synthetase	0,51 ± 0,09
SA0174		Hypothetisches, konserviertes Protein	0,51 ± 0,15
SA0536		Hypothetisches Protein	0,16 ± 0,07
SA1018		Hypothetisches Protein	0,51 ± 0,08
SA1280		Hypothetisches, konserviertes Protein	0,57 ± 0,12
SA1476		Hypothetisches Protein	0,16 ± 0,08
SA1617		Hypothetisches Protein	0,46 ± 0,13
SA1741		Putatives Membranprotein	0,52 ± 0,08
SA1752		Abgeschnittenes $\beta$ -Hämolyisin	0,07 ± 0,03
SA1811		Abgeschnittenes $\beta$ -Hämolyisin	0,05 ± 0,06

Tab. 17: Mittels Microarray-Experimente ermittelten Gene, die in der *S. aureus* 8325  $\Delta pknB$ -Mutante weniger stark exprimiert werden als im isogenen Wildtyp.

ID	Gen-Name	Funktion	Ratio Wt/ $\Delta pknB$
SA1063	<i>pknB</i>	Serine/Threonine Protein Kinase	15 ± 10,5
SA0905	<i>atl</i>	N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase/Mannosyl-Glycoprotein endo- $\beta$ -N- acetylglucosaminidase	3,03 ± 1,71
SA0919		Hypothetisches Protein	7,2 ± 5,3
SA0920	<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamide Synthase I	28 ± 26,6
SA0921	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide Synthetase	10,2 ± 7,1
SA0922	<i>purF</i>	Amidophosphoribosyltransferase	8,56 ± 6,08
SA0923	<i>purM</i>	Phosphoribosylformylglycinamide Cyclo- ligase	10,83 ± 7,14
SA0924	<i>purN</i>	Phosphoribosylglycinamide Formyltransferase	5,31 ± 2,59
SA0925	<i>purH</i>	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP Cyclohydrolase	7,11 ± 2,59
SA0926	<i>purD</i>	Phosphoribosylamine-Glycine Ligase	8,44 ± 4,89
SA2206	<i>Sbi</i>	IgG-bindendes Protein	4,34 ± 3,7
SA0231		Hypothetisches Protein, Ähnlichkeit mit Flavohämoprotein	3,41 ± 0,92
SA0746		Nuklease	2,02 ± 0,35
SA2268		Hypothetisches Protein	3,78 ± 1,2

Die mit *pknB* in einem Operon transkribierte Ser/Thr Phosphatase *yloO* zeigte keine veränderte Expression in der *pknB*-Deletionsmutante (Ratio *yloO*: 1,01 ± 0,11). Einige der in der  $\Delta pknB$ -Mutante verändert exprimierten Gene, sind Gene, die bei der Zellwandsynthese eine Rolle spielen könnten (*prsA*, *sgtB*, *vraR*, *vraS*, *mraW*, *mraZ*, *atl*). Eine weitere Gruppe der regulierten Gene, spielt eine Rolle bei der Purin-Biosynthese (*purQ*, *purL*, *purF*, *purM*, *purN*, *purH*, *purD*).

Interessant war auch die stark verminderte Expression von *sbi*, einem IgG-bindenden Protein in der  $\Delta pknB$ -Mutante (Zhang et al., 2000b). In *Streptococcus agalactiae* wurde beobachtet, dass Humanserum die Expression der Ser/Thr-Kinase Stk1 induziert (Gleich et al., 2003). Stk1 aus *S. agalactiae* ist zu 31 % identisch zu der Ser/Thr-Kinase PknB

(SA1063) von *S. aureus*. Daher sollte im Weiteren untersucht werden, ob Humanserum die Expression von PknB in *S. aureus* induzieren kann. Außerdem wurde der Effekt von Methicillin auf die Expression von *pknB* untersucht. Eine Bakterienkultur wurde bei einer  $OD_{600}$  von 0,7 mit 5 % Humanserum oder mit der 4-fachen MHK von Methicillin (Endkonzentration: 1  $\mu\text{g/ml}$ ) induziert. Die Gesamt-RNA aus der Bakterienkultur wurde 5 min und 20 min nach der Induktion isoliert. 2  $\mu\text{g}$  dieser RNA wurden in cDNA umgeschrieben und mit RT-PCR analysiert. Die verwendeten Primer waren *pknBSo1* und *pknBSo2*. Zur Kontrolle wurde die *16SrRNA* mit den Primern *16rRNAup* und *16rRNAdown* amplifiziert. Dieser Versuch wurde einmal im Stamm *S. aureus* 8325 und einmal im Stamm *S. aureus* MA12 durchgeführt. Es konnte keine Induktion der Expression von *pknB*, weder durch Humanserum, noch durch Methicillin festgestellt werden (Abb. 22).

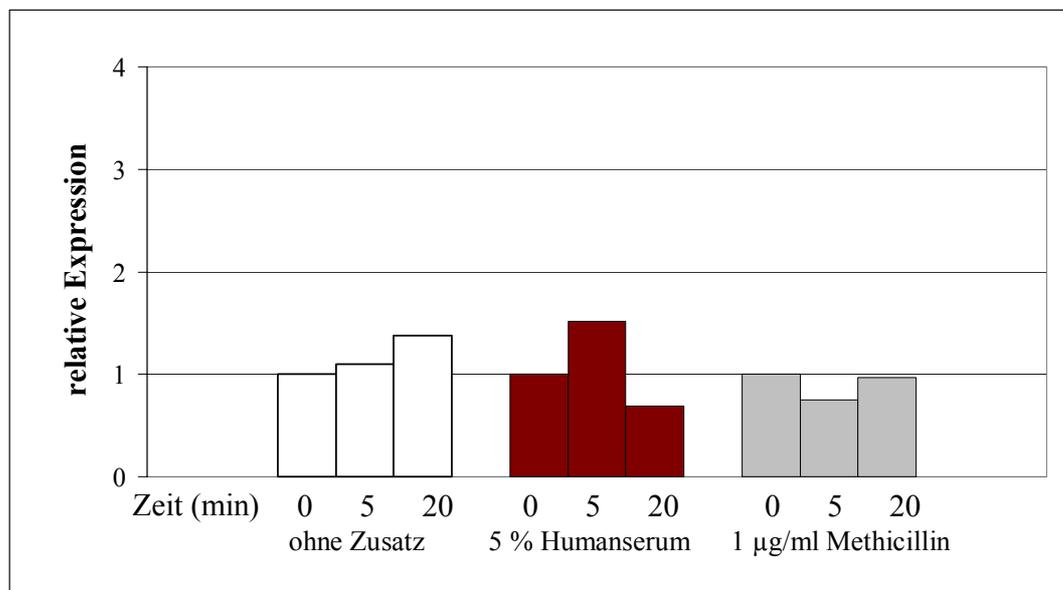


Abb. 22: RT-PCR zur Bestimmung der relativen Expression von *pknB* nach Behandlung mit 5 % Humanserum oder 1  $\mu\text{g/ml}$  Methicillin, wie angegeben. Eine Bakterienkultur des Stammes *S. aureus* 8325 wurde bei einer  $OD_{600}$  von 0,7 mit Serum oder Methicillin behandelt. RNA wurde unmittelbar vor Zugabe des Stressors, sowie 5 min und 20 min nach Zugabe isoliert. 2  $\mu\text{g}$  RNA wurden in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR quantifiziert. Die Expression zum Nullzeitpunkt wurde auf Eins gesetzt.

Die  $\Delta pknB$ -Mutante wurde außerdem hinsichtlich ihrer Hämolyse-Aktivität untersucht. Dazu wurde der Wildtypstamm *S. aureus* 8325 und die isogene  $\Delta pknB$ -Mutante auf LB-Platten mit 5 % Kaninchenblut und auf Platten mit 5 % Schafsblut ausgestrichen. Die *pknB*-Deletionsmutante zeigte deutlich größere Hämolysehöfe als der Wildtyp (Abb. 23).

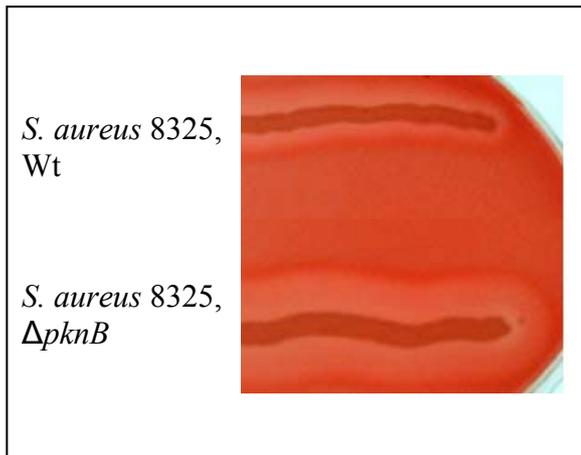


Abb. 23: Ausstrich des Stammes *S. aureus* 8325 und der isogenen Deletionsmutante  $\Delta pknB$  auf Blutagar (LB-Platten mit 5 % Kaninchenblut). Die Mutante zeigt eine stärkere Hämolyse als der Wildtyp.

### 5.1.3 Untersuchung zu *polA*

#### 5.1.3.1 Deletion von *polA*

Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob die DNA-Polymerase I für *S. aureus* essentiell ist. Das PolA-Polypeptid von *S. aureus* weist ebenfalls drei aktive Zentren, mit den gleichen enzymatischen Funktionen wie für *E. coli* beschrieben, auf. Am N-Terminus befindet sich die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, gefolgt von der 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und der C-terminalen DNA-Polymerase-Aktivität (NCBI, CD-Search; KEGG, Motiv-Suche). Zur Deletion von *polA* in *S. aureus* wurde die codierende Sequenz der DNA-Polymerase I (2629 bp) durch die Erythromycin-Resistenzkassette *ermB* ersetzt. Die Klonierungsstrategie wurde bereits für *nfrA* schematisch dargestellt (Abb. 2) und ist unter 4.21.1 beschrieben. Das upstream-Fragment wurde mit den Primern *polAPstI* und *polAHindIII* amplifiziert und ergab 1137 bp, das downstream-Fragment wurde mit den Primern *polAXbaI* und *polABamHI* synthetisiert und war 1152 bp lang. Die Erythromycin-Kassette wurde mit den Primern *ermBPstIpolA* und *ermBBamHIpolA* amplifiziert und in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert. Der Vektor wird im Folgenden pGEMTermB2 genannt. Das Anhängen dieser Schnittstellen war nötig, damit die Transkription der Erythromycin-Resistenzkassette in die gleiche Richtung abläuft, wie der zu ersetzende ORF *polA*. Dadurch soll die Entstehung gegenläufiger Transkripte vermieden werden. Nach erfolgter Rekombination bleiben am 5'-Ende 115 bp von *polA* erhalten, am 3'-Ende bleiben 227 bp des ORFs zurück. Insgesamt war der *polA* ORF 2629 bp lang und codiert für 876 Aminosäuren. Die Deletion des *polA*-Gens wurde im Southern Blot (Abb. 24) und durch RT-PCR (Abb. 25) überprüft. Zum Nachweis der *polA*-Deletion wurden die Primer *polASo1* und *polASo2* zur Synthese der Sonde verwendet, die im deletierten Bereich des ORFs bindet. Diese Sonde war 522 bp lang. Zum Nachweis der Erythromycin-Kassette

wurden zur Herstellung der Sonde die Primer *erm3* und *erm4* verwendet. Die Sonde war 1364 bp lang.

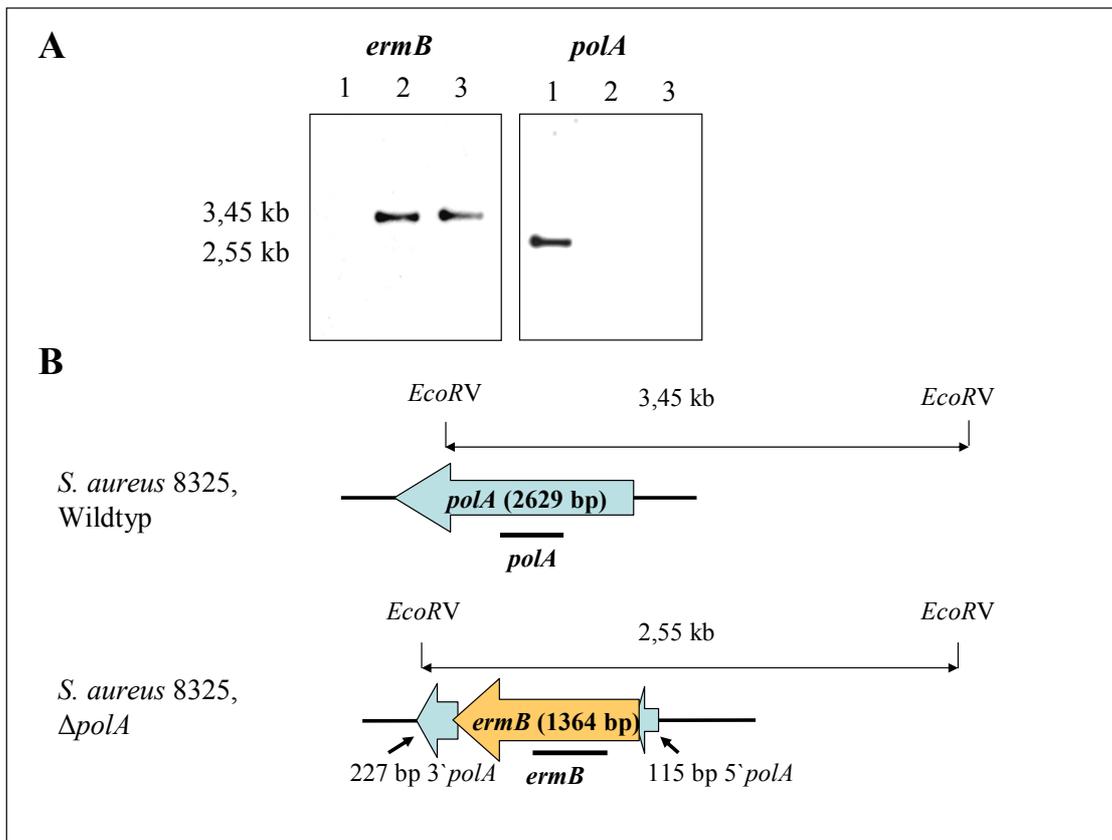


Abb. 24: (A) Southern-Hybridisierungen der *polA*-Nullmutanten im Vergleich zum Wildtyp. Spur 1: Wildtypische chromosomale DNA aus *S. aureus* 8325; Spur 2 und 3: Chromosomale DNA aus *S. aureus* 8325  $\Delta$ *polA*. (B) Schematische Darstellung des mutierten Bereichs auf dem Chromosom. Die chromosomale DNA der Mutanten und des Wildtyp-Stammes wurde mit dem Enzym *EcoRV* gespalten. Die Bereiche mit denen die verwendeten Sonden in (A) hybridisieren sind durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet.

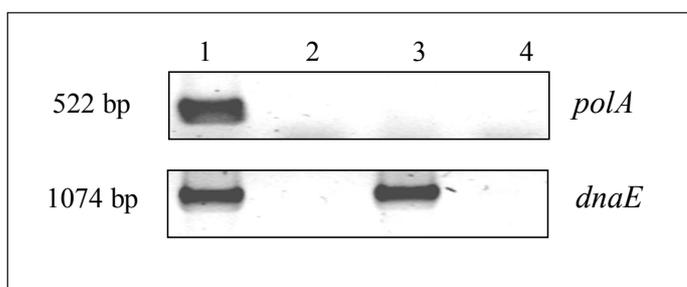


Abb. 25: RT-PCR-Analyse der *polA*-Nullmutante. Je 2  $\mu$ g RNA aus Wildtyp und Mutante wurden mit random Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Die Nachweis-PCR erfolgte mit den Primern *polASo1* und *polASo2* sowie *dnaERT1* und *dnaERT2*. Spur 1: PCR-Produkt von cDNA aus Wildtyp, Spur 2: Kontroll-PCR von RNA aus Wildtyp, Spur 3: PCR von cDNA aus  $\Delta$ *polA*, Spur 4: Kontroll-PCR mit RNA aus  $\Delta$ *polA*.

### 5.1.3.2 Charakterisierung der $\Delta polA$ -Mutante

Die DNA-Polymerase I ist für *S. aureus* nicht essentiell. Wachstumsexperimente in LB-Medium unter Schütteln bei 37° und 42 °C zeigten keine veränderte Wachstumsrate der  $\Delta polA$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem wurde die Sensitivität der *polA*-Deletionsmutante gegenüber UV-Strahlung untersucht. Eine Übernachtskultur von *S. aureus* 8325  $\Delta polA$ -Mutante und *S. aureus* 8325 Wildtyp wurden in frisches LB-Medium überimpft, dabei wurde eine optische Dicht ( $OD_{600}$ ) von 0,015 eingestellt. Die Kulturen ließ man bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,21- 0,26 wachsen, anschließend wurde eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt. 100  $\mu$ l dieser Bakteriensuspension wurden auf LB-Platten ausplattiert und mit 4 mJoule, 15 mJoule oder 30 mJoule UV-Licht bestrahlt. Gleichzeitig wurden die Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  der unbestrahlten Kultur ausplattiert. Dieser Versuch ließ keine erhöhte Empfindlichkeit der *polA*-Deletionsmutante gegenüber UV-Licht im Vergleich zum Wildtyp erkennen (Tab. 18).

Tab. 18: Überleben von *S. aureus* 8325 Wildtyp und der isogenen  $\Delta polA$ -Mutante, nach Bestrahlung mit UV-Licht.

	Zellzahl/ml unbestrahlt	Zellzahl/ml nach UV-Bestrahlung (mJoule)		
		4 mJoule	15 mJoule	30 mJoule
Wildtyp,	$1,6 \times 10^8$	2100	40	30
<b>Überleben in %</b>	<b>100 %</b>	<b><math>1,3 \times 10^{-3}</math> %</b>	<b><math>2,5 \times 10^{-5}</math> %</b>	<b><math>1,8 \times 10^{-5}</math> %</b>
$\Delta polA$ ,	$2,15 \times 10^8$	1900	50	30
<b>Überleben in %</b>	<b>100 %</b>	<b><math>8,8 \times 10^{-4}</math> %</b>	<b><math>2,3 \times 10^{-5}</math> %</b>	<b><math>1,4 \times 10^{-5}</math> %</b>

### 5.1.4 Untersuchungen zur Topoisomerase TopoIII

#### 5.1.4.1 Deletion von *topB*

Zur Deletion der Topoisomerase *topB* wurde die codierende Sequenz von *topB* (2136 bp) durch die Sequenz der Erythromycin-Resistenzkassette *ermB* ausgetauscht. Der Ablauf dieser Arbeiten entspricht denen, die unter 5.1.1.1 (Abb. 2) für *nfrA* schematisch dargestellt wurden. Das upstream-Fragment wurde mit den Primern *topBBamHI* und *topBHindIII* amplifiziert und war 1163 bp groß. Das downstream-Fragment wurde mit den Primern *topBPstI* und *topBEcoRI* amplifiziert und ergab ein 1126 bp großes Fragment. Die *ermB*-Kassette wurde aus dem Vektor pEC1 über die Schnittstellen *BamHI* und *PstI*

herausgespalten. Nach erfolgter homologer Rekombination blieben noch 55 bp am 5'-Ende der Topoisomerase erhalten. Am 3'-Ende wurden zusätzlich 98 bp entfernt. In diesem Bereich befindet sich kein ORF. Die Deletionsmutanten wurden im Southern Blot und durch RT-PCR überprüft (Abb. 26 und Abb. 27). Die zur Southern Blot-Analyse benötigten Sonden wurden in einer PCR hergestellt. Zur Herstellung der *topB*-spezifischen Sonde wurden die Primer *topBSo1* und *topBSo2* verwendet, die *ermB*-spezifische Sonde wurde mit den Primern *erm3* und *erm4* synthetisiert. Eine weitere Sonde, die im upstream-Bereich von *topB* hybridisiert, wurde mit den Primern *topBBamHI* und *topBHindIII* synthetisiert.

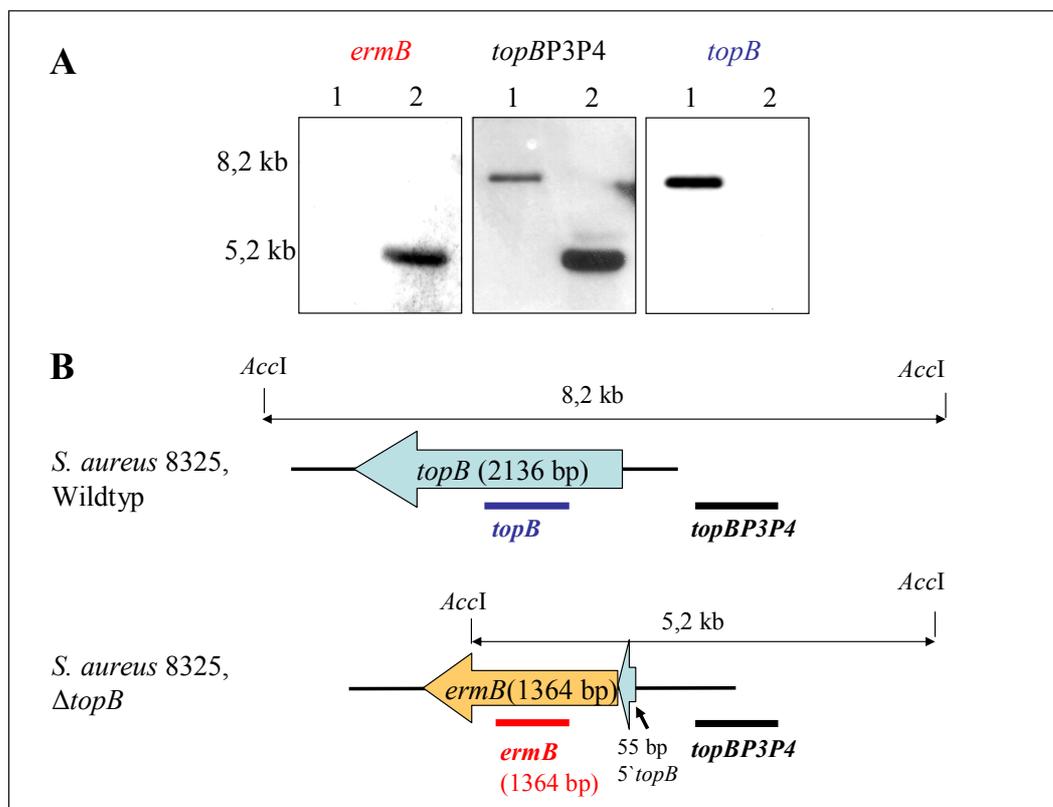


Abb. 26: (A) Southern-Hybridisierungen der *topB*-Nullmutanten im Vergleich zum Wildtyp. Spur 1: Wildtypische chromosomale DNA aus *S. aureus* 8325; Spur 2: Chromosomale DNA aus *S. aureus* 8325  $\Delta topB$ . (B) Schematische Darstellung des mutierten Bereichs auf dem Chromosom. Die chromosomale DNA der Mutante und des Wildtyp-Stammes wurde mit dem Enzym *AccI* gespalten. Die Bereiche, mit denen die verwendeten Sonden in (A) hybridisieren, sind durch einen Balken gekennzeichnet.

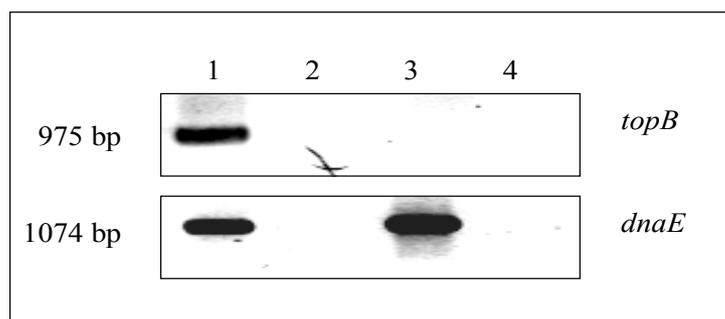


Abb. 27: RT-PCR-Analyse der *topB*-Nullmutante. Je 2 µg RNA aus Wildtyp und Mutante wurden mit random Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Die Nachweis-PCR erfolgte mit den Primern *topBS*o1 und *topBS*o2 sowie *dnaERT*1 und *dnaERT*2. Spur 1: PCR-Produkt von cDNA aus Wt, Spur 2: Kontroll-PCR von RNA aus Wt, Spur 3: PCR von cDNA aus  $\Delta topB$ , Spur 4: Kontroll-PCR mit RNA aus  $\Delta topB$ .

#### 5.1.4.2 Charakterisierung der *topB*-Deletionsmutante

Die *topB*-Deletionsmutante zeigte kein verändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp in LB-Medium bei 30 °C, 37 °C und 42 °C. Außerdem sollte die Mutationsrate von Wildtyp und  $\Delta topB$  bestimmt werden. Dazu wurde eine Übernachtskultur von Wildtyp und  $\Delta topB$  in frisches Medium überführt und bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,0 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde verdünnt und die Verdünnungsstufen  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  wurden auf Blutplatten (LB-Agar + 5 % Kaninchenblut) ausplattiert. Die Anzahl der ahämolytischen Klone diente als Maß der Mutationshäufigkeit. Sowohl für Wildtyp als auch für die *topB*-Deletionsmutante war das Auftreten von ahämolytischen Klonen mit derselben Häufigkeit zu beobachten. Die ahämolytischen Varianten traten in zwei unabhängigen Versuchen mit einer Häufigkeit von  $8 \times 10^{-11}$  -  $5 \times 10^{-10}$  auf. Die  $\Delta topB$ -Mutante wurde zusätzlich auf ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen Antibiotika getestet (Tab. 19). Auch die MHK gegenüber den ausgewählten Antibiotika unterschied sich nicht zwischen der  $\Delta topB$ -Mutante und dem Wildtyp.

Tab. 19: Vergleich der MHK von *S. aureus* 8325 Wildtyp und der isogenen  $\Delta topB$ -Mutante.

Antibiotikum	MHK (µg/ml)	
	<i>S. aureus</i> 8325, Wildtyp	<i>S. aureus</i> 8325, $\Delta topB$
Ciprofloxacin	1	1
Novobiocin	4	4
Nalidixinsäure	64	64
Rifampicin	0,0625	0,0625

### 5.1.5 Untersuchungen zu SA0241, SA0245 und SA0453

#### 5.1.5.1 Deletion von SA0241 und SA0245

Beide homologen Gene von *ygbP*, SA0241 (*ygbP1*) und SA0245 (*ygbP2*), sollten deletiert werden, indem die codierende Sequenz durch die Sequenz der *ermB*-Kassette ersetzt wurde. Das Vorgehen ist analog zu der Vorgehensweise wie für *nfrA* beschrieben (siehe 5.1.1.1; Abb. 2). Zur Klonierung des upstream-Fragmentes von SA0241 (*ygbP1*) wurden die Primer *ygbP1HindIII* und *ygbP1BamHI* verwendet. Die PCR ergab ein Fragment von 990 bp. Das downstream-Fragment war 1031 bp lang und wurde mit den Primern *ygbP1PstI* und *ygbP1EcoRI* amplifiziert. Die *ermB* Kassette wurde über die Schnittstellen *BamHI* und *PstI* aus dem Vektor pEC1 gespalten. Nach erfolgter Deletion bleiben 27 bp vom 5'-Bereich des *ygbP1* ORFs und 68 bp vom 3'-Bereich übrig. Die Deletionsmutanten wurden im Southern Blot und durch RT-PCR überprüft (Abb. 28; Abb. 29). Zur Southern Blot-Analyse wurden die Sonden mit den Primern *ygbP1So1* und *ygbP1So2* hergestellt, die im deletierten Bereich des ORFs SA0241 (*ygbP1*) hybridisiert. Zum Nachweis der *ermB*-Kassette wurden die Primer *erm4* und *erm3* verwendet.

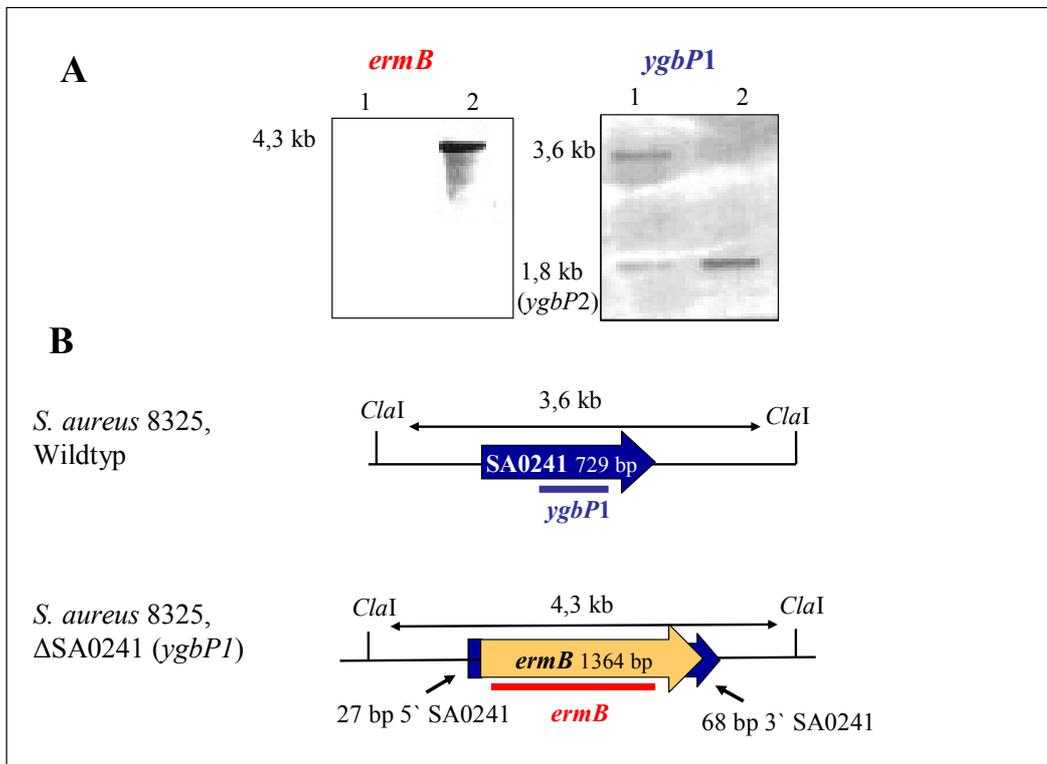


Abb. 28: (A) Southern-Hybridisierungen zur Überprüfung der *ygbP1*-Deletionsmutante. Spur 1: Chromosomale DNA vom Wildtyp; Spur 2: Chromosomale DNA der  $\Delta$ *ygbP1*-Mutante. (B) Schematische Darstellung der mutierten chromosomalen Region. Die chromosomale DNA der Mutanten und des Wildtyp-Stammes wurde mit dem Enzym *ClaI* gespalten. Die Bereiche, mit denen die verwendeten Sonden in (A) hybridisieren, sind durch farbige Balken gekennzeichnet. Das zu *ygbP1* homologe Gen *ygbP2* hybridisiert ebenfalls mit der *ygbP1*-spezifischen Sonde und ergibt eine Bande im Southern Blot von 1,8 kb.

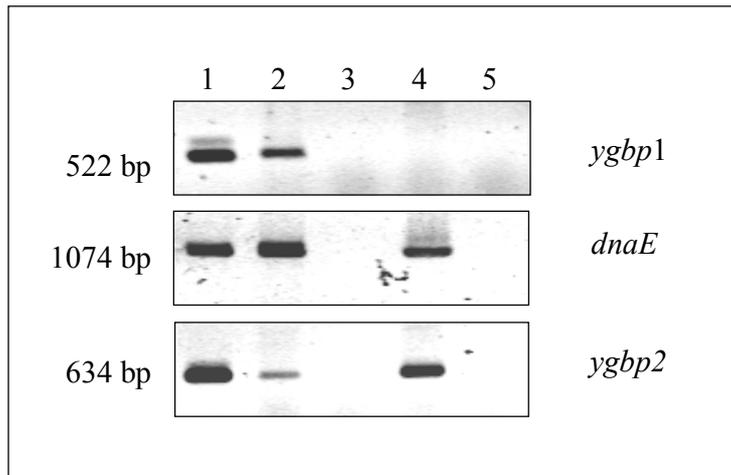


Abb. 29: RT-PCR-Analyse der *ygbP1* (SA0241)-Nullmutante. Je 2 µg RNA aus Wildtyp und Mutante wurden mit random Hexamer-Primern umgeschrieben. Die Nachweis-PCR erfolgte mit den Primern *ygbP*Sp11 und *ygbP*So2 und *dnaE*ERT1 und *dnaE*ERT2, sowie *ygbP*2So1 und *ygbP*2So2. Spur 1: PCR-Produkt von genomischer DNA; Spur 2: PCR-Produkt von cDNA aus Wt, Spur 3: Kontroll-PCR von RNA aus Wt, Spur 4: cDNA aus  $\Delta ygbP1$ , Spur 5: Kontroll-PCR mit RNA aus  $\Delta ygbP1$ .

Zur Konstruktion des Deletionsplasmids von SA0245 (*ygbP2*) wurde das upstream-Fragment mit den Primer *ygbP2Bam*HI und *ygbP2Hind*III amplifiziert. Das Fragment war 770 bp lang. Das downstream-Fragment wurde mit den Primern *ygbP2Pst*I und *ygbP2Eco*RI amplifiziert, die PCR ergab ein Fragment von 763 bp. Die *ermB* Kasette wurde ebenfalls aus dem pEC1 Vektor über die Schnittstellen *Bam*HI/*Pst*I isoliert und in den Deletionsvektor pBT2 $\Delta ygbP2$  kloniert. Nach erfolgter Deletion sollten am 5'-Ende 73 bp des ORFs erhalten bleiben sowie 100 bp am 3'-Ende. Es konnten keine Deletionsmutanten von SA0245 (*ygbP2*) isoliert werden. Das Gen ist vermutlich essentiell für *S. aureus*. Das Gen SA0245 sollte daher in einem konditionalen Expressionssystem untersucht werden (siehe Ergebnisse; Teil 5.2).

### 5.1.5.2 Charakterisierung der *ygbP1* (SA0241)-Deletionsmutante

Erste Wachstumsexperimente bei 30 °C und 37 °C in LB-Medium ließen kein verändertes Wachstum der  $\Delta$ SA0241-Mutante im Vergleich zum Wildtyp erkennen. Außerdem wurde die hämolytische Aktivität der SA0241-Deletionsmutante mit der des Wildtyps auf Kaninchenblutplatten verglichen. Die  $\Delta$ SA0241-Mutante war weniger hämolytisch im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 30).

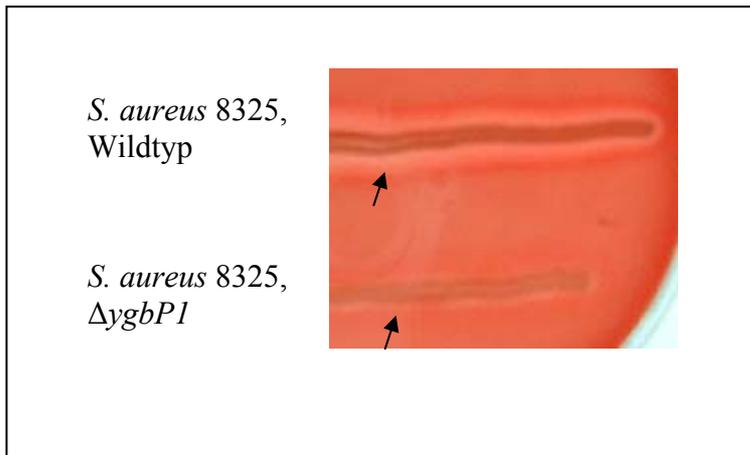


Abb. 30: Ausstrich des Wildtyps *S. aureus* 8325 und der  $\Delta ygbP1$ -Mutante auf Blutagar (LB-Agar mit 5 % Kaninchenblut). Der Wildtyp zeigt einen stärkeren Hämolyse-Hof als die Mutante (Pfeile).

## 5.1.6 Untersuchungen zu SA0453

### 5.1.6.1 Deletion von SA0453

Das Gen SA0453 (*yhb*) wurde ebenfalls durch die Erythromycin-Resistenzkassette *ermB* ersetzt. Die Methode wurde unter 4.21.1 beschrieben und wurde für die Deletion von *nfrA* schematisch dargestellt (Abb. 2). Zur Klonierung des Deletionsvektors pKS $\Delta yhb$  wurde ein Fragment upstream von *yhb* mit den Primern *yhbHindIII* und *yhbPstI* amplifiziert. Das upstream-Fragment war 935 bp lang. Das downstream-Fragment wurde mit den Primern *yhbBamHI* und *yhbXbaI* amplifiziert und war 938 bp lang. Die Erythromycin-Kassette, *ermB* wurde über die Schnittstellen *PstI* und *BamHI* aus dem Vektor pGEMTermB2 isoliert. Nach erfolgtem doppeltem Crossover sind 3 nt zusätzlich zum *yhb*-codierenden ORF am 5'-Ende entfernt worden. Am 3'-Ende blieben noch 14 nt erhalten. Die Deletionsmutanten wurden im Southern Blot und durch RT-PCR untersucht (Abb. 31 und 32). Die Sonden zur Hybridisierung des Southern Blots wurden mit den Primern *yhbSo1* und *yhbSo2* hergestellt und dienen zum Nachweis der Deletion von *yhb*. Die Sonde war 541 bp lang. Die Primer *erm3* und *erm4* wurden verwendet, um die Insertion der Erythromycin-Resistenz-Kassette *ermB* nachzuweisen. Diese Sonde war 1364 bp lang.

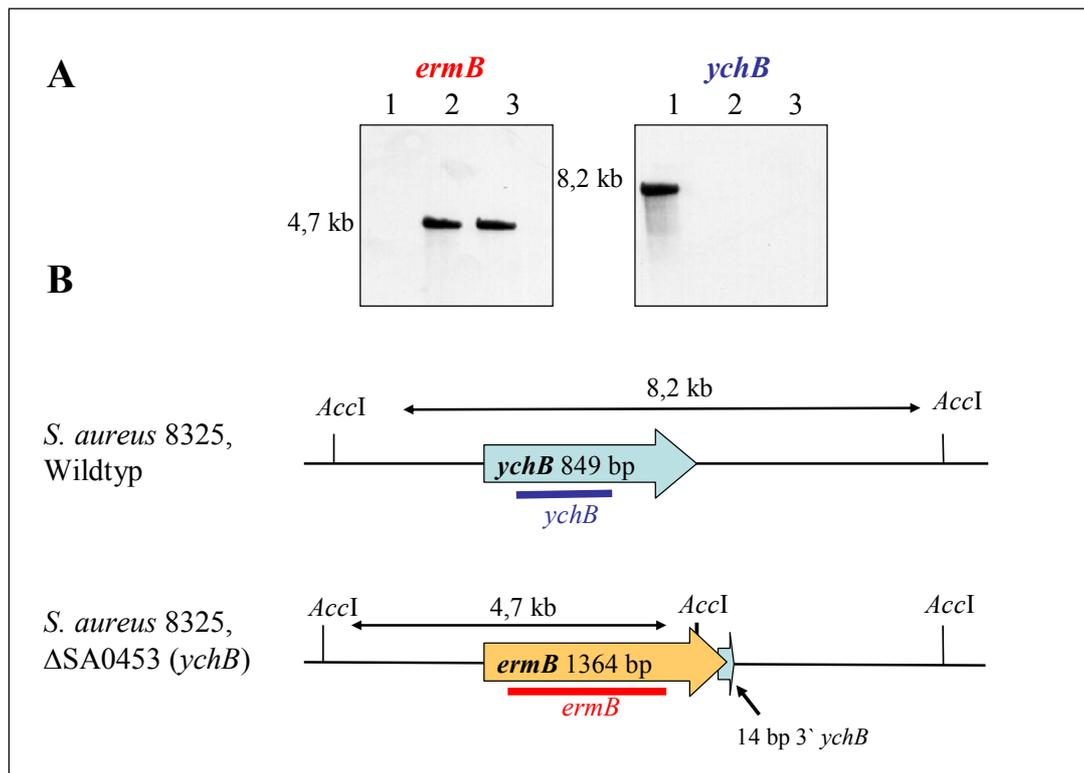


Abb. 31 (A) Southern-Hybridisierungen der SA0543 (*ychB*)-Nullmutanten im Vergleich zum Wildtyp. Spur 1: Wildtypische chromosomale DNA aus *S. aureus* 8325; Spur 2 und 3: Chromosomale DNA aus *S. aureus* 8325  $\Delta$ *ychB*. (B) Schematische Darstellung des mutierten Bereichs auf dem Chromosom. Die chromosomale DNA der Mutanten und des Wildtyp-Stammes wurde mit dem Enzym *AccI* gespalten. Die Bereiche, mit denen die verwendeten Sonden in (A) hybridisieren, sind durch einen Balken gekennzeichnet.

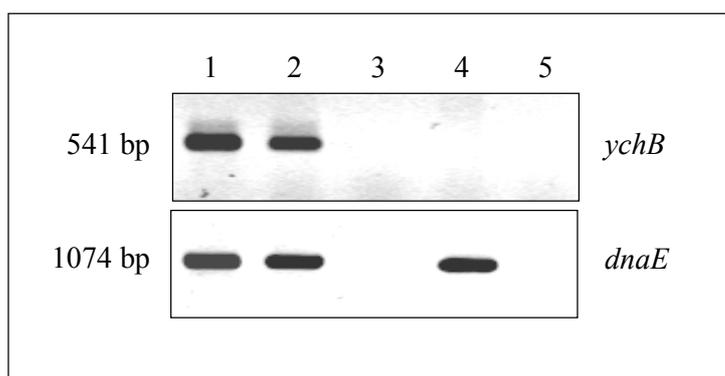


Abb. 32: Je 2  $\mu$ g RNA aus Wildtyp und Mutante wurden mit random Hexamer-Primern umgeschrieben. Die Nachweis-PCR erfolgte mit den Primern *ychBS*01 und *ychBS*02, sowie *dnaE*RT1 und *dnaE*RT2. Spur 1: PCR-Produkt von genomischer DNA; Spur 2: PCR-Produkt von cDNA aus Wildtyp, Spur 3: Kontroll-PCR von RNA aus Wildtyp, Spur 4: cDNA aus  $\Delta$ *ychB*, Spur 5: Kontroll-PCR mit RNA aus  $\Delta$ *ychB*.

### 5.1.6.2 Charakterisierung der *yehB* (SA0453)-Deletionsmutante

Wachstumsexperimente in LB-Medium bei 37 °C zeigten keine Unterschiede zwischen Wildtyp *S. aureus* 8325 und der isogenen  $\Delta yehB$ -Deletionsmutante. Es konnte auch kein Unterschied in der hämolytischen Aktivität zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden. Die Hämolysehöfe um Ausstriche beider Stämme auf Blutagar waren gleich groß (Daten nicht gezeigt).

### 5.1.7 Deletion von SA1857

Das Gen SA1857 (*ydiB*) weist Homologien zu Nukleotid-Bindeproteinen auf. Zunächst wurde versucht, eine *ydiB*-Deletionsmutante in *S. aureus* herzustellen, indem die codierende Sequenz von *ydiB* durch die *ermB*-Kassette ausgetauscht wurde (siehe 4.21.1). Zur Herstellung des Deletionsvektors wurde das upstream Fragment mit den Primern *ydiBBamHI* und *ydiBHindIII* amplifiziert und ergab ein Fragment von 938 bp Länge. Das downstream Fragment wurde mit den Primern *ydiBPstI* und *ydiBKpnI* amplifiziert und war 912 bp lang. Die *ermB*-Kassette wurde über die Schnittstellen *BamHI* und *PstI* aus dem Vektor pEC1 isoliert. Nach erfolgtem doppeltem Crossover wurden 7 bp am 5'-Ende zusätzlich zum ORF deletiert. Am 3'-Ende bleiben 74 bp vom ORF des *ydiB*-Gens erhalten. Die Konstruktion des Vektors und die anschließende Deletion von *ydiB* wurden von Uschi Wallner durchgeführt. Das Gen *ydiB* konnte erfolgreich deletiert werden, die Deletionsmutanten wurden im Southern Blot überprüft (Daten nicht gezeigt). Das Gen *ydiB* ist nicht essentiell in *S. aureus*. Erste Wachstumskurven in LB-Medium bei 37 °C zeigten kein verändertes Wachstum der  $\Delta ydiB$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp.

### 5.1.8 Deletion von SA1444

Das Gen SA1444 (*yrrK*) in *S. aureus* zeigt Homologien zu Holliday Junction Endonukleasen. Zur Konstruktion einer Deletionsmutante von *yrrK* (siehe 4.21.1) wurde das upstream-Fragment mit den Primern *yrrKBamHI* und *yrrKEcoRI* amplifiziert. Das PCR-Produkt war 948 bp groß. Das downstream-Fragment wurde mit den Primern *yrrKPstI* und *yrrKHindIII* amplifiziert und war 925 bp lang. Die *ermB* Kassette wurde über die Schnittstellen *BamHI* und *PstI* aus dem Vektor pEC1 isoliert. Nach erfolgter Rekombination würden 42 bp am 5'-Ende des ORFs erhalten bleiben. Am 3'-Ende sollten 59 bp des *yrrK* ORFs erhalten bleiben. Der Vektor zur Deletion von *yrrK* wurde von U.

Wallner hergestellt. Es konnten keine *yrrK*-Deletionsmutanten isoliert werden. Das Gen *yrrK* steht daher im Verdacht in *S. aureus* essentiell zu sein.

### 5.1.9 Deletion von *nusG*

Die codierende Region von *nusG* sollte durch die *ermB*-Kassette ersetzt werden (siehe 4.21.1). Zur Konstruktion des Deletionsvektors wurde das upstream-Fragment von *nusG* mit den Primern *nusGPstI* und *nusGEcoRI* amplifiziert. Das PCR-Fragment hatte eine Größe von 953 bp. Zur Synthese des downstream-Fragments wurden die Primer *nusGBamHI* und *nusGXbaI* verwendet. Das PCR-Produkt war 383 bp lang. Die *ermB*-Kassette wurde aus dem Vektor pGEMTermB2 über die Schnittstellen *PstI/BamHI* isoliert. Am 5'-Ende von *nusG* bliebe nach erfolgreicher Rekombination 42 bp der codierenden Sequenz von *nusG* erhalten. Am 3'-Ende würden, zusätzlich zum *nusG* ORF, 78 bp deletiert werden. In diesem Bereich downstream von *nusG* befindet sich kein weiterer ORF. Der Deletionsvektor wurde von U. Wallner konstruiert. Es konnten keine Deletionsmutante von *nusG* isoliert werden. Das Gen *nusG* wurde außerdem in einem konditionalen Expressionssystem untersucht (siehe 5.2.1).

### 5.1.10 Deletionsmutanten im Sepsismodell

Die hier beschriebenen „knock out“ Mutanten  $\Delta nfrA$ ,  $\Delta pknB$ ,  $\Delta polA$ ,  $\Delta topB$ ,  $\Delta ygbp1$ ,  $\Delta ychB$  wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Labischinski im Sepsismodell untersucht, um ihre Virulenz mit der des Wildtyps zu vergleichen. Dazu wurden weibliche CFW-1 Mäuse mit der Übernachtskultur von *S. aureus* 8325 Wildtyp und den beschriebenen isogenen Deletionsmutanten infiziert. Die Bakterien wurden dabei in 0,2 ml PBS oder PBS/5 % Mucin aufgenommen und intra peritoneal (i. p.) in die Mäuse injiziert. Die Bakterien wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen von ca.  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  den Tieren verabreicht und die Infektion wurde über 5 Tage verfolgt. Die LD<sub>50</sub> für die verschiedenen Mutanten und den Wildtyp wurde bestimmt. Keine der *S. aureus* 8325-Mutanten unterschied sich in ihrem LD<sub>50</sub>-Wert vom isogenen wildtypischen Stamm. Die LD<sub>50</sub> betrug für den Wildtyp-Stamm und die verschiedenen Mutanten ca.  $1 \times 10^9$  -  $2 \times 10^9$  CFU/Maus und in Gegenwart von Mucin ca.  $2 \times 10^8$  -  $3 \times 10^8$  CFU/Maus.

## 5.1.11 Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 5.1

Tab. 20: Ergebnis der Deletionsanalysen in *S. aureus* 8325 im Vergleich mit den homologen Genen in *B. subtilis* und *E. coli*.

<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i>		(putative) Funktion
Gen	essentiell	Gen	essentiell	Gen	essentiell	
SA1063	nein	<i>prkC</i>	nein	-	-	Serin/Threonin Kinase
<i>topB</i> , SA2051	nein	<i>topB</i>	nein	<i>topB</i>	nein	Topoisomerase Typ I
<i>polA</i> , SA1513	nein	<i>polA</i>	nein	<i>polA</i>	ja (Voll- medium)	DNA- Polymerase I
<i>nusG</i> , SA0494	? (nicht deletiert)	<i>nusG</i>	nein	<i>nusG</i>	ja	Antiterminator bei der Transkription
SA0453	nein	<i>yabH</i>	ja	<i>yhbB</i>	ja	Isopren- Biosynthese
SA0241	nein	<i>yacM</i>	ja	<i>ygbP</i>	ja	Isopren- Biosynthese
SA0245	? (nicht deletiert)	<i>yacM</i>	ja	<i>ygbP</i>	ja	Isopren- Biosynthese
SA1857	nein	<i>ydiB</i>	ja (geringes Wachstum)	<i>yjee</i>	ja	Nukleotid- Bindeprotein
SA1444	? (nicht deletiert)	<i>yrrK</i>	ja	<i>yqgF</i>	ja	Endonuklease
SA0367	nein	<i>nfrA</i> ( <i>ywcG</i> )	ja (Moch et al., 1998); nein (Kobayashi et al., 2003)	<i>nfsA</i>	(nein)	Oxidoreduktase

- Das Protein NfrA wird durch oxidativen Stress, unabhängig von SigmaB induziert. Bei dem Protein handelt es sich um eine FMN-abhängige NADPH-Oxidase. Das Enzym weist außerdem Nitroreduktase-Aktivität und Disulfid-Reduktase-Aktivität auf. Das Gen *nfrA* wird während des gesamten Wachstumszyklus exprimiert, eine verstärkte Expression findet in der späten exponentiellen Phase statt. Die Deletionsmutante  $\Delta nfrA$  zeigt eine leicht erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Ethanol und eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Nitrofurantoin.
- Die Ser/Thr-Kinase SA1063 (*pknB*) spielt vermutlich eine Rolle bei der Zellwandsynthese. Dafür spricht die erhöhte Sensitivität der  $\Delta pknB$ -Mutante gegenüber Methicillin sowie die anhand von Microarrays gezeigte veränderte Expression Zellwand-assoziiierter Gene in der  $\Delta pknB$ -Mutante. Die Analyse der Aminosäuresequenz von SA1063 zeigte drei extrazelluläre PASTA-Domänen, die ebenfalls für eine Zellwandsynthese-assoziierte Funktion sprechen. SA1063 wird gemeinsam mit einer Ser/Thr-Phosphatase SA1062 transkribiert.
- Die DNA-Polymerase I wird nicht für das Wachstum benötigt und ist auch für die Reparatur von UV-Schäden in der DNA in *S. aureus* nicht essentiell.
- Die Topoisomerase III (TopB) ist für das Wachstum von *S. aureus* nicht essentiell und zeigt gemessen am Auftreten ahämolytischer Klone keine erhöhte Mutationshäufigkeit.
- Alle Mutanten wurden im Sepsismodell in Mäusen untersucht, keine der Deletionsmutanten zeigte eine veränderte Virulenz, verglichen mit dem Wildtyp.
- Alle Mutanten wurden auf Schafs- und Kaninchenblutplatten auf ihre Hämolyse-Aktivität untersucht. Nur die Deletionsmutanten  $\Delta SA0241$  (*ygbP1*) und  $\Delta SA1063$  (*pknB*) zeigten eine veränderte Hämolyse-Aktivität. Bei der Mutante  $\Delta ygbP1$  war eine geringere Hämolyse zu sehen, bei der Mutante  $\Delta pknB$  war sie dagegen verstärkt.
- Die Gene *nusG*, SA0245 und SA1444 konnten nicht deletiert werden. Bei diesen drei Genen könnte es sich um essentielle Gene handeln.

## 5.2 Herstellung konditional letaler Mutanten

Ein Gen, das nicht deletiert werden kann, könnte essentiell für einen Organismus sein. Eine Möglichkeit putativ essentielle Gene zu analysieren, stellen konditionale Expressionssysteme dar. Vier verschiedene konditionale Expressionssysteme wurden in dieser Arbeit getestet. Drei dieser vier getesteten Systeme lag dasselbe Prinzip zugrunde: Der wildtypische Promotor des Zielgens wurde durch einen anderen, experimentell regulierbaren Promotor ersetzt. In einem weiteren Ansatz wurde versucht konditionale Mutanten mit Hilfe von Antisense-RNA zu erhalten.

### 5.2.1 Xylose-Regulon

Bei dieser Methode sollte die Expression eines putativ essentiellen Gens unter die Kontrolle des Xylose-Regulons gebracht werden. Das Xylose Regulon besteht aus dem Repressor XylR und dem Promotor/Operator (P/O)-Bereich des *xyLAB* Operons aus *Staphylococcus xylosus* (Abb. 33).

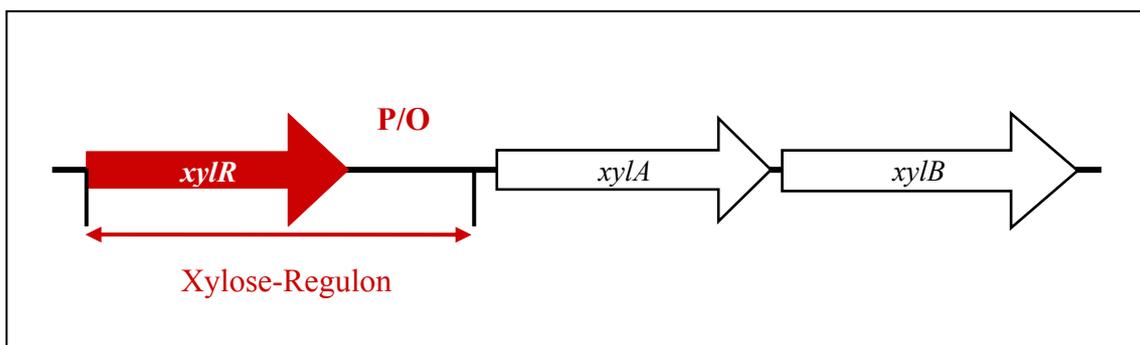


Abb. 33: Schematische Darstellung des Xylose-Operons von *Staphylococcus xylosus*. Das den Xylose-Repressor codierende Gen *xyIR* befindet sich upstream des *xyLAB* Operons. Die Gene *xyIA* und *xyIB* codieren für eine Xylose-Isomerase und für die Xylulokinase; P/O kennzeichnet die Promotor/Operator Region des *xyLAB* Operons.

In der Promotor/Operator-Region von *xyLAB* befindet sich eine palindromische Sequenz, die als Bindungsstellen für den Xylose-Repressor identifiziert wurde (Sizemore et al., 1992). Das Xylose-Operon unterliegt außerdem der Katabolit-Repression, in der Promotor/Operator-Region von *xyLAB* befindet sich eine Bindungssequenz (*cre*) des „Catabolite Control Protein A“ (CcpA, Hueck et al., 1994). In Gegenwart von Glukose findet keine Transkription des Operons statt (Katabolit-Repression). Außerdem ist in Abwesenheit von Xylose, der Repressor XylR an die Operatorsequenz gebunden und

verhindert die Expression nachgeschalteter Gene. In Anwesenheit des Induktors Xylose (und Abwesenheit von Glukose), sollte die Expression an *P/Oxyl* induziert werden (Kim et al., 1996; Sizemore et al., 1992; Wieland et al., 1995; Rohrer et al., 1999).

#### 5.2.1.1 Fusion des Xylose-Regulons mit *nusG*

Das Xylose-Regulon (1683 bp) war bereits in den Vektor pBT2 über die Schnittstellen *HindIII/BamHI* kloniert worden (pBT2-*xyIR*). Zur konditionalen Expression von *nusG* wurde ein 470 bp langes Fragment vom upstream Bereich von *nusG* und 5'-Bereich von *nusG* über die Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI* hinter das Xylose-Regulon kloniert und ergab den Vektor pKSX*nusG*. Die zur Klonierung verwendete Sequenz umfasste den kompletten ORF von *secE*, einschließlich 27 bp upstream von *secE* (208 bp) und 250 bp vom ORF *nusG*, einschließlich 12 nt upstream des ORFs *nusG*. Die beiden Gene werden vermutlich in einem Operon transkribiert. Die beiden ORFs sind nur durch 12 nt voneinander getrennt. Für *Staphylococcus carnosus* wurde gezeigt, dass *secE* und *nusG* in einem Operon transkribiert werden (Meens et al., 1994). Dieselbe Organisation wurde in *E. coli* (Downing et al., 1990) und *Streptomyces griseus* beschrieben (Miyake et al., 1994). Da *secE* und *nusG* in *S. aureus* vermutlich ein Operon bilden, wurde angenommen, dass sich der gemeinsame Promotor upstream von *secE* befindet. Die Shine Dalgarno-Sequenzen von *secE* und *nusG* bleiben in dem Fragment erhalten. Das *secE*-5'-*nusG*-Fragment wurde mit den Primern *secEBamHI* und *nusGEcoRI* amplifiziert. Die genaue Abfolge der Klonierung wurde unter 4.21.2 beschrieben. Nach Fertigstellung des Vektorkonstrukts pKSX*nusG* wurde der Vektor in *S. aureus* 8325 eingebracht. Durch homologe Rekombination des klonierten Bereichs *secE*-5'-*nusG* auf dem Plasmid pKSX*nusG* und der identischen Sequenz auf dem Bakterienchromosom, kommt es zur Integration des kompletten Vektors vor dem Zielgen (Single Crossover). Dadurch gelangt das Xylose-Regulon vor das Zielgen *nusG* und der wildtypische Promotor wird vom Zielgen durch die Insertion des Vektors räumlich entfernt (Abb. 34). Bei der Integration des Vektors kommt es zur Verdopplung der an der Rekombination beteiligten Sequenz. Das *secE*-Gen, sowie der 5'-Bereich von *nusG* sind noch unter Kontrolle des wildtypischen Promotors. Das vollständige *nusG*-Gen sowie *secE* liegen außerdem hinter dem Xylose Regulon vor. Durch mehrmaliges Überimpfen der Kulturen bei 42 °C sollte der nicht ins Chromosom integrierte und Temperatur-sensitive Vektor pKSX*nusG* verloren gehen. Die Klone werden auf Cm-Platten ausplattiert. Einzelne Klone wurden im Southern Blot auf die Integration des Vektors überprüft (Abb. 35). Die Sonden für die Southern Hybridisierung wurde mit den Primern

*cat2* und *cat3* hergestellt, die ein 421 bp großes Produkt aus der Chloramphenicol-Resistenzkassette (*cat*) amplifizieren. Eine weitere Sonde wurde mit den Primern *secEBam*HI und *nusGEco*RI in einer PCR hergestellt.

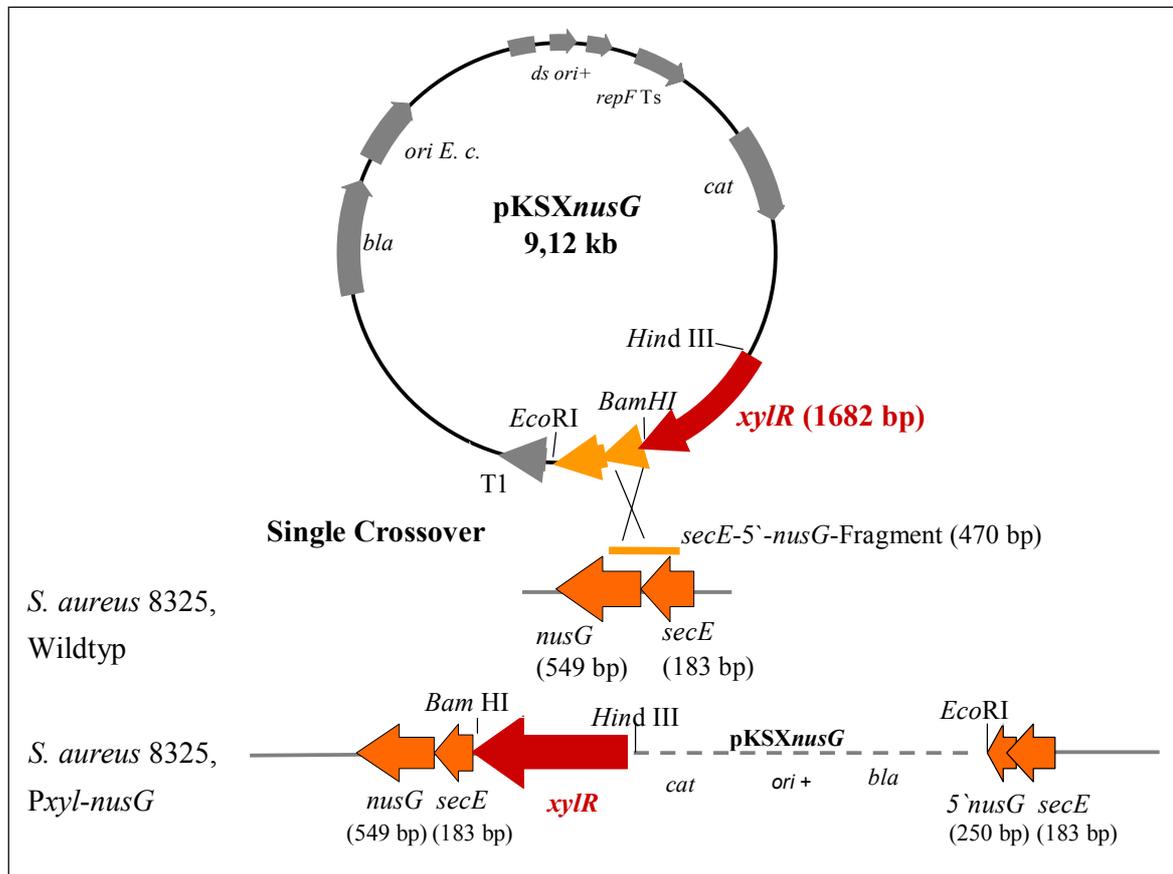


Abb. 34: Schematische Darstellung der Insertion von pKSXnusG in das Chromosom von *S. aureus* 8325. In dem Vektor pB2 ist das Xylose-Regulon mit einem 470 bp großen Fragment fusioniert, das *secE* und 250 bp von 5'-*nusG* umfasst und mit pKSXnusG bezeichnet wird. Nach erfolgter homologer Rekombination liegt der Vektor integriert in das Bakterienchromosom vor. Bei der Integration kommt es zur Verdopplung der an der Rekombination beteiligten Sequenzen. Das Gen *secE* und 250 bp von *nusG* liegen hinter dem wildtypischen Promotor. Das vollständige *nusG*-Gen sowie *secE* liegen außerdem hinter dem Xylose-Regulon vor. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

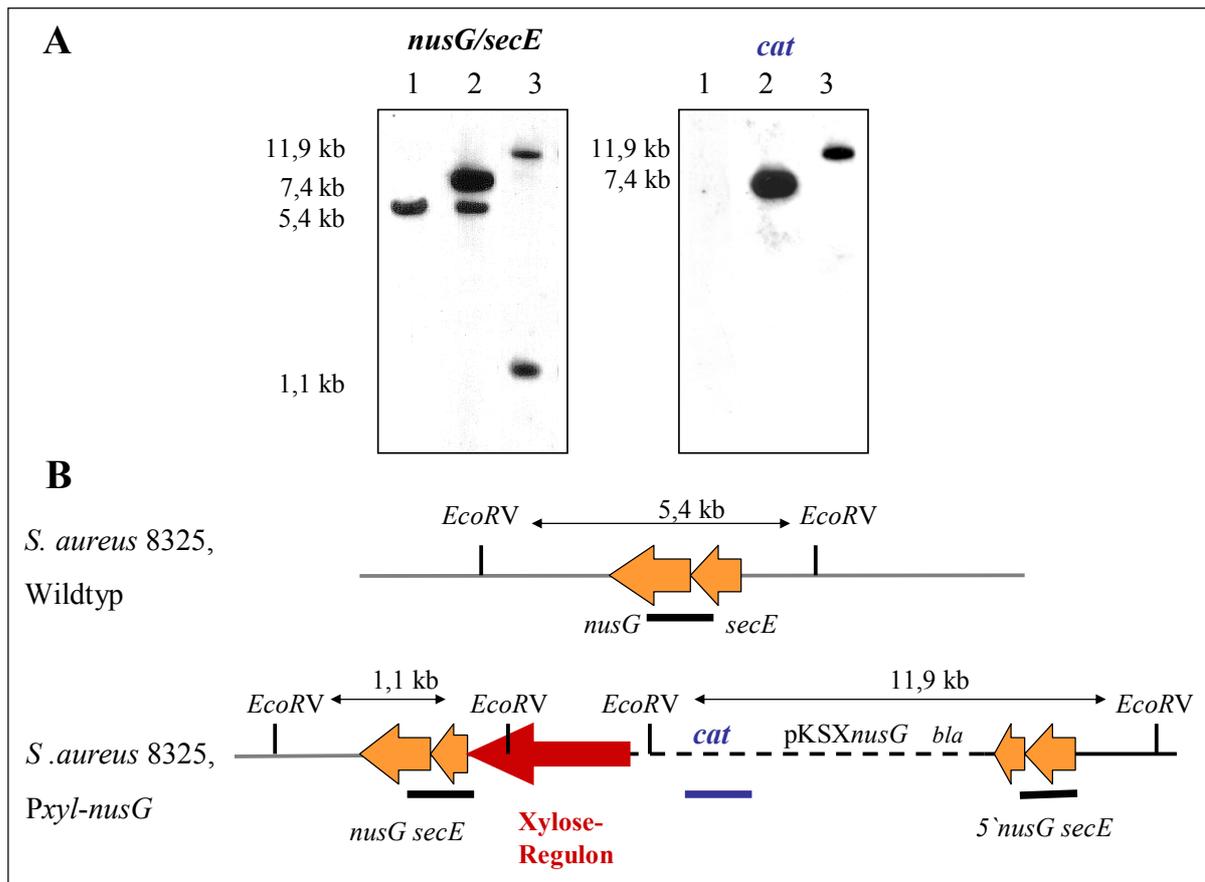


Abb. 35: (A) Southern-Hybridisierungen der konditionalen Mutante *Pxyl-nusG* im Vergleich zum Wildtyp. Spur 1: Wildtypische chromosomale DNA aus *S. aureus* 8325; Spur 2: Chromosomale DNA aus *S. aureus* 8325, Wt mit Plasmid *pKSXnusG*; Spur 3: Chromosomale DNA aus der konditionalen Mutante *S. aureus* 8325 *Pxyl-nusG*. (B) Schematische Darstellung des mutierten Bereichs auf dem Chromosom. Die chromosomale DNA der Mutante und des Wildtyp-Stammes wurde mit dem Enzym *EcoRV* gespalten. Die Bereiche mit denen die verwendeten Sonden in (A) hybridisieren sind durch einen Balken gekennzeichnet.

### 5.2.1.2 Charakterisierung der konditionalen Mutante *S. aureus* 8325 *Pxyl-nusG*

Falls es sich bei *nusG* um ein essentielles Gen handelt, sollte das Wachstum der konditionalen Mutante *S. aureus Pxyl-nusG* in Gegenwart von Glukose über die Katabolit-Repression an *xylR* gehemmt sein. In Gegenwart von Xylose und ohne zusätzliche Glukose sollte die Expression des *nusG*-Gens dagegen induziert werden und die konditionale Mutante sollte wachsen. Die Wachstumsanalysen wurden in Analogie zu Rohrer et al., 1999 durchgeführt. Als Wachstumsmedium diente LB-Medium, das entweder mit 0,5 % Glukose oder 0,5 % Xylose ergänzt wurde. Die Übernachtskultur von Wildtyp und Mutante wurden bei 42 °C angezogen, ebenso wurde die anschließende Wachstumsanalyse bei 42 °C durchgeführt (Abb. 36). Die erhöhte Temperatur sollte ein Herausspalten des Temperatur-sensitiven Vektors aus der konditionalen Mutante verhindern. Durch Zugabe von Glukose konnte das Wachstum der konditionalen Mutante *Pxyl-nusG* nicht gehemmt

werden. Die Wachstumskurve von *S. aureus* 8325 Wildtyp und der isogenen konditionalen Mutante *Pxyl-nusG* unterschieden sich nicht in Gegenwart von Glukose oder Xylose. Anhand der Wachstumskurve würde man vermuten, dass das Gen *nusG* nicht essentiell für *S. aureus* ist. Es könnte aber auch sein, dass die Gen-Expression durch die Zugabe von Glukose nicht vollständig unterdrückt werden kann. Die konditionale Gen-Expression sollte mit diesem System und einem bekannten essentiellen Gen (*dnaE*) wiederholt werden.

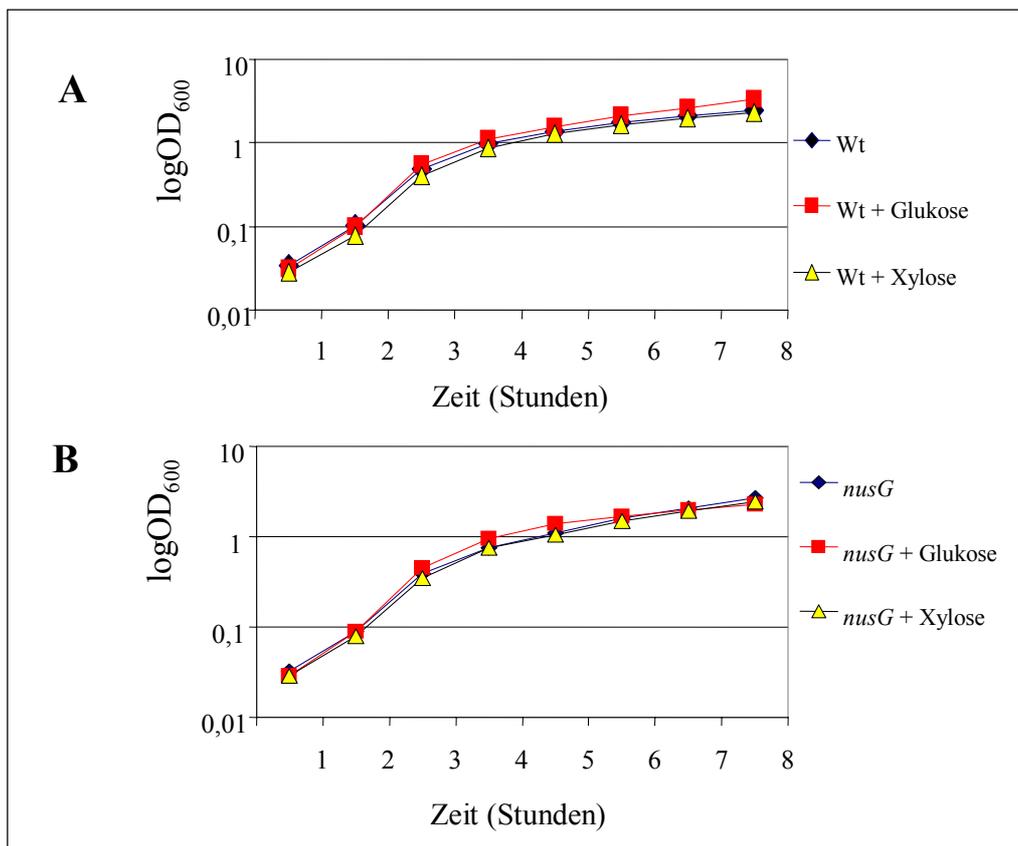


Abb. 36: Wachstumsanalyse der konditionalen Mutante *S. aureus Pxyl-nusG* (B) im Vergleich zum Wildtyp (A). Die Wachstumskurve wurde bei 42°C in LB-Medium durchgeführt, das mit 0,5 % Glukose oder 0,5 % Xylose versetzt wurde oder keine Zusätze hatte.

### 5.2.1.3 Fusion von *dnaE* mit dem Xylose-Regulon

Das Gen *dnaE* codiert für die  $\alpha$ -Untereinheit der DNA-Polymerase III, die für die Replikation der chromosomalen DNA essentiell ist (Inoue et al., 2001). Ein 5'-Bereich des *dnaE*-Gens, der 838 bp von *dnaE* mit der Shine Dalgarno-Sequenz umfasst wurde mit den Primern *dnaEBamHI* und *dnaEEcoRI* amplifiziert und in den Vektor pBT2-*xyIR* kloniert. Der daraus resultierende Vektor wurde pKSX*dnaE* genannt. Die Klonierungsstrategie wurde unter 4.21.2 beschrieben und wurde für die Herstellung der konditionalen Mutante *Pxyl-nusG* exemplarisch dargestellt (Abb. 34). Nach der Integration des Vektors

pKSX*dnaE* vor dem Zielgen gelangt *dnaE* unter die Kontrolle des Xylose-Regulons. Die Überprüfung der Insertionsmutanten im Southern Blot ließ zwar die erwarteten Mutanten-Banden erkennen, zusätzlich war aber auch in allen Klone eine Plasmidbande pKSX*dnaE*, sowie eine schwache Wildtypbande zu erkennen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Insertion des Vektors in das Chromosom nicht stabil sondern reversibel ist. Auch bei einer erhöhten Temperatur von 42 °C ist die Replikation des Temperatur-sensitiven Vektors nicht vollständig unterbunden. Die konditionale Mutante P*xyl-nusG* wurde ebenfalls erneut im Southern Blot untersucht. Es stellte sich heraus, dass es in dieser Mutante zu einer Herausspaltung des Insertionsvektors (pKSX*nusG*) gekommen war. Mit der Herausspaltung des Vektors wird die wildtypische Sequenz regeneriert. Da dieses konditionale System (Xylose-Regulon) nicht stabil ist, sollte im Folgenden ein anderes konditionales Expressionssystem, pMUTIN4, getestet werden.

### 5.2.2 pMUTIN4/Pspac

Der Vektor pMUTIN4 hat die Eigenschaft, dass er nicht in gram-positiven Bakterien replizieren kann, da er nur über Replikations-Sequenzen verfügt (ColE1) die nur von gram-negativen Bakterien verwendet werden können. Auf dem Plasmid pMUTIN4 ist der induzierbare Pspac-Promotor enthalten. Pspac besteht aus einer *lac*-Operator Sequenz aus *E. coli* fusioniert an den Promotor des *B. subtilis* SPO1 Phagen. Im Vektor pMUTIN4 wurde die O1 *lac* Operator-Region aus *E. coli* durch eine perfekte palindromische Sequenz („oid“) ersetzt, die eine bessere Bindung des Repressors LacI ermöglichen soll. Der Repressor LacI ist ebenfalls auf dem Plasmid codiert und wird konstitutiv exprimiert. LacI bindet an die Operatorsequenz im Pspac-Promotor und verhindert die Expression nachgeschalteter Gene. Durch drei verschiedene Terminator-Sequenzen ( $\lambda t_0$  und  $t_1 t_2$  aus dem *rrnB* Operon aus *E. coli*) soll die Expression an Pspac von upstream gelegenen Promotoren abgeschirmt werden. (Vagner et al.; 1998, Zhang et al., 2000). Durch Zugabe von IPTG in das Wachstumsmedium kann die Gen-Expression induziert werden. Der Induktor IPTG bindet an LacI, der Repressor ändert daraufhin seine Konformation und fällt vom Pspac-Promotor ab. Die Expression an Pspac kann somit stattfinden. Hinter dem Pspac-Promotor befindet sich eine MultipleCloning Site (MCS). In diese MCS wird der 5'-Bereich des entsprechenden Zielgens kloniert. In dieser Sequenz muss die RBS des Zielgens enthalten sein, nicht jedoch der zugehörige Promotor. In Analogie zum Xylose-regulierten System, das unter 5.2.1 beschrieben wurde, soll durch ein Rekombinationsereignis der klonierten Sequenz in der MCS des Vektors und der

identischen Sequenz auf dem Chromosom des Zielstammes die Integration des Vektors vor dem Zielgen stattfinden. Dadurch gelangt das Zielgen unter den Einfluss des Pspac Promotors. Die Klonierungsabfolge wurde bereits unter 4.21.3 beschrieben. Mit dem Vektor gelangt außerdem die Erythromycin-Resistenzkassette (*ermAM*) in das Chromosom und ermöglicht die Selektion möglicher Integrationsmutanten (Abb. 37).

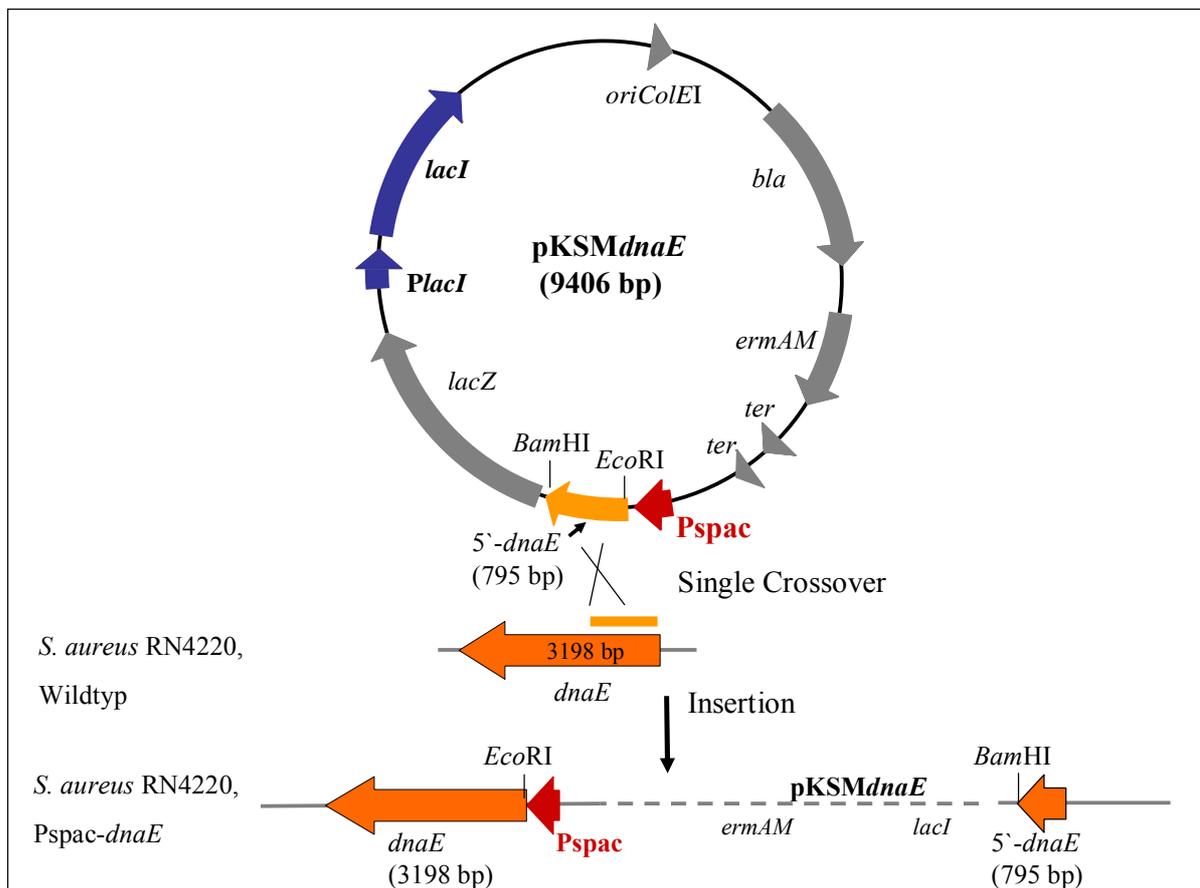


Abb. 37: Schematische Darstellung des Vektors pMUTIN4 und dessen Integration in das Chromosom des Zielstammes *S. aureus* RN4220. Ein 5'-Bereich des Zielgens *dnaE* mit RBS wurde in die MCS des Vektors kloniert. Nach der Elektroporation des Vektors in den Zielstamm *S. aureus* RN4220 kommt es zur homologen Rekombination (Single Crossover) der identischen Sequenzen auf dem Vektor und dem bakteriellen Chromosom und dadurch zur Integration des Vektors. Das Ziel-Gen *dnaE* steht nun unter der Kontrolle des Pspac-Promotors. Das Gen für den Repressor LacI ist auf dem Vektor enthalten und wird ebenfalls vor das Zielgen integriert.

Zunächst wurde ein 795 bp großes Fragment aus dem 5'-Bereich des *dnaE*-Gens mit RBS mit den Primern *dnaEBamHI2* und *dnaEEcoRI2* amplifiziert und in den Vektor pMUTIN4 kloniert. Die Klonierung ergab den Vektor pKSMdnaE (Beschreibung der Klonierungsstrategie unter 4.21.3). Unterschiedliche Mengen des entsalzten Vektors (200 ng-3 µg) pKSMdnaE wurden zur Elektroporation von *S. aureus* RN4220 verwendet. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Agar mit Erythromycin (10 µg/ml) selektiert. Die

Elektroporation wurde fünfmal wiederholt mit je 3 verschiedenen Konzentrationen des Vektors pKSM*dnaE*. Nach der Elektroporation waren durchschnittlich 0-5 Klone gewachsen. Die Überprüfung der Klone im Southern Blot ergab, dass der Vektor nicht integriert war, da kein Signal mit der Erythromycin-Sonde (*ermAM*) erhalten wurde, oder die Integration des Vektors war an einer falschen Stelle im Genom erfolgt. Die Erythromycin-Sonde (*ermAM*) wurde aus dem Vektor pMUTIN über die Schnittstellen *DraII* gespalten und ergab ein 1130 bp langes Fragment.

Weitere Versuche zur Mutation eines nicht essentiellen Gens, *pknB* (SA1063) über das pMUTIN/Pspac-System waren ebenfalls erfolglos. Zur Konstruktion des Vektors pKSM*pknB* wurde ein 610 bp langes Fragment aus dem 5'-Bereich vom ORF *pknB* mit den Primern *pknBEcoRI* und *pknBBamHI* amplifiziert und in den Vektor pMUTIN4 kloniert. In diesem Fragment war die RBS enthalten. Nach der Elektroporation des Vektors pKSM*pknB* in den Stamm *S. aureus* RN4220 wurden ebenfalls keine Insertionsmutanten in *pknB* erhalten.

### 5.2.3 Antisense-RNA

Bei dieser Methode sollte die Expression des Zielgens durch die Synthese seiner komplementären Antisense-RNA inhibiert werden (Ji et al., 2001; Forsyth et al., 2002). Zur regulierten Expression der Antisense-RNA wurde das unter 5.2.1 beschriebene Xylose-Regulon verwendet. Als Vektor diente der Shuttle-Vektor pRB473. Die Klonierungsstrategie wurde unter 4.21.4 beschrieben. Das Xylose-Regulon war bereits über die Schnittstellen *HindIII* und *BamHI* in den Vektor pRB473 kloniert worden. Die DNA des Zielgens wurde über die Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI* in Antisense-Orientierung hinter das Xylose-Regulon (*xylR*) kloniert. Zunächst sollte die Expression bekannter essentieller Gene, *dnaE* (Inoue et al., 2001) und *ligA* (Kaczmarek et al., 2001), untersucht werden. Die Expression des Ligase-Gens wurde mit zwei verschiedenen Antisense-Konstrukten untersucht. Eines dieser Konstrukte umfasste 751 bp aus der 5'-Region des *ligA*-Gens und wurde mit den Primern *ligA1EcoRI* und *ligA3BamHI* synthetisiert. Die Klonierung dieses Fragmentes in den Vektor pRB473-*xylR* ergab das Plasmid pKSA*ligA1/3*. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 38 veranschaulicht. Das zweite Konstrukt umfasste das komplette Ligase-Gen und war 2070 bp lang. Zur Synthese des 2070 bp langen *ligA*-Konstruktes wurden die Primer *ligA1EcoRI* und *ligA2BamHI* verwendet.

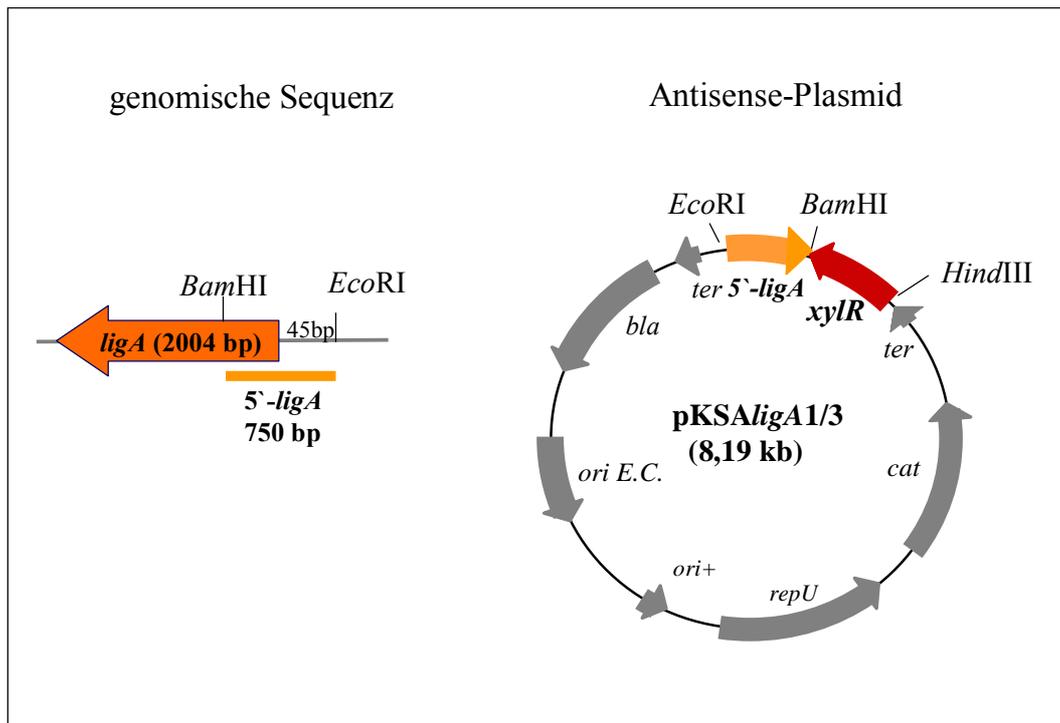


Abb. 38: Konstruktion des Antisense-Plasmides pKSAligA1/3. Ein 750 bp langes Fragment des Zielgens *ligA* wurde in einer PCR amplifiziert und in Antisense-Orientierung hinter das Xylose-Regulon in den Vektor pRB473-*xylR* kloniert.

Zur konditionalen Expression von *dnaE* wurde ein 795 bp langes Fragment aus der 5'-Region des *dnaE*-Gens mit den Primern *dnaEBam*HI2 und *dnaEEco*RI2 synthetisiert. Die drei beschriebenen Fragmente wurden jeweils getrennt in den Vektor pRB473-*xylR* in Antisense-Orientierung kloniert (Abb. 38). Anschließend wurde jeder der Vektoren in den Stamm *S. aureus* RN4220 transformiert und das Wachstum der Antisense-Mutanten wurde untersucht. In Gegenwart von Xylose sollte die Expression der Antisense-RNA induziert werden und das Wachstum der Bakterien sollte dadurch gehemmt werden. In Gegenwart von Glukose sollte die Expression der Antisense-RNA dagegen reprimiert sein und das Wachstum der Bakterien kann stattfinden. Jedoch konnte in keiner der drei Antisense-RNA-Mutanten das Wachstum durch Xylose gehemmt werden. Der Verlauf einer typischen Wachstumskurve ist in Abb. 39 für die *ligA1/3*-Antisense-Mutante dargestellt.

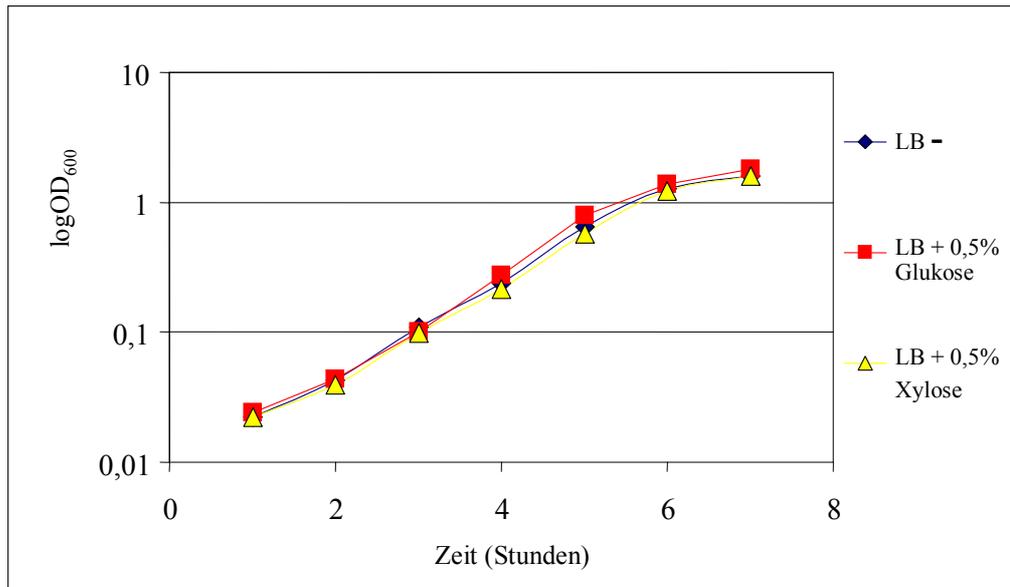


Abb. 39: Wachstumskurve des Stammes *S. aureus* RN4220 mit dem Antisense-Konstrukt pKSAIigA1/3. Die Wachstumskurve wurde in LB-Medium in Gegenwart von Chloramphenicol (10 µg/ml) zur stabilen Weitervererbung des Antisense-Vektors pKSAIigA1/3 durchgeführt. Das Wachstumsmedium wurde entweder mit 0,5 % Glukose oder 0,5 % Xylose ergänzt.

#### 5.2.4 pLL30/Pspac/pMJ8426

Bei dieser Methode wird der Pspac-Promotor durch ein doppeltes Crossover Ereignis stabil vor das Zielgen integriert. Die Insertionskassette mit dem Pspac-Promotor befindet sich auf einem Temperatur-sensitiven Shuttle-Vektor, der vor dem Rekombinationsereignis im gram-positiven Wirt amplifiziert werden kann. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination. Der Shuttle-Vektor pLL30 enthält zwei MCS. Eine dieser MCS befindet sich hinter dem Pspac-Promotor. In diese MCS wird der 5'-Bereich des Zielgens mit RBS kloniert. In die zweite MCS wird ein Fragment kloniert, das sich unmittelbar upstream des Zielgens befindet. Auf der Insertionskassette befindet sich außerdem, upstream des Pspac Promotors, eine Terminationssequenz, die aus vier Tandem Wiederholungen des  $t_1$  Transkriptions- Terminators vom *E. coli rrnB* Operon besteht sowie die Chloramphenicol-Resistenzkassette (*cat*). Die Klonierungsabfolge wurde unter 4.21.5. beschrieben. Das Vektor-Konstrukt wurde in *S. aureus* RN4220 transformiert. Nach Kultivierung der transformierten Bakterien und dreimaligem Überimpfen bei 42 °C sollte der Temperatur-sensitive Vektor verloren gegangen sein. Durch ein doppeltes Crossover der Sequenzen auf dem Vektor und der entsprechenden homologen Sequenzen im Bakterienchromosom sollte es zur Insertion der *cat-ter-Pspac*-Kassette vor dem Zielgen gekommen sein. Rekombinante Klone sind Chloramphenicol-resistent und sollten nach

Verlust des Vektors pLL30 Tetrazyklin-sensitiv sein. Diese Methode ist in Abb. 40 schematisch für das Zielgen *ligA* dargestellt.

#### 5.2.4.1 Mutation von *ligA* mit dem Plasmid pLL30

Zur konditionalen Expression von *ligA* wurde ein 1060 bp langes Fragment aus dem 5'-Bereich von *ligA*, einschließlich RBS, amplifiziert. Die dafür benötigten Primer waren *ligAEcoRI*(pLL) und *ligABamHI*(pLL). Das Fragment wurde über die Schnittstellen *EcoRI/BamHI* hinter den Pspac-Promotor in den pLL30 Vektor kloniert. Ein weiteres, 1090 bp langes Fragment, upstream von *ligA*, wurde mit den Primern *ligASalI*(pLL) und *ligAXhoI*(pLL) amplifiziert und in die zweite MCS des Vektors pLL30 kloniert. Nach Transformation des Vektors in *S. aureus* RN4220 kam es zum doppelten Crossover zwischen den identischen Sequenzen auf dem Plasmid und dem Bakterien-Chromosom und damit zur Insertion der *cat-ter*-Pspac-Kassette vor das Zielgen *ligA* (Abb.40). Die Insertionsmutante wurde im Southern Blot überprüft (Abb. 41). Der Southern Blot wurde mit 3 verschiedenen Sonden hybridisiert. Die Primer *cat2* und *cat3* dienten zum Nachweis der Chloramphenicol-Resistenzkassette (*cat*) und ergaben eine 421 bp lange Sonde. Zur Synthese zweier weiterer Sonden wurden die für die Klonierung der Fragmente verwendeten Primer *ligAEcoRI* und *ligABamHI* sowie *ligAXhoI* und *ligASalI* verwendet. Die *Pspac-ligA*-Insertionsmutante exprimiert das Gen *ligA* konstitutiv. Die konstitutive Mutante zeigte kein Wachstumsnachteil in LB-Medium im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 42). Zur Kontrolle der Expression von *ligA* wird das Repressor-Plasmid pMJ8426 benötigt.

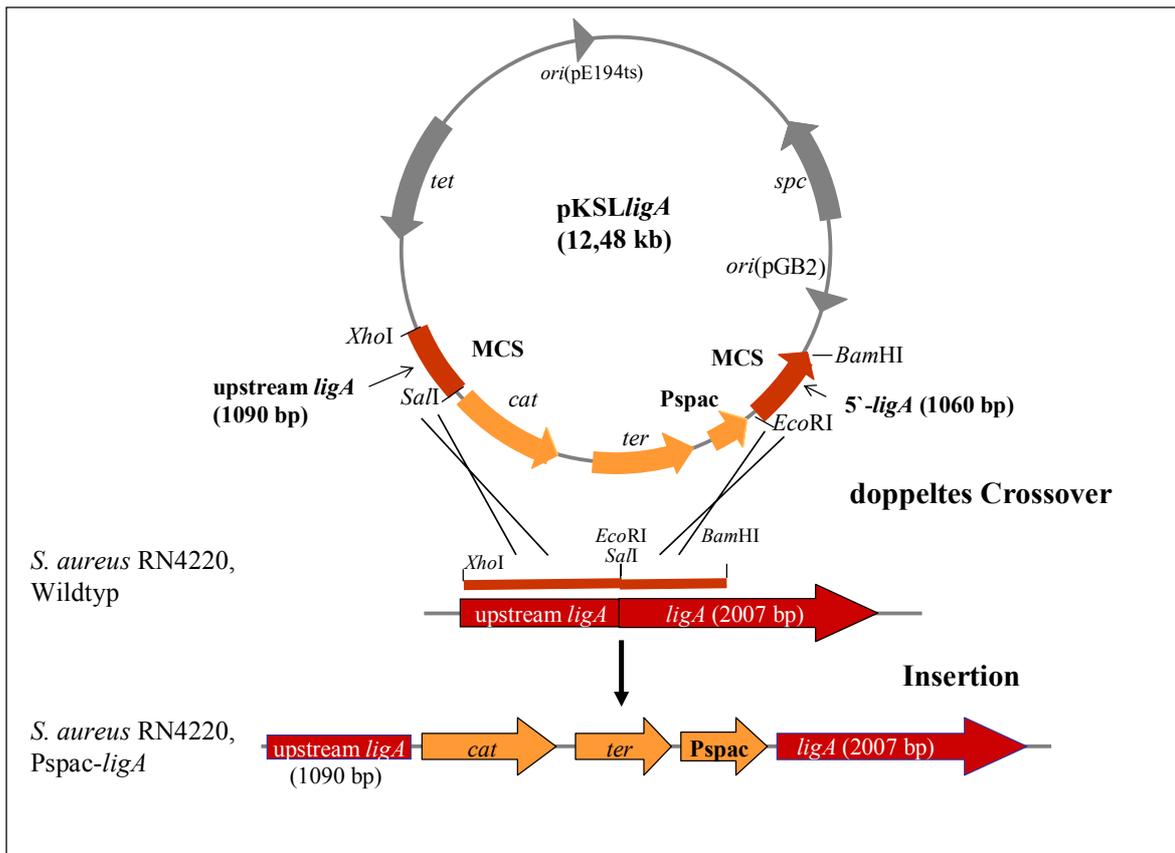


Abb. 40: Schematische Darstellung der Insertion von Pspac, der Chloramphenicol-Resistenzkassette (*cat*) und der Terminatorregion (*ter*) vor das Zielgen *ligA*. Ein Fragment, das den 5'-Bereich des *ligA* Gens einschließlich der RBS enthält wird in den Vektor pLL30 hinter den Pspac-Promotor kloniert. Ein zweites Fragment upstream von *ligA* wurde in die zweite MCS kloniert. Nach Transformation des Vektors in *S. aureus* RN4220 kommt es zur homologen Rekombination der identischen Sequenzen auf dem Plasmid pKSL $ligA$  und dem Chromosom. Dabei integriert Pspac vor das Zielgen. Die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen sind angegeben.

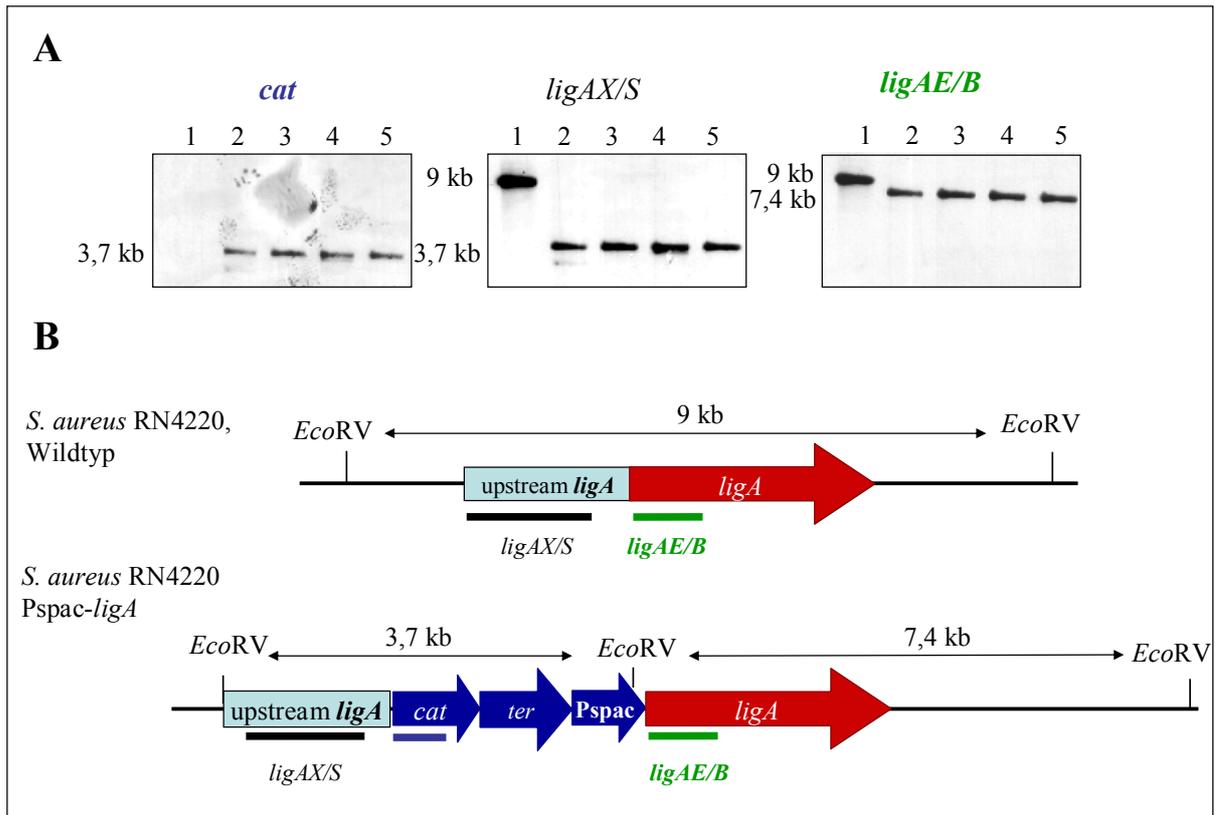


Abb. 41: (A) Southern-Hybridisierungen der *Pspac-ligA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Spur 1: Wildtypische chromosomale DNA aus *S. aureus* RN4220; Spur 2-5: Chromosomale DNA aus *S. aureus* RN4220 *Pspac-ligA*. (B) Schematische Darstellung des mutierten Bereichs auf dem Chromosom. Die chromosomale DNA der Mutanten und des Wildtyp-Stammes wurde mit dem Enzym *EcoRV* gespalten. Die Bereiche mit denen die verwendeten Sonden in (A) hybridisieren sind durch einen Balken gekennzeichnet. Die Größen der erwarteten Signale im Southern Blot sind angegeben.

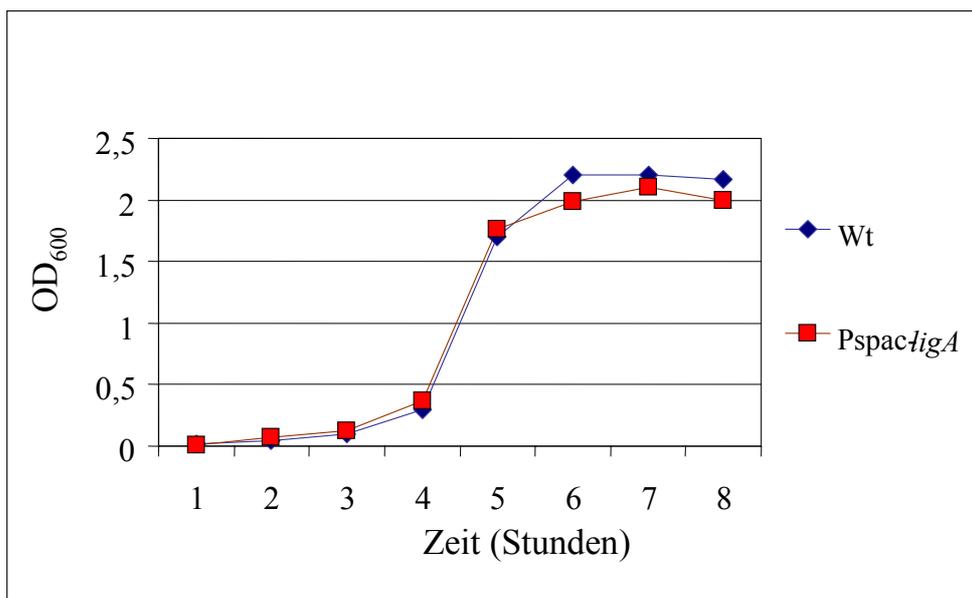


Abb. 42: Wachstumskurve der Insertionsmutante *S. aureus* RN4220 *Pspac-ligA* im Vergleich zum Wildtyp *S. aureus* RN4220 in LB-Medium bei 37 °C. Die Insertionsmutante exprimierte *ligA* konstitutiv.

### 5.2.4.1.1 Repression der Expression von *ligA* durch das Plasmid pMJ8426

Zur Kontrolle der Gen-Expression wird der Repressor LacI benötigt. LacI bindet an die Operator-Sequenz in Pspac und verhindert die Gen-Expression nachgeschalteter Gene. Das den Repressor codierende Gen *lacI* liegt auf dem Plasmid pMJ8426 vor. Die Expression des *lacI*-Gens erfolgt konstitutiv durch den starken Promotor des Penicillinase-Gens aus *Bacillus licheniformis* und der zugehörigen RBS (Abb. 43). Mehrere Kopien des „Repressor-Plasmides“ pMJ8426 ermöglichen außerdem eine hohe Expression von LacI. Das pMJ8426 Repressor-Plasmid wurde zur kontrollierten Gen-Expression in die konstitutive Pspac-*ligA*- Mutante transformiert. In Abwesenheit eines Induktors ist die Expression an Pspac reprimiert. Die Gen-Expression an Pspac kann durch Zugabe von IPTG induziert werden. Der Induktor IPTG bindet an den Repressor LacI und ermöglicht eine Expression an Pspac.

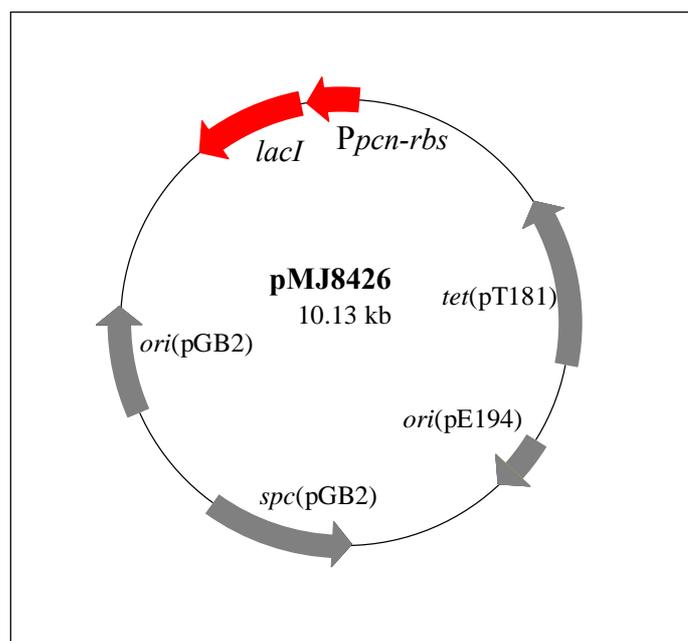


Abb. 43: Schematische Darstellung des „Repressorplasmides“ pMJ8426. Die genetische Information des Repressors *lacI* befindet sich auf dem Shuttle-Vektor pMJ8426. Das Gen *lacI* wird von einem starken Promotor Ppcn (Penicillinase-Promotor) und der zugehörigen RBS aus *B. licheniformis* exprimiert. Die Expression von *lacI* erfolgt konstitutiv.

Das Wachstum der konditionalen Pspac-*ligA*-Mutante wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Induktors IPTG sowie ohne Induktor analysiert. Zum Vergleich wurde auch der Wildtyp *S. aureus* RN4220 mit dem Repressorplasmid pMJ8426 transformiert und das Wachstum dieses Stammes in An- und Abwesenheit von IPTG untersucht. Zunächst wurde eine Übernachtskultur des Wildtyps *S. aureus* RN4220 mit pMJ8426 und der

isogenen Pspac-*ligA*-Mutante mit pMJ8426 in LB-Medium in Gegenwart von 5 µg/ml Tetrazyklin und 0,6 mM IPTG angezogen. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Tag mit einer OD<sub>600</sub> von 0,015 angeimpft. Jede Kultur wurde mit 5 µg/ml Tetrazyklin versetzt. Je eine Kultur von Wildtyp und konditionaler Pspac-*ligA*-Mutante wurde mit 0,6 mM IPTG versetzt. Eine zweite Kultur von Wildtyp und Mutante wurde ohne IPTG angezogen. Nach etwa 5 Stunden Inkubation unter Schütteln bei 37 °C wurde die OD<sub>600</sub> der vier Kulturen gemessen. Die OD<sub>600</sub> lag zwischen 0,6 und 1,2, wobei die konditionale Pspac-*ligA*(+pMJ8426)-Mutante ohne Zugabe von IPTG eine etwas geringere OD<sub>600</sub> aufwies als der Wildtyp(+pMJ8426). Diese Vorkulturen ließ man über Nacht bei 25 °C im Brutschrank stehen. Nach etwa 18 Stunden wurden die Kulturen in frisches Medium überführt. Alle Kulturen wurden mit einer OD<sub>600</sub> von 0,015 angeimpft. Die Kulturen, die bereits zuvor ohne IPTG angezogen worden waren, wurden erneut ohne IPTG inokuliert. Die Vorkultur ohne IPTG diente auch für die Anzucht der Pspac-*ligA*-Mutanten mit den IPTG-Konzentrationen von 3 µM bis 30 µM. Die Pspac-*ligA*-Mutante, die mit 0,3 mM IPTG weiter inkubiert wurde, wurde aus der Vorkultur mit IPTG inokuliert. Das Wachstum der konditionalen Mutante Pspac-*ligA* war abhängig von der Konzentration an IPTG die zugegeben wurde. Das Wachstum des Wildtyp-Stammes *S. aureus* RN4220 mit dem Repressorplasmid pMJ8426 wurde dagegen nicht durch die An- oder Abwesenheit von IPTG beeinflusst (Abb. 44).

Eine verspätete Zugabe von IPTG zu der konditionalen Pspac-*ligA*(+pMJ8426)-Mutante konnte das Wachstum der Mutante nicht mehr induzieren. Dazu wurde eine Vorkultur der zu untersuchenden Bakterien angelegt (siehe oben). Eine Kultur der Pspac-*ligA*(+pMJ8426)- Mutante wurde erst 3 Stunden nach Start der Wachstumskurve mit 0,3 mM IPTG versetzt. In dieser Kultur konnte das Wachstum der Bakterien nicht mehr induziert werden (Abb. 45).

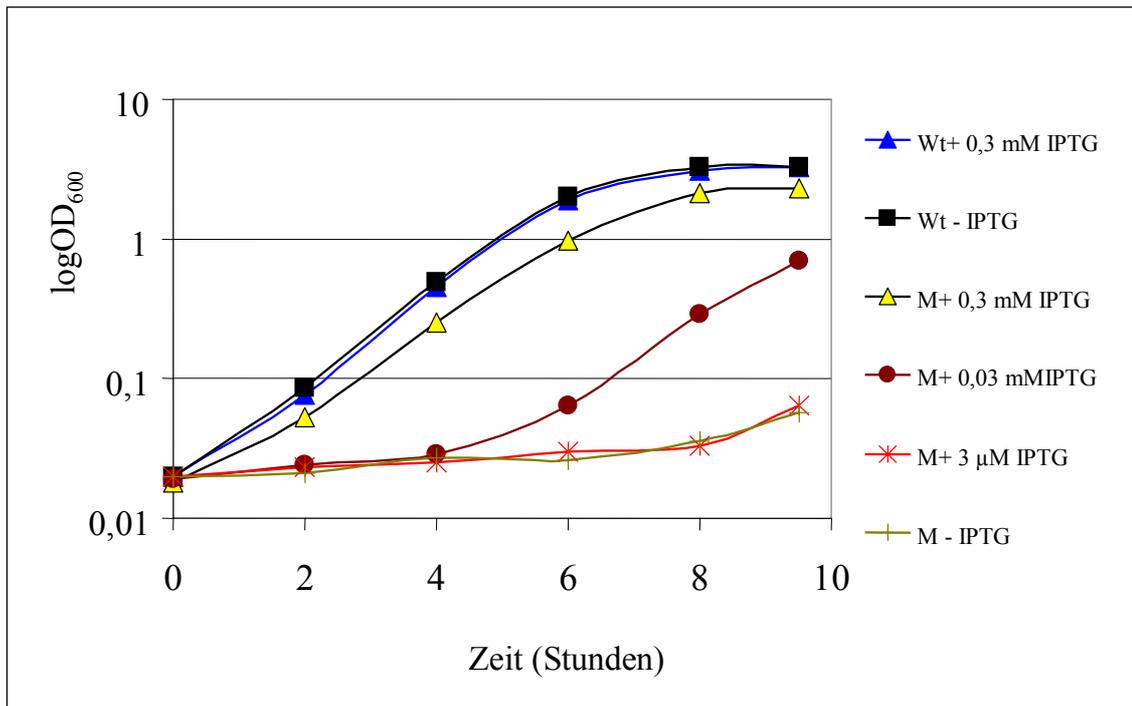


Abb. 44: Wachstumskurven der konditionalen Mutante *S. aureus* RN4220 Pspac-*ligA* (M) und des Wildtyps *S. aureus* RN4220 (Wt) in Gegenwart des Repressorplasmids pMJ8426. Die Wachstumskurve wurde bei 37 °C in LB-Medium ermittelt. Unterschiedliche Konzentrationen von IPTG wurden zugegeben.

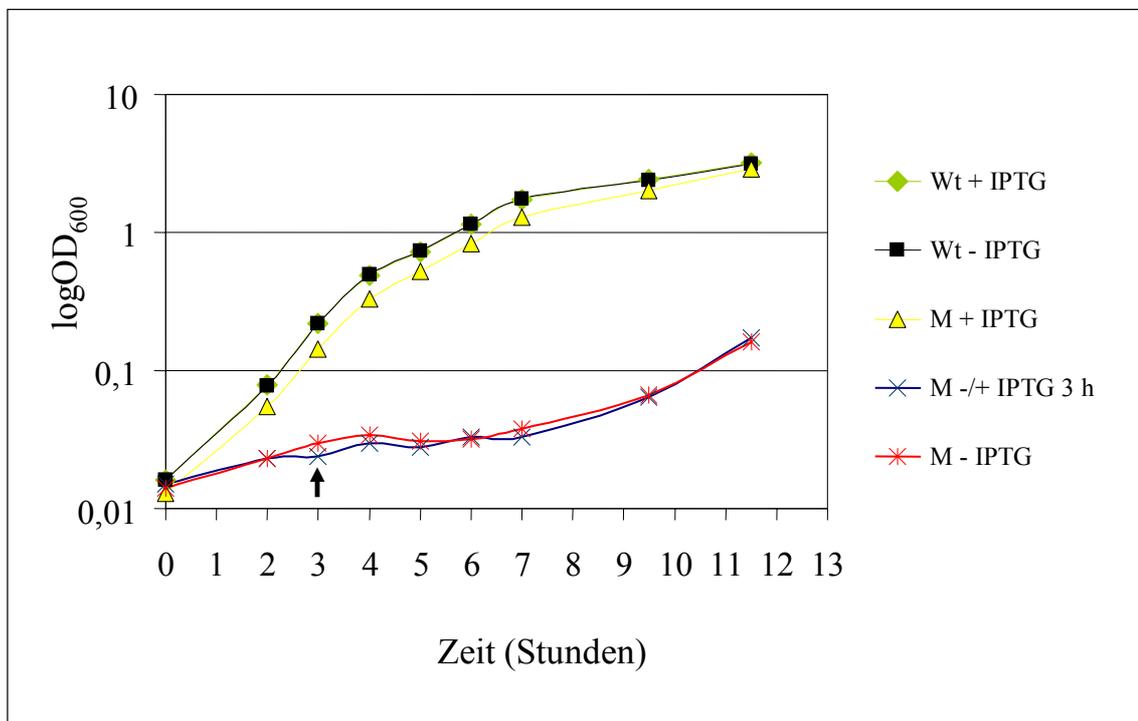


Abb. 45: Wachstumskurven der konditionalen Mutante *S. aureus* RN4220 Pspac-*ligA* (M) und des Wildtyps *S. aureus* RN4220 (Wt) in Gegenwart des Repressorplasmids pMJ8426 bei 37°C in LB-Medium mit 0,3 mM IPTG oder ohne IPTG. Durch eine verspätete Zugabe von IPTG (Pfeil) zu der konditionalen Pspac-*ligA*-Mutante konnte das Wachstum nicht mehr induziert werden.

Das Wachstum der konditionalen Mutante *S. aureus* RN4220 Pspac-*ligA*(+ pMJ8426) wurde außerdem auf Agarplatten mit dem Wachstum des Wildtyps(+ pMJ8426) verglichen. Die Bakterien wurden auf LB-Platten, die mit 10 µg/ml Tetrazyklin und mit 0,3 mM IPTG versetzt waren oder kein IPTG enthielten, ausgestrichen (Abb. 46). Nur wenige vereinzelte Klone von Pspac-*ligA*(+ pMJ8426) konnten ohne IPTG wachsen. Das Wachstum des Wildtyps(+ pMJ8426) unterschied sich nicht auf Platten mit oder ohne IPTG.

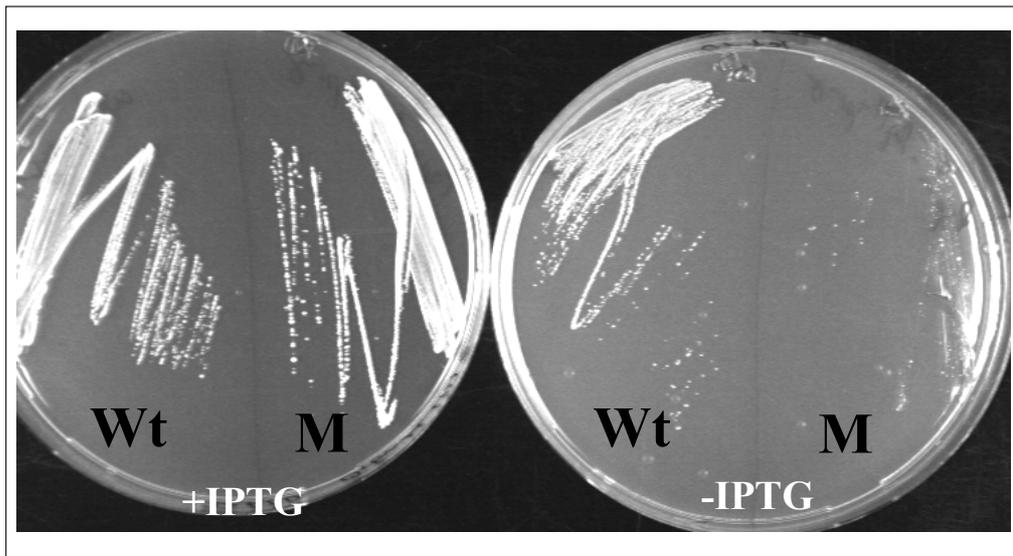


Abb. 46: Wachstum der Pspac-*ligA*-Mutante und des Wildtyps in Gegenwart des Repressorplasmides pMJ8426. Die Bakterien wurden auf LB-Agar mit 10 µg/ml Tetrazyklin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Den Platten war entweder 0,3 mM IPTG zugesetzt worden oder keine weiteren Zusätze waren enthalten. **Wt**: *S. aureus* RN4220 Wildtyp (+ pMJ8426); **M**: *S. aureus* RN4220 Pspac-*ligA* (+ pMJ8426).

#### 5.2.4.1.2 Untersuchung der konditionalen Pspac-*ligA*-Mutante im Tierversuch

Die konditionale Pspac-*ligA*-Mutante wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Labischinski im Pharmaforschungszentrum der Bayer AG in Wuppertal im Tierversuch untersucht. Die konditionale Pspac-*ligA*-Mutante und der isogene Wildtyp *S. aureus* RN4220 wurden in Gegenwart des „Repressorplasmides“ pMJ8426 in LB-Medium mit IPTG über Nacht angezogen. Am folgenden Tag wurde eine Vorkultur der Bakterien ohne Zugabe von IPTG mit einer OD<sub>600</sub> von 0,015 angeimpft und bei mid-logarithmischer Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> zwischen 0,5-0,9) geerntet. In die Versuchstiere, weibliche CFW1-Mäuse, wurde zunächst eine Matrix „Gelfoam“ implantiert. Vier Tage nach der Implantation des Gelfoams unter die Haut der Versuchstiere, erfolgte die Infektion der Mäuse. Das Inokulum betrug sowohl für die konditionale Mutante Pspac-*ligA* und die Wildtypstämme etwa  $1 \times 10^4$  Bakterien je Gelfoam. Die Mäuse erhielten zur stabilen

Weitervererbung des Plasmides pMJ8426 Tetrazyklin (50 mg/kg) i. p. verabreicht. Jeweils die Hälfte der Tiere von Mutante und Wildtyp wurden mit IPTG, die andere Hälfte ohne IPTG angezogen. Das IPTG wurde über das Trinkwasser verabreicht, das 25 mM IPTG enthielt. Einen Tag nach der Infektion wurden die Versuchsmäuse getötet und die Keimzahl im Gelfoam wurde durch Ausplattieren auf Agarplatten mit 0,3 mM IPTG bestimmt. Die Anzahl der CFU wurde auf Agarplatten mit 10 µg/ml Tetrazyklin und ohne Tetrazyklin bestimmt. Parallel zu diesem Versuch wurde eine Gruppe von Mäusen mit dem Wildtyp RN4220 (ohne Repressorplasmid pMJ8426) infiziert.

Die Ergebnisse aus den Infektionsexperimenten mit dem Wildtypstamm RN4220 (ohne pMJ8426) zeigen, dass sich die Bakterien im Gelfoam vermehren. Unabhängig davon, ob IPTG im Trinkwasser der Mäuse vorhanden war, wuchsen ca.  $10^6$ - $10^7$  Kolonien je ml Gelfoam-Homogenat heran. Bei Tetrazyklin-Behandlung der Mäuse konnten deutlich weniger Bakterien (ca.  $10^4$  CFU/ml Homogenat) aus dem Gelfoam isoliert werden. Der Wildtyp ist empfindlich gegenüber Tetrazyklin, bei Ausplattierung des Gelfoam-Homogenats auf Tetrazyklin-haltigen Platten wuchsen keine Bakterien (Abb. 47).

In einem weiteren Versuch wurde die Pspac-*ligA*-Mutante und der Wildtyp RN4220 jeweils mit dem Repressorplasmid pMJ8426 für die Infektionsexperimente verwendet. Zur stabilen Vererbung des Plasmides pMJ8426 wurden alle Mäuse mit Tetrazyklin behandelt. Das Wachstum der konditionalen Pspac-*ligA*-Mutante war abhängig von IPTG. In Abwesenheit von IPTG konnte sich keine Infektion im Gelfoam etablieren und es konnten keine Bakterien im Gelfoam nachgewiesen werden. In Gegenwart von IPTG war dagegen eine leichte Zunahme der Bakterien (durchschnittlich ca.  $3 \times 10^4$  CFU/ml Homogenat) zu verzeichnen. Die aus dem Gelfoam isolierten Bakterien waren Tetrazyklin-resistent, das Repressorplasmid pMJ8426 wurde daher in den Bakterien stabil weitervererbt (Abb. 48). Die Vermehrung des Wildstammes *S. aureus* RN4220 mit dem Repressorplasmid pMJ8426 war unabhängig von der Zugabe von IPTG. Ein Gelfoam aus Mäusen, die mit dem Wildtyp (+pMJ8426) infiziert waren, enthielt unabhängig davon ob den Mäusen IPTG verabreicht wurde, durchschnittlich ca.  $1 \times 10^6$  Bakterien je ml Gelfoam-Homogenat. Die Anzahl der aus dem Gelfoam isolierten Bakterien war für Platten mit oder ohne Tetrazyklin dieselbe. Das Plasmid pMJ8426 war auch im Wildtyp stabil weitervererbt worden (Abb. 48).

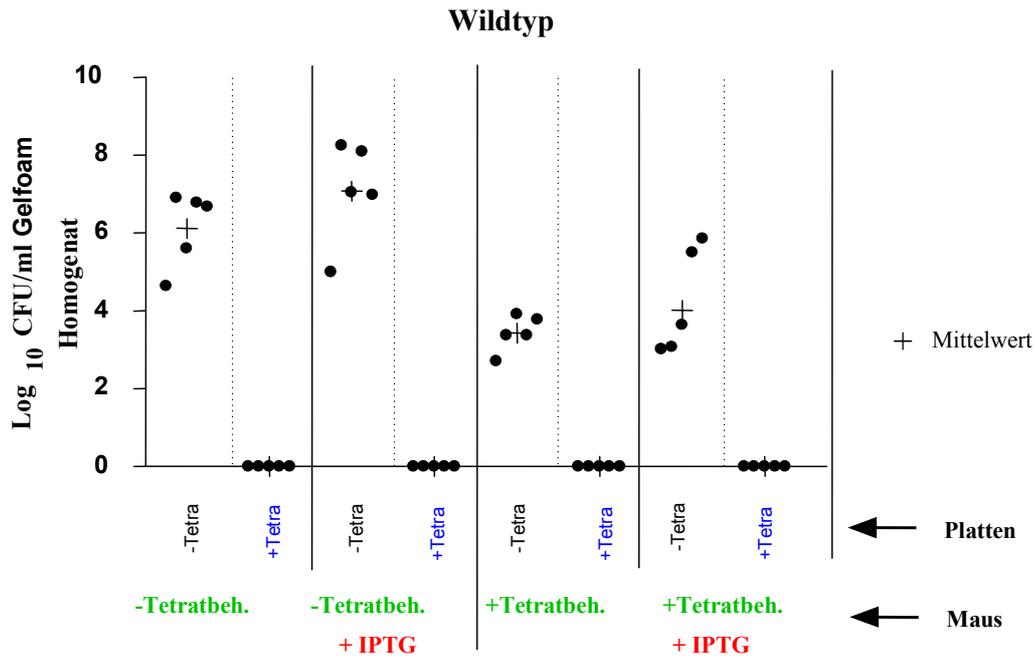


Abb. 47: Einfluss von Tetracyclin-Behandlung und IPTG-Gabe auf die Infektion von *S. aureus* RN4220 Wildtyp im Gelfoam-Modell in Mäusen. Die CFU im Gelfoam wurde ein Tag nach der Infektion bestimmt.

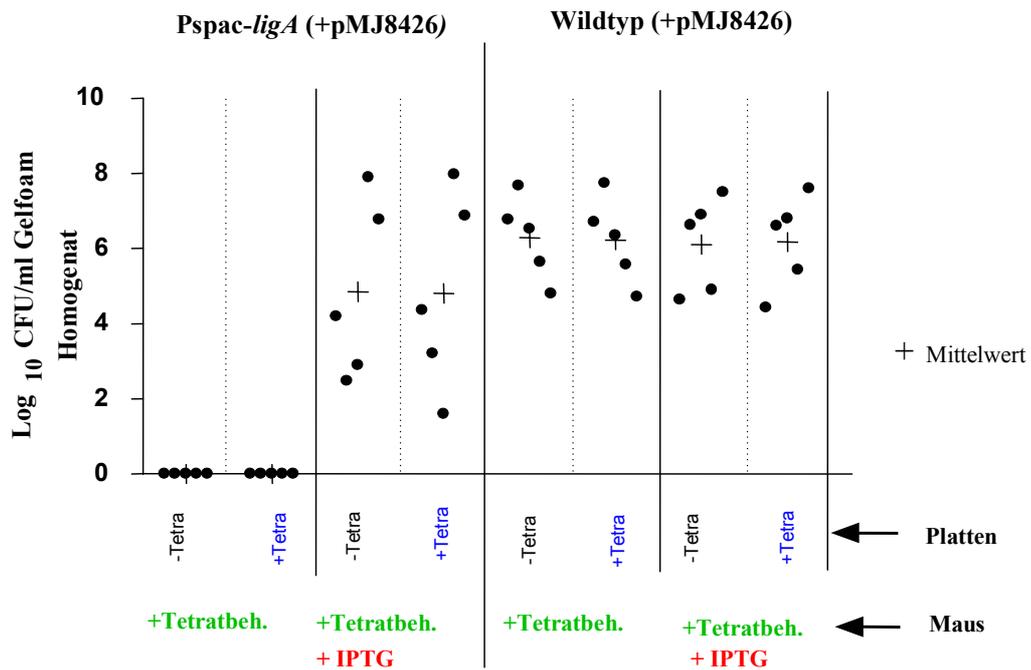


Abb. 48: Einfluss der konditionalen Expression von *ligA* auf das Überleben von *S. aureus* RN4220 im Gelfoam-Modell. Die Mäuse wurden mit der konditionalen Mutante Pspac-*ligA* und dem Wildtyp RN4220 in Gegenwart des Repressorplasmides pMJ8426 infiziert. Über die IPTG-Gabe wurde die Expression des *ligA*-Gens kontrolliert. Die CFU im Gelfoam wurde ein Tag nach der Infektion bestimmt.

### 5.2.4.2 Konditionale Mutation Pspac-*ygbP2* mit pLL30 und pMJ8426

Eine konditionale Mutante des Gens SA0245 (*ygbP2*) wurde ebenfalls hergestellt. Das Gen codiert für eine putative Cytidyltransferase. Von diesem Gen konnte keine Deletionsmutante hergestellt werden. Eine konditionale Mutante in diesem Gen wurde nach der soeben beschriebenen Methode mit dem Pspac/pLL30/pMJ8426-System hergestellt. Zur Klonierung des 5'-Fragmentes mit der RBS wurden die Primer *ygbP2Eco30* und *ygbP2Bam30* verwendet. Das Fragment war 950 bp lang. Ein Fragment upstream des Zielgens *ygbP2* war 973 bp lang und wurde mit den Primern *ygbP2Xho30* und *ygbP2Sal30* amplifiziert. Die Fragmente wurden in den Vektor pLL30 kloniert und in den *S. aureus*-Stamm RN4220 transformiert. Die Vorgehensweise entspricht der für die Herstellung der konditionalen Mutante Pspac-*ligA* beschriebenen (5.2.4.1). Putative Insertionsmutanten der Kassetten *cat-ter-Pspac* wurden im Southern Blot überprüft (Abb. 49). Die Hybridisierung des Blots erfolgte mit den Sonden *ygbP2E/B*, die mit den Primern *ygbP2Eco30* und *ygbP2Bam30* hergestellt wurden, sowie der Sonde *ygbP2X/S*, die mit den Primern *ygbP2Xho30* und *ygbP2Sal30* synthetisiert wurde. Die Primer zur Synthese der *cat*-Sonde waren *cat2* und *cat3*.

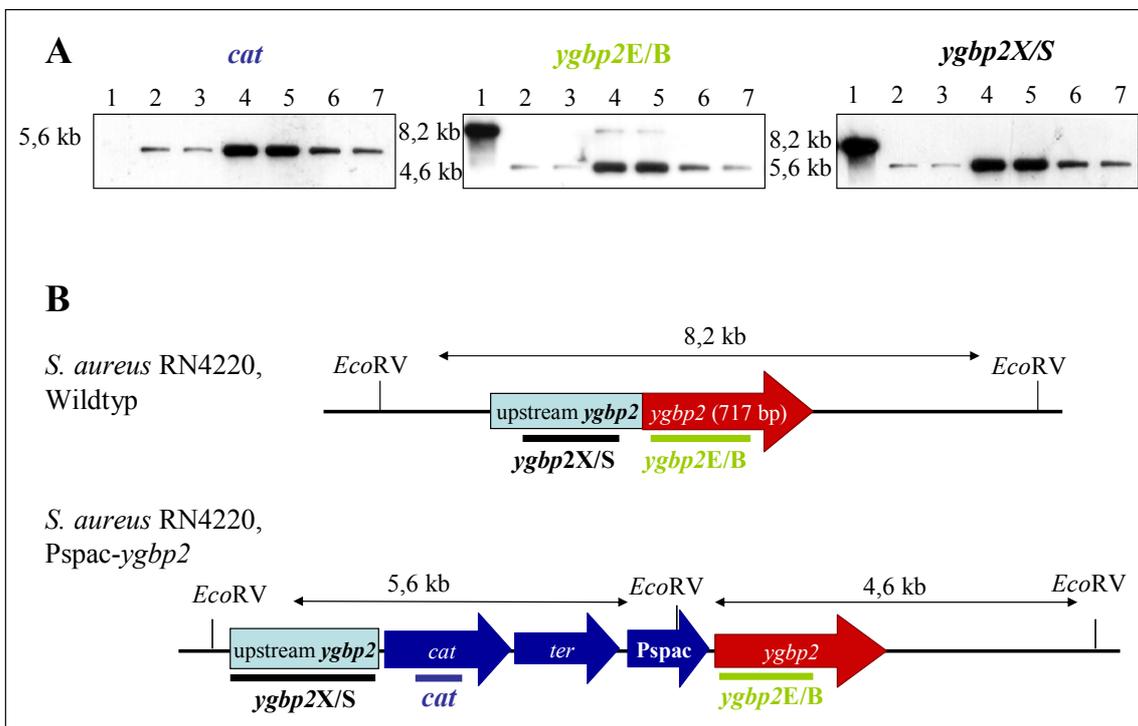


Abb. 49: (A) Southern-Hybridisierungen der Pspac-*ygbP2*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Spur 1: Wildtypische chromosomale DNA aus *S. aureus* RN4220; Spur 2-7: Chromosomale DNA aus *S. aureus* RN4220 Pspac-*ygbP2*. (B) Schematische Darstellung des mutierten Bereichs auf dem Chromosom. Die chromosomale DNA der Mutanten und des Wildtyp-Stammes wurde mit dem Enzym *EcoRV* gespalten. Die Bereiche mit denen die verwendeten Sonden in (A) hybridisieren sind durch einen Balken gekennzeichnet. Die Größen der erwarteten Signale im Southern Blot sind angegeben. Die Sonde *ygbp2E/B* hybridisiert auch mit dem zu 75 % identischen Gen *ygbp1* (SA0241). Bei hoher DNA Konzentration auf dem Southern Blot zeigt sich daher eine zweite Bande bei 8,1 kb (Spur 4 und Spur 5).

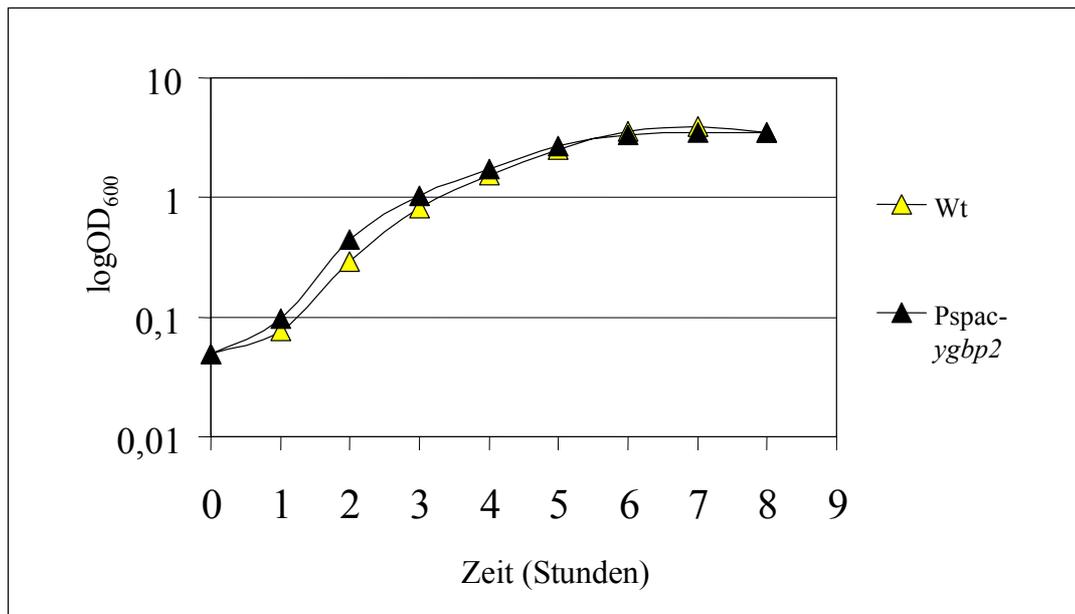


Abb. 50: Wachstumskurve des Wildtyps (Wt) *S. aureus* RN4220 verglichen mit der isogenen Pspac-ygbP2-Mutante, in der *ygbP2* konstitutiv exprimiert wird. Die Wachstumskurve wurde bei 37°C in LB-Medium unter Schütteln durchgeführt.

Das Wachstum der Pspac-ygbP2-Mutante, die *ygbP2* konstitutiv exprimiert, zeigte keine Unterschiede im Wachstum verglichen mit dem isogenen Wildtyp *S. aureus* RN4220 (Abb. 50). Zur Kontrolle der Expression von *ygbP2* in der Mutante Pspac-ygbP2 wurde das Repressorplasmid pMJ8426 in den *S. aureus*-Stamm RN4220 Pspac-ygbP2 transformiert. In Gegenwart des Repressors LacI ist das Wachstum der Pspac-ygbP2-Mutante vom Induktor IPTG abhängig. Für die Wachstumskurve wurde eine Übernachtskultur der Mutante sowie des Wildtyps mit Repressorplasmid pMJ8426 in Gegenwart von 5 µg/ml Tetrazyklin sowie 0,3 mM IPTG angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen mit einer  $OD_{600}$  von 0,015 in frischem LB-Medium angeimpft. Alle Kulturen wurden mit 5 µg/ml Tetrazyklin kultiviert. Unterschiedliche Konzentrationen von IPTG wurden zu der konditionalen Mutante Pspac-ygbP2 (mit pMJ8426) zugegeben. Der Wildtyp wurde in Gegenwart von 0,3 mM IPTG oder ohne IPTG kultiviert. Das Wachstum der konditionalen Mutante Pspac-ygbP2 (+pMJ8426) war abhängig von IPTG, dagegen war das Wachstum des Wildtyps (+ pMJ8426) unabhängig von der Zugabe des Induktors (Abb. 51). Da das Wachstum der Pspac-ygbP2-Mutante in Gegenwart von LacI abhängig von IPTG ist, könnte das Produkt von *ygbP2* essentiell für das Wachstum der Bakterien unter den getesteten Bedingungen sein.

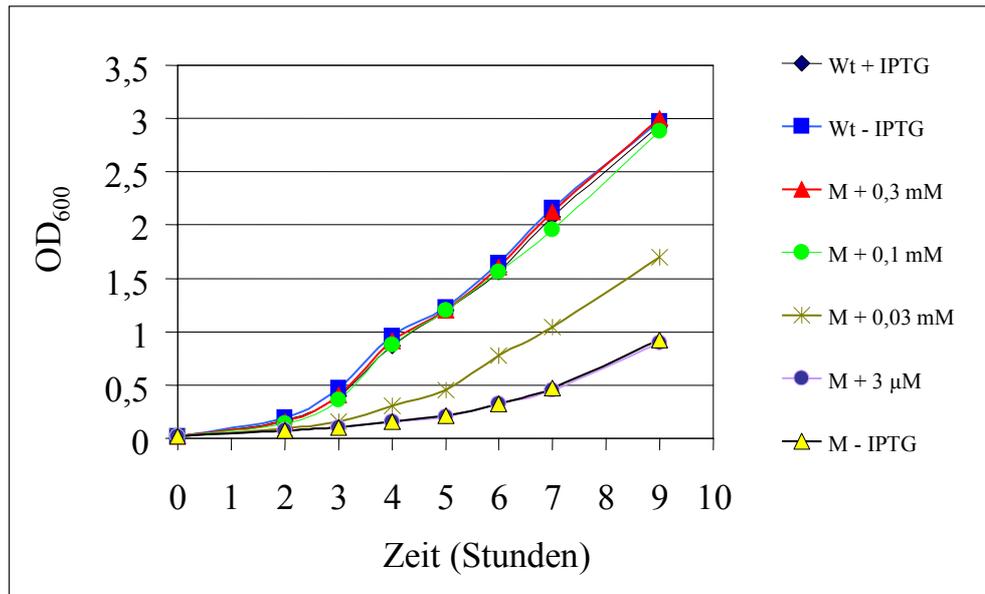


Abb. 51: Wachstumskurven der konditionalen Mutante *S. aureus* RN4220 Pspac-ygbP2 (M) und des Wildtyps *S. aureus* RN4220 (Wt) in Gegenwart des Repressorplasmids pMJ8426 bei 37°C in LB-Medium ohne IPTG oder in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an IPTG.

Das Wachstumsverhalten der Pspac-ygbP2-Mutanten (mit pMJ8426) wurde außerdem auf Agarplatten analysiert. Die Bakterien wurden auf LB-Agar in Gegenwart von 10 µg/ml Tetrazyklin mit oder ohne IPTG ausgestrichen. Auch auf Agarplatten war das Wachstum der konditionalen Mutante von IPTG abhängig (Abb. 52). Nur wenige Einzelklone konnten ohne Zugabe von IPTG wachsen.

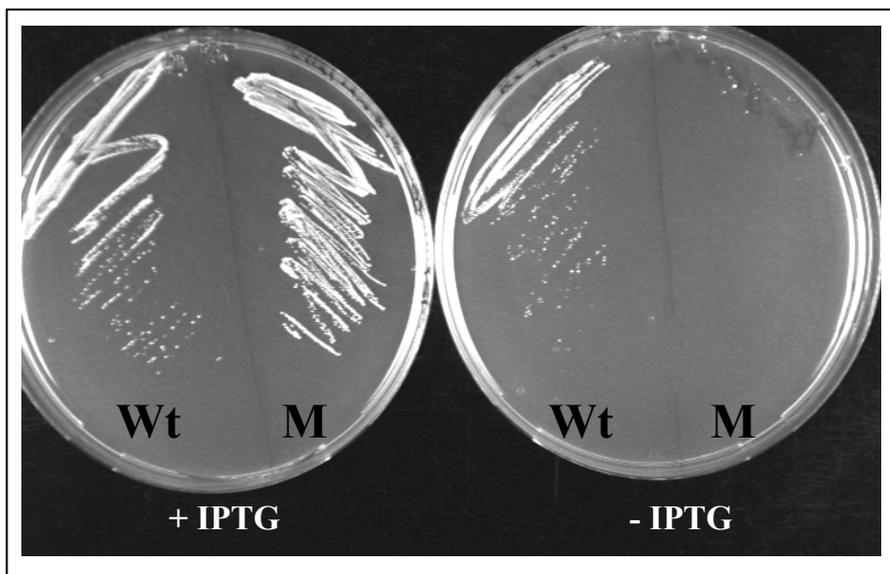


Abb. 52: Wachstum der Pspac-ygbP2-Mutante und des Wildtyps in Gegenwart des Repressorplasmides pMJ8426. Die Bakterien wurden auf LB-Agar mit 10 µg/ml Tetrazyklin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Den Platten war entweder 0,3 mM IPTG zugesetzt worden oder keine weiteren Zusätze waren enthalten. **Wt**: *S. aureus* RN4220 Wildtyp (+ pMJ8426); **M**: *S. aureus* RN4220 Pspac-ygbP2 (+ pMJ8426).

### 5.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 5.2

- Das konditionale Expressionssystem pLL30/Pspac/pMJ8426 erwies sich als erfolgreich. Die Insertion des Pspac-Promotors vor dem Zielgen durch ein doppeltes Crossover-Ereignis ist stabil. Die Insertion des Pspac-Promotors vor dem Zielgen kann nach Amplifikation des Vektors pLL30 in *S. aureus* erfolgen. Durch die erhöhte Menge des Vektor-Insert-Konstrukts erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein doppeltes Crossover-Ereignis zwischen den homologen Sequenzen auf dem Vektor pLL30 und dem Chromosom stattfindet. Die Expression des Repressors LacI von einem Plasmid pMJ8426 ermöglicht die Synthese großer Mengen des Repressors und eine effiziente Repression an Pspac. Das konditionale Expressionssystem kann außerdem im Tierversuch verwendet werden.
- Die konditionale Gen-Expression mit Hilfe des Xylose-Regulons war zur Analyse essentieller Gene ungeeignet, da vermutlich die basale Expression an *xyIP/O* im reprimierten Zustand zu hoch ist und die Gen-Expression nicht vollständig unterdrückt werden kann. Außerdem findet die Insertion des Xylose-Regulons vor dem Zielgen durch ein Single-Crossover-Ereignis des Vektors pBT2-*xyIR* statt. Die Insertion des kompletten, replikationsfähigen Vektors erwies sich als instabil.
- Mit Hilfe des konditionalen Expressionssystems pMUTIN4/Pspac konnten keine Mutanten erhalten werden. Da der Vektor pMUTIN4 nicht in *S. aureus* replizieren kann, muss sofort nach der Transformation die Integration des Vektors vor dem Zielgen erfolgen. Sowohl die Transformationseffizienz als auch die Rekombinationshäufigkeit in *S. aureus* war zu gering, um Mutanten zu erhalten.
- Durch die Expression von Antisense-RNA, die entweder zum *ligA* Transkript oder zum *dnaE* Transkript komplementär war, wurde das Wachstum der entsprechenden Mutanten nicht beeinflusst. Sowohl Menge als auch Stabilität der Antisense-RNA sind vermutlich für die Wirkung der Antisense-RNA maßgebend.

## 6. Diskussion

*S. aureus* ist ein bedeutender Krankheitserreger, der sich durch hohe Anpassungsfähigkeit und schnelle Resistenzentwicklung auszeichnet. Problematisch ist die Behandlung von nosokomialen *S. aureus* Infektionen in immungeschwächten Patienten. In Krankenhäusern hat sich eine *S. aureus* Population etabliert, die gegen eine Vielzahl von Antibiotika resistent ist. Das Auftreten von multiresistente MRSA mit gleichzeitig hoher Vancomycin-Resistenz im Jahr 2002 macht deutlich, dass die Entwicklung neuer wirksamer Antibiotika dringend notwendig ist (Miller et al., 2002a; Sievert et al., 2002). In dieser Arbeit wurde ein erster Versuch unternommen, Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Antibiotika zu finden. Bisherige Antibiotika greifen in die Proteinsynthese, den Nucleinsäurestoffwechsel oder die Zellwandsynthese der Bakterien ein. In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen Zielstrukturen des Nucleinsäurestoffwechsels (*polA*, *topB*, *nusG*, SA1444) untersucht, zum anderen wurden weitere Zielstrukturen mit anderen Funktionen ausgewählt, darunter Gene mit putativer Funktion in der Isopren-Biosynthese (SA0241, SA0245, SA0453), eine Oxidoreduktase (SA0367), eine Ser/Thr-Kinase (SA1063) sowie ein Nucleotidbindeprotein (SA1857).

### 6.1 Deletionsmutanten

#### 6.1.1 Charakterisierung der Oxidoreduktase NfrA

Das NfrA-homologe Gen ist in *S. aureus* nicht essentiell, da es in dieser Arbeit durch die *ermB*-Kassette ersetzt werden konnte. Im Gegensatz zu *B. subtilis* und *E. coli* ist das NfrA homologe Gen in *S. aureus* nicht in einem Operon codiert, sondern wird monocistronisch transkribiert. In *B. subtilis* liegt *nfrA* in einem Operon *nfrA-ywcH* vor. Das Gen YwcH codiert für eine putative Monooxygenase. In *E. coli* wird *nfrA* in einem Operon mit dem Gen *ybjC* transkribiert, das upstream von *nfsA* liegt und dessen Funktion unbekannt ist.

Da die Funktion des NfrA-Proteins in *S. aureus* noch nicht beschrieben wurde, wurden zunächst Induktionsexperimente mit verschiedenen Stressoren durchgeführt. In *B. subtilis* wurde das Gen durch oxidativen Stress, wie Peroxidstress und Superoxidstress (Paraquat) sowie durch Hitze induziert (Mostertz et al., 2004; Moch et al., 2000). Auch in *E. coli* wird das *nfrA* homologe Gen *nfsA* durch Superoxidstress induziert (Liochev et al., 1999; Paterson et al., 2002). Die Expression von *nfrA* konnte in *S. aureus* 8325 nur geringfügig

durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert werden. Bei einer Konzentration von 7,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte keine Induktion von NfrA beobachtet werden. Erst bei Konzentrationen von 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fand eine leichte 4-fache Induktion von NfrA statt (RT-PCR). Diese hohe Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einem etwa 20-minütigen Wachstumsstopp, bevor die Bakterien mit gleicher Wachstumsrate wie vor der Stresseinwirkung weiter wuchsen. Im Vergleich dazu genügt in *B. subtilis* eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 0,058 mM, um eine Induktion der *nfrA*-Gen-Expression von etwa 8-fach zu erhalten (Microarray, Mostertz et al., 2004). Die Ursache für die besondere Resistenz von *S. aureus* gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> könnte die sehr potente Katalase sein, die in *S. aureus* in großen Mengen gebildet wird und zu einer raschen Neutralisation des Wasserstoffperoxids führt. Diese extreme Resistenz von *S. aureus* wurde bereits von anderen Gruppen beschrieben. Weber et al. (2004) verwendeten 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im *S. aureus* Stamm COL, um oxidativen Stress zu induzieren. Nach einem Wachstumsstopp von 30 min wuchsen die Bakterien mit normaler Wachstumsrate weiter. Die zum PerR-Regulon gehörenden, oxidativen Stress-Resistenzgene, z. B. AhpC (Alkylhydroperoxid Reduktase) wurden unter diesen Bedingungen innerhalb der ersten 10 min nicht induziert. Die Aktivität der Katalase (KatA) nahm während der ersten 30 min sogar leicht ab (Weber et al., 2004). Horsburgh et al. (2001) konnte jedoch eine leichte Zunahme von *katA* (zweifach) und *ahpC* (dreifach) nach Zugabe von 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in dem Stamm *S. aureus* 8325-4 verzeichnen, dabei wurden Promotor-*lacZ* Fusionen der entsprechenden Gene verwendet. Im Gegensatz dazu war bei Transkriptom-Analysen in *B. subtilis* nach Zugabe von 0,058 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine starke Induktion Stress-relevanter Gene zu verzeichnen, z. B. das Gen *ahpC* wurde 17-fach induziert, *katA* 145-fach und *nfrA* 8-fach (Mostertz et al., 2004). Insgesamt zeigt *B. subtilis* im Vergleich zu *S. aureus* eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und eine deutlichere Stressantwort auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chan et al., 1998; Mostertz et al., 2004; Horsburgh et al., 2001; Weber et al., 2004).

Sehr viel stärker war die Induktion von *nfrA* in *S. aureus* bei Behandlung mit Diamide und Nitrofurantoin. Beide Substanzen lösen oxidativen Stress aus. Diamide ist ein spezifisches Oxidant für Thiole und verursacht Disulfid-Brücken Bildung. Disulfid-Stress kann als eine Unterkategorie von oxidativem Stress gewertet werden, da ein Haupteffekt von reaktiven Sauerstoffradikalen die Bildung von Disulfidbrücken ist (Leichert et al., 2003; Uziel et al., 2004). Nitrofurantoin verursacht ebenfalls oxidativen Stress, da es die Bildung von Sauerstoffradikalen bewirkt. Nitrofurantoin wird durch zelluläre Enzyme zum freien Radikal reduziert. In Gegenwart von Sauerstoff kommt es zur Bildung von

Superoxidradikalen und zur Regenerierung des Nitrofurantoin-Moleküls (Peterson et al., 1979). Zusätzlich wurde kürzlich in Proteom-Analysen gezeigt, dass Diamide und Nitrofurantoin ein ähnliches Proteinmuster induzieren. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Nitrofurantoin auch Disulfid-Stress auslöst (Bandow et al., 2003). Diamide bewirkte eine 5-fache Induktion des *nfrA*-Transkripts bereits nach 5 min. Durch Nitrofurantoin wurde das Transkript in dieser Zeit um etwa das 3-fache induziert. Besonders deutlich war die Induktion nach 20 min, bei Diamide 15-fach und bei Nitrofurantoin 8-fach. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass NfrA an der Reduktion oxidierter, denaturierter Proteine beteiligt ist. Auch Ethanol bewirkt eine starke Induktion der Transkription von *nfrA*. Es ist anzunehmen, dass die Einwirkung von Ethanol in der Zelle ebenfalls zu denaturierten Proteinen führt (Mogk et al., 1998; Hecker et al., 1998).

SigmaB ist häufig an der oxidativen Stress Antwort in *S. aureus* beteiligt (Gertz et al., 2000; Horsburgh et al., 2002; Kullik und Giachino, 1997). Die Induktion von *nfrA* ist nicht unter der Kontrolle des alternativen Sigma-Faktors  $\sigma^B$ . Dafür sprechen mehrere Beobachtungen: (i) Die Induktion von *nfrA* durch Ethanol fand auch in einer  $\sigma^B$ -Deletionsmutante statt (MA12.2), (ii) Primer Extension-Experimente ergaben, dass die Transkription von *nfrA* an einem SigmaA abhängigen Promotor beginnt. In der Promotor-Region konnte außerdem eine Sequenz identifiziert werden, die der *perR*-Box ähnelt. Die putative *perR*-Box (TTCAATTATTA~~ACTT~~) befindet sich 12 nt upstream der -35 box des Promotors und stimmt in 9 nt mit der Konsensussequenz der *perR*-Box (TAtAATTATTATaA) überein. Die Mitglieder des PerR-Regulons werden durch oxidativen Stress, insbesondere durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert (Horsburgh et al., 2001). Jedoch sind nicht alle Mitglieder des PerR-Regulons durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierbar. Die Transkription des Gens *trxB* (Thioredoxin Reduktase) wird nicht durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, jedoch durch Diamide, Menadion und durch das organische Peroxide  $\tau$ -Butyl Hydroperoxide induziert (Uziel et al., 2004). Ein ähnliches Induktionsmuster zeigt *nfrA*, das nur geringfügig durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert wurde, jedoch in Gegenwart von Diamide besonders stark transkribiert wird. Analysen mit einer PerR-Deletionsmutante könnten Aufschluss darüber geben, ob der PerR-Repressor bei der Induktion der Transkription von *nfrA* eine Rolle spielt.

Die Regulation der Expression von *nfrA* in *B. subtilis* ist nicht geklärt. Moch et al. (1998) identifizierten SigA, SigB- und SigD- spezifische putative Promotor-Sequenzen upstream des *nfrA*-Gens. Jedoch findet die Hitze-Induktion von *nfrA* auch in einer SigB-, SigD-

sowie in einer CtsR- und HrcA-Deletionsmutante statt. Die Regulation von *nfrA* durch oxidativen Stress wurde in *B. subtilis* nicht untersucht.

In *E. coli* wird das *nfrA*-homologe Gen *nfsA* ebenfalls durch oxidativen Stress induziert. In *E. coli* gehört *nfsA* zum SoxRS-Regulon. Die Oxidoreduktase NfsA reduziert ein breites Spektrum an Substratmolekülen in Gegenwart von NADPH. Der Co-Faktor FMN ist eng mit dem Enzym NfsA verbunden und könnte für den Elektronentransfer zu den verschiedenen Substraten, wie organische Nitroverbindungen, Quinonen, Azo-Farbstoffen, Eisencyanid und Chromat wichtig sein (Zenno et al., 1996, Ackerley et al., 2004). Untersuchungen des Proteins NfrA von *S. aureus* zeigten, dass es sich bei diesem Enzym ebenfalls um eine NADPH-Oxidase handelt und FMN als Substrat bzw. als Co-Faktor des Enzyms dient. In Gegenwart von NADH anstelle von NADPH oder FAD anstelle von FMN konnte keine Enzymreaktion beobachtet werden. Auch in *B. subtilis* codiert NfrA für eine FMN enthaltende NADPH- Oxidase (Moch et al., 1998). Weitere Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von NfrA aus *S. aureus* ergaben, dass auch dieses Enzym, in Analogie zu NfsA aus *E. coli*, ein breites Spektrum an Substratmolekülen hat. NfrA reduzierte organische Nitroverbindungen, wie Nitrofurazon und Nitrofurantoin, als auch Eisencyanid. Außerdem konnte eine leichte Disulfid-Reduktase Aktivität von NfrA festgestellt werden, da das Disulfid DTNB durch NfrA zu dem Thiol TNB gespalten wurde. Für alle enzymatischen Reaktionen war die Zugabe des Cofaktors FMN essentiell. Spektrophotometrische Untersuchungen des aufgereinigten Proteins NfrA ergaben, dass das Protein ohne den Cofaktor FMN vorlag. Im Gegensatz zu dem Protein NfsA aus *E. coli* scheint der Cofaktor FMN nur locker an NfrA gebunden zu sein und war während des Aufreinigungsprozesses verloren gegangen.

Das Enzym NfsA von *E. coli* codiert für die Haupt-Nitroreduktase in diesem Organismus (McCalla et al., 1978; Zenno et al., 1996). Nitroreduktasen sind Enzyme, die organische Nitroverbindungen reduzieren, wie Nitrofurane, Nitropyrene und Nitrobenzene. Durch die enzymatische Reduktion dieser Nitroverbindungen entstehen toxische Substanzen, die mutagen und cancerogen sind, wie Nitrosoverbindungen und die entsprechende Hydroxylamin-Derivate (Asnis, 1957; McCalla et al., 1970; Merino et al., 2000). Falls das Enzym fehlt, das die Reduktion der Nitrogruppe katalysiert, ist die Nitroverbindung weniger toxisch. Bakterien, die Mutationen im Nitroreduktasegen *nfsA* trugen, weisen eine

erhöhte Resistenz gegenüber Nitrofuranen, wie Nitrofurantoin, auf (McCalla et al., 1970, McCalla et al., 1978; Whiteway et al., 1998; Kobori et al., 2001).

Die Deletion von *nfrA* in *S. aureus* erhöhte ebenfalls die Resistenz dieses Bakteriums gegenüber Nitrofurantoin. Dieses Ergebnis bestätigt, dass auch *nfrA* in *S. aureus* Nitroreduktase-Aktivität besitzt. Allerdings erhöhte sich die Resistenz gegenüber Nitrofurantoin in der Deletionsmutante nur geringfügig. Die MHK im Wildtyp betrug 4 µg/ml, die MHK in der  $\Delta nfrA$ -Mutante betrug dagegen 8 µg/ml. In *E. coli* erhöhte sich die Resistenz gegenüber Nitrofurazon, z. B. in einer Transposon-Insertionsmutante (IS186) in *nfsA* gegenüber dem Wildtyp um das dreifache von 5 µg/ml auf 15 µg/ml (McCalla et al., 1978; Whiteway et al., 1998).

Die biologische Bedeutung der Nitroreduktasen ist allerdings ungewiss. Vermutlich handelt es sich bei der Reduktion von Nitrofurantoin nicht um die eigentliche vom Enzym katalysierte Reaktion, sondern um eine schädliche Nebenreaktion. Auch andere zelluläre Enzyme zeigen eine enzymatische Aktivität gegenüber Nitrofurantoin. Zum Beispiel katalysieren die Xanthin-Oxidase sowie die Ferredoxin-(Cytochrom C)-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase die Reduktion von Nitrofurantoin zum freien Radikal. Unter aeroben Bedingungen unterliegt das Nitrofurantoin-Radikal der Oxidation mit Sauerstoff wobei das Ausgangsmolekül Nitrofurantoin wieder hergestellt wird und Superoxid entsteht (Youngman et al., 1982; Miller et al., 2002b). Liochev et al. (1999) schlagen vor, dass die Nitroreduktase NfsA die Zelle vor dieser schädlichen univalenten Reduktion durch diese Enzyme (z. B. Xanthin-Oxidase) schützen kann, indem die Sauerstoff-unempfindliche Nitroreduktase die divalente Reduktion der organischen Verbindung katalysiert und damit der Entstehung von Superoxid-Radikalen entgegen wirkt. Eine andere Überlegung wäre, dass unter besonderen oxidativen Stress-Bedingungen eine Oxidation von Aminogruppen (-NH<sub>2</sub>) zu Nitrogruppen (-NO<sub>2</sub>) stattfindet (Corbett et al., 1980; Fukuto et al., 1985). Die Rolle von Nitroreduktasen bei der Bewältigung von oxidativem Stress könnte die Reduktion dieser Nitrogruppen sein.

Das Enzym NfrA ist eine FMN-enthaltende NADPH-Oxidoreduktase, die hauptsächlich an der Bewältigung von oxidativem Stress beteiligt zu sein scheint. Eine mögliche Aufgabe von NfrA könnte die Renaturierung oxidierten Proteine und die Reduktion von Disulfidbrücken sein. In einem entsprechenden Enzymassay wurde nachgewiesen, dass NfrA die

Reduktion des Disulfides DTNB zum Thiol TNB katalysieren kann. NfrA könnte an der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten unter oxidativem Stress beteiligt sein und außerdem direkt an der Reduktion geschädigter Proteine teilnehmen. Dafür spricht sowohl die Nitroreduktase-Aktivität als auch die Disulfidreduktase-Aktivität von NfrA. Außerdem wird *nfrA* in allen Wachstumsphasen exprimiert und könnte auch allgemein an der Aufrechterhaltung des NADP<sup>+</sup>/NADPH Gleichgewichts in der Zelle beteiligt sein.

### 6.1.2 Charakterisierung der Ser/Thr-Kinase PknB (SA1063)

Das Gen SA1063 zeigt hohe Homologie zu Ser/Thr-Kinasen. Die Aminosäure-Sequenz von SA1063 ist zu 37 % identisch zur Ser/Thr-Kinase PrkC aus *B. subtilis*, zu 31 % identisch mit der Ser/Thr-Kinase Stk1 aus *Streptococcus agalactiae* und zu 30 % identisch mit der Ser/Thr-Kinase PknB aus *Mycobacterium tuberculosis* (Av-Gay et al., 1999; Boitel et al., 2003; Rajagopal et al., 2003). Alle vier Kinasen weisen eine typische intrazelluläre N-terminale Kinase-Domäne auf, gefolgt von einer Transmembran-Domäne und einer großen C-terminalen extrazellulären Domäne. Generell fällt auf, dass ein sehr hoher Anteil der prokaryotischen Ser/Thr-Kinasen putative Transmembran-Domänen aufweisen. Zum Beispiel sind 9 der 13 bekannten Ser/Thr-Kinasen in *M. tuberculosis* Transmembranproteine mit extrazellulärer Domäne. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass diese Kinasen Rezeptoren oder Sensoren für bislang unbekannte Signale darstellen (Bakal and Davies, 2000).

In Bakterien, die putative Ser/Thr-Kinasen enthalten, lassen sich auch entsprechende Ser/Thr-Phosphatasen nachweisen (Shi et al., 1998). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wird das Gen SA1063 gemeinsam mit einer putativen Ser/Thr-Phosphatase, SA1062, transkribiert. Diese Verbindung einer Ser/Thr-Phosphatase direkt benachbart zu einer Ser/Thr-Kinase lässt sich durch Blast-Analysen in mehreren Bakterien nachweisen, wie z.B. *Bacillus halodurans*, *B. subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Streptomyces coelicolor* sowie in vielen pathogenen Keimen wie *Listeria innocua* und *L. monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Clostridium acetobutylicum*. Auch die Aminosäuresequenz dieser Proteinpaare ist hoch konserviert und liegt zwischen 25 %-68 % Sequenz-Identität für die Ser/Thr-Kinasen und zwischen 25 %-54 % Sequenz-Identität für die Ser/Thr-Phosphatasen (Madec et al., 2002). Für die Bakterien *B. subtilis*, *S. agalactiae* und *P. aeruginosa* wurde die gemeinsame Transkription der Ser/Thr-Kinase und der Ser/Thr-Phosphatase in einem Operon bereits experimentell bestätigt (Madec et al., 2002; Rajagopal et al., 2003; Mukhopadhyay et al., 1999). Zwar ist die biologische Funktion

dieser Proteinpaare noch unbekannt, jedoch kann man vermuten, dass die Kinase und Phosphatase gemeinsam eine regulatorische Funktion ausüben.

Der C-terminale Bereich des Proteins SA1063 liegt auf der extrazellulären Seite der Cytoplasmamembran und weist mehrere PASTA-Domänen (Penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated domain) auf (Yeats et al., 2002). Das Protein PknB aus *M. tuberculosis* zeigt 4 putative PASTA-Domänen, in SA1063 sind dagegen nur 3 PASTA Domänen vorhanden. Drei extrazelluläre putative PASTA-Domänen lassen sich auch in den homologen Proteinen PrkC und Stk1 aus *B. subtilis* bzw. *S. agalactiae* nachweisen (Boitel et al., 2003; BLAST-Search). Die extrazelluläre PASTA-Domänen binden vermutlich an den  $\beta$ -Lactamring entsprechender Antibiotika. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass der  $\beta$ -Lactamring von Cefuroxime mit der PASTA-Domäne des PBP2X aus *Streptococcus pneumoniae* über van der Waals-Kräfte in Wechselwirkung tritt (Gordon et al., 2000). Es liegt daher nahe, dass die PASTA-Domäne auch an  $\beta$ -Lactamring analoge Bereiche der Zellwand (D-Alanyl-D-Alanin) bindet. Die PASTA-Domänen könnten als Sensor für noch unverknüpfte Peptidoglykan-Vorläufermoleküle dienen. Bei einer erhöhten Konzentration an unverknüpften Muropeptidmonomeren könnten Kinasen mit PASTA-Domänen, z.B. SA1063, der Zelle signalisieren weitere Penicillin-Bindeproteine zur Zellwandsynthese zu synthetisieren, oder den Biosynthesekomplex an die Stelle der noch unverknüpften Muropeptidmonomere lenken (Yeats et al., 2002). Ein experimenteller Hinweis für die Beteiligung von SA1063 an der Zellwandsynthese liefern MHK-Experimente. Die Deletion von SA1063 in *S. aureus* führt zu einer verminderten Methicillin-Resistenz im Vergleich zum isogenen Wildtyp. Eine verringerte Methicillin-Resistenz wird oft durch Mutationen in Genen hervorgerufen, die bei der Zellwandsynthese beteiligt sind oder bei der allgemeinen Stress-Antwort eine Rolle spielen (De Lencastre et al., 1999).

Microarray-Experimente zeigen außerdem, dass die Deletion von SA1063 eine veränderte Expression von Genen zur Folge hat, die bei der Zellwandsynthese eine Rolle spielen. Die Gene *vraR*, *vraS*, *prsA*, *sgtB*, *murW*, *murZ*, die bei der Zellwandsynthese beteiligt sind, werden in der SA1063-Deletionsmutante im Vergleich zum isogenen Wildtyp verstärkt exprimiert. Möglicherweise kann SA1063 die extrazelluläre Konzentration an Muropeptidvorläufern über die PASTA-Domäne im Protein (über D-Ala-D-Ala) messen und die Zellwandbiosynthese-Maschinerie darauf einstellen. In Abwesenheit von SA1063

kann die Menge der Muropeptidvorläufermoleküle nicht mehr gemessen werden. Die Zellwand könnte sich verdünnen, wenn die Muropeptidmonomere nicht mehr effektiv in die Zellwand eingebaut werden. Die Induktion der Expression von *VraS* und *VraR* könnte als Reaktion auf eine geschwächte Zellwand erfolgen. Die Gene *vraR* und *vraS* werden in einem Operon transkribiert und codieren für ein Zweikomponentensystem, bestehend aus dem Sensor, der Histidin-Kinase *VraS* (vancomycin-resistance associated sensor) in der Bakterienmembran, und dem Response-Regulator *VraR* (vancomycin-resistance associated regulator). Kuroda et al. (2003) spekulieren, dass das *VraSR* System dazu dient geschädigte Zellwandstrukturen oder die Hemmung der Zellwandsynthese wahrzunehmen. Das *VraSR* System wird außerdem durch verschiedene Antibiotika induziert, die die Zellwand-Synthese hemmen, wie Vancomycin, Teicoplanin und  $\beta$ -Lactam Antibiotika (Kuroda et al., 2003). Die Aktivierung des *VraSR*-Systems steht in Verbindung mit einer verstärkten Zellwandsynthese. Im Microarray lässt sich erkennen, dass die Abwesenheit der Ser/Thr-Kinase SA1063 Gene induziert, die zum *VraSR*-Regulon gehören. Neben *vraS* und *vraR* werden auch die Gene *sgtB*, das für eine monofunktionelle Glykosyltransferase codiert, *prsA*, das für eine Peptidyl-Prolyl Isomerase codiert, sowie Gene unbekannter Funktion wie SA0536, SA1476, SA1702 und SA1703 in der SA1063-Deletionsmutante verstärkt exprimiert. Dagegen ist die Expression von *atl*, einem Autolysin, in der Deletionsmutante  $\Delta$ SA1063 weniger stark exprimiert. Falls der Verlust der Ser/Thr-Kinase SA1063 zu einer Verdünnung und Schwächung der Zellwand führt, würde eine verstärkte Expression von Genen, die an der Zellwand-Neusynthese beteiligt sind wie *vraR*, *vraS*, *prsA*, *sgtB*, *murW*, *murZ* und eine verringerte Expression an Zellwand-abbauenden Enzymen wie *atl* Sinn machen. Für eine geschwächte Zellwandsynthese in der  $\Delta$ SA1063-Mutante spricht auch die verringerte Expression der Gene der Purin-Ribonukleotid-Biosynthese, da für die Zellwandsynthese Energie in Form von ATP benötigt wird (Mongodin et al., 2003). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der SA1063-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp könnte Klarheit schaffen, ob sich die Zellwanddicke in der Deletionsmutante verändert.

Die Lichtmikroskopische Betrachtung der SA1063-Deletionsmutante ließ keine Unterschiede der Bakterienzellen im Vergleich zum Wildtyp erkennen. Außerdem wurden viele Gene, die eine wichtige Funktion bei der Zellwandsynthese haben, wie z.B. *pbp2*, *pbpA*, *pbp3* und *pbp4*, in der Deletionsmutante  $\Delta$ SA1063 nicht verändert exprimiert. Es ist möglich, dass die Funktion von SA1063 durch eine andere Ser/Thr-Kinase übernommen

werden kann. Eine weitere putative Ser/Thr-Kinase SA0077 könnte die fehlende ersetzen. Allerdings zeigt SA0077 nur eine geringe Homologie von 24 % zu SA1063. Anhand der Microarray-Daten ist außerdem keine verstärkte Expression von SA0077 in der  $\Delta$ SA1063-Mutante zu erkennen.

Die Deletionsmutante in SA1063 weist sowohl im *S. aureus* Stamm 8325 als auch im Stamm COL eine verringerte MHK gegenüber Methicillin auf. Die Empfindlichkeit gegenüber anderen Zellwand-aktiven Antibiotika wie Teicoplanin und Vancomycin änderte sich in der  $\Delta$ SA1063-Mutante im *S. aureus* Stamm 8325 nicht. Eine minimal verringerte Resistenz gegenüber Teicoplanin war in der  $\Delta$ SA1063-Mutante im *S. aureus* Stamm COL zu sehen. Dagegen zeigen Deletionsmutanten des *VraSR* Systems eine erhöhte Empfindlichkeit sowohl gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika als auch gegenüber Glykopeptiden. Außerdem ist eine Induktion des *VraSR*-Operons bei Behandlung der Zellen mit der 10-fachen MHK dieser Antibiotika zu sehen (Kuroda et al., 2003). Eine Induktion von SA1063 im Wildtyp *S. aureus* 8325 nach Behandlung mit der 4-fachen MHK von Methicillin, war jedoch nicht festzustellen. Möglicherweise ist die Ser/Thr-Kinase bereits in ausreichenden Mengen in der Cytoplasmamembran vorhanden. Der Kontakt mit Methicillin könnte so zu einer Aktivierung der Kinase führen, eine Regulation der Kinase SA1063 auf transkriptioneller Ebene wäre dann nicht nötig.

Die Deletionsmutante *S. aureus*  $\Delta$ SA1063 zeigt keinen Wachstumsdefekt. Die Deletion der Ser/Thr-Kinase PrkC aus *B. subtilis*, deren Aminosäuresequenz zu 37 % identisch ist mit SA1063, zeigt ebenfalls keinen Wachstumsdefekt. Auch zeigen Zellen der  $\Delta$ *prkC*-Mutanten aus *B. subtilis* keine veränderte Morphologie. Jedoch wurde nachgewiesen, dass die Deletionsmutante  $\Delta$ *prkC* weniger Sporen bildet und die Biofilmbildung in der Mutante stark reduziert war (Madec et al., 2002). Biofillexperimente könnten weitere Hinweise auf die Funktion von SA1063 geben.

Die Deletion des zu SA1063 zu 31 % homologen Gens *stk1* in *Streptococcus agalactiae* führt zur starken Filament-Bildung der Mutanten-Zellen. Allerdings beruht die verstärkte Kettenbildung vermutlich nicht auf einem Defekt in der Zellteilung, da die Anzahl an CFU (colony-forming unit) von Wildtyp und Mutante gleich war. Die Wachstumsrate der *stk1*-Deletionsmutante entsprach während der exponentiellen Phase der des Wildtyps. Jedoch zeigte die Deletionsmutante  $\Delta$ *stk1* eine verlängerte lag-Phase von 60-90 min. Die

Deletionsmutanten  $\Delta stk1$  in *S. agalactiae* waren außerdem attenuiert. Die Deletionsmutante zeigte einen 25-100mal höheren LD<sub>50</sub>-Wert als der Wildtyp in einem Sepsismodell mit neonatalen Ratten (Rajagopal et al., 2003). Die Deletionsmutante des homologen Proteins  $\Delta SA1063$  in *S. aureus* 8325 war dagegen in einem Sepsismodell mit Mäusen nicht attenuiert. In *S. agalactiae* wird außerdem von der Induktion des Ser/Thr-Kinase-Gens *stk1* durch Humanserum berichtet (Gleich et al., Poster DGHM-Tagung, 2003). Eine Induktion von SA1063 im Wildtyp *S. aureus* 8325 durch Humanserum konnte dagegen nicht festgestellt werden. Allerdings ist im Microarray zu erkennen, dass das Gen *sbi* in der Deletionsmutante  $\Delta SA1063$  vermindert exprimiert wird. Das Gen *sbi* codiert für ein IgG-bindendes Protein auf der Zelloberfläche von *S. aureus*, das durch Humanserum induziert wird (Zhang et al., 2000). Sbi auf der Zelloberfläche könnte den Eintritt in den menschlichen Wirt durch den Kontakt mit IgG wahrnehmen und daraufhin die in der Zellmembran bereits vorhandene Ser/Thr-Kinase SA1063 aktivieren. Die Kinase SA1063 könnte daraufhin die Expression von Virulenzfaktoren, eventuell auch die Verstärkung der Zellwand, beeinflussen.

Die Deletionsmutante  $\Delta SA1063$  zeigt phänotypisch eine verstärkte Hämolyse-Aktivität. Dies könnte auf die verstärkte Expression verschiedener Hämolyse-Gene zurückzuführen sein. Die Gene SA1752 und SA1811 codieren beide für ein abgeschnittenes  $\beta$ -Hämolysin, das eventuell noch funktionell ist. Der ORF SA1752 wird in der  $\Delta pknB$ -Mutante 20-mal stärker transkribiert als im Wildtyp, das Transkript ergibt allerdings nur ein sehr kleines 66 AS langes Protein. Der ORF SA1811 wird in der  $\Delta pknB$ -Mutante etwa 14-mal stärker transkribiert, das Transkript ergibt ein 289 AS langes Produkt. Ein weiteres Hämolysin-Gen, SA1007, wird in der  $\Delta pknB$ -Mutante verstärkt exprimiert. SA1007 codiert für 319 AS des  $\alpha$ -Hämolysin Precursors, allerdings wird es in der Mutante nur knapp 2-fach stärker exprimiert als im Wildtyp (Ratio wt/ $\Delta pknB$  SA1007: 0,57 $\pm$ 0,28). Für die stärkere hämolytische Aktivität der Deletionsmutante könnte jedoch auch die erhöhte Expression von PrsA in der Mutante verantwortlich sein. Das Protein PrsA wurde in *B. subtilis* untersucht. PrsA ist ein Lipoprotein, das auf der Außenseite der Cytoplasmamembran verankert ist und als Peptidyl-Prolyl-Isomerase und vermutlich auch allgemein als Chaperon sekretierter Proteine fungiert. Eine verstärkte Expression von PrsA führt zu einer verstärkten Sekretion der  $\alpha$ -Amylase AmyQ und vermutlich weiterer Proteine. Da *prsA* in *B. subtilis* essentiell ist, wird vermutet, dass es auch für die Sekretion und korrekte Faltung von Proteinen benötigt wird, die bei der Zellwandsynthese eine Rolle spielen (Vitikainen et

al., 2001; Williams et al., 2003; Wahlström et al., 2003). Die in dem Microarray festgestellte erhöhte Expression von PrsA in der Deletionsmutante  $\Delta$ SA1063 in *S. aureus* könnte für eine erhöhte Sekretion der Hämolsine verantwortlich sein.

Das Protein Atl, das in der Deletionsmutante  $\Delta$ SA1063 vermindert exprimiert wird, könnte ebenfalls ein Virulenzfaktor darstellen. Atl ist ein bifunktionales Protein, das posttranslational in eine Glucosaminidase (endo- $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase) und eine Amidase (N-Acetylmuramyl-L-Alaninamidase) gespalten wird. Beide Genprodukte befinden sich ringförmig auf der Zelloberfläche von *S. aureus*. Diese Ringstruktur markiert die zukünftige Teilungsebene der Bakterienzellen. Eine mögliche Funktion des Proteins Atl könnte daher die Trennung der Tochterzellen sein, jedoch ist *atl* nicht essentiell (Takahashi et al., 2002). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass Atl auch als Pathogenitätsfaktor eine Rolle spielt. Das Atl-homologe Protein aus *S. epidermidis* AtlE, mit 59 % identischen Aminosäuren zu Atl, hat adhäsive Eigenschaften und bindet an Vitronectin. Außerdem waren AtlE-defekte Mutanten in einem Katheter-Infektionsmodell in der Ratte in ihrer Virulenz attenuiert (Heilmann et al., 1997; Rupp et al., 2001). Es wäre interessant, ob die  $\Delta$ SA1063-Mutante, die eine verringerte Expression von Atl aufweist, in einem Ratten-Katheter-Modell ebenfalls attenuiert ist.

Generell ist es schwierig, anhand von Microarray-Experimenten die Funktion eines Gens festzustellen. Das Protein SA1063 könnte ebenfalls, ähnlich wie Atl, mehrere biologische Funktionen haben und sowohl zur Zellwandsynthese als auch zur Pathogenität beitragen. Für eine Rolle bei der Zellwandsynthese sprechen im Microarray die veränderte Expression der Gene *prsA*, *sgtB*, *vraR*, *vraS*, *mraW*, *mra* und *atl* in der  $\Delta$ SA1063-Mutante. Für eine Rolle in der Pathogenität spricht die veränderte Expression verschiedener Hämolsin-Gene (SA1752, SA1811 und SA 1007), von *prsA* sowie von *sbi* und ebenfalls *atl*.

Die Interpretation von Microarray-Daten wird dadurch erschwert, dass sich nicht erkennen lässt, ob die veränderte Gen-Expression auf das Fehlen des zu untersuchenden Gens direkt zurückzuführen ist. Das Fehlen eines Gens könnte auch Einfluss auf bestimmte Regulatoren haben, die ihrerseits die Expression mehrere Gene beeinflussen. Außerdem könnten kompensatorische Mutationen auftreten, die das Fehlen eines Gens ausgleichen. Generell müssen aus Microarrays gewonnene Daten durch RT-PCR oder Northern Blot Analysen bestätigt werden. Über die Funktion von SA1063 konnte nur spekuliert werden. Auch die

physiologische Rolle der zu SA1063 homologen Gene *prkC*, *pknB* und *stk1* ist noch nicht aufgeklärt.

### 6.1.3 Untersuchungen zur DNA-Polymerase I

Die DNA-Polymerase I (*polA*) ist für *S. aureus* nicht essentiell. Die Deletion dieser Polymerase hatte außerdem keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien in LB-Medium bei 37 °C und 42 °C. Eine Restaktivität des deletierten Enzyms ist unwahrscheinlich. Am N-terminalen Ende waren nur 115 bp zurückgeblieben, die 38 Aminosäuren ergeben würden. Die 5'-3'-Exonuklease Aktivität erstreckt sich im nativen Protein über ca. 270 Aminosäuren am N-Terminus. Am C-terminalen Ende waren noch 227 bp erhalten. Jedoch ist die Polymerase-Domäne mit nur 75 Aminosäuren nicht funktionsfähig. Im nativen Protein erstreckt sich die Polymerase-Domäne über etwa 380 Aminosäuren (NCBI, Conserved Domain Search; KEGG, motif search). Es ist anzunehmen, dass sowohl die Polymeraseaktivität als auch die Exonuklease-Aktivität durch andere Enzyme ersetzt werden kann. In *E. coli* ist eine *polA*-Deletionsmutante nur in Minimalmedium lebensfähig. Es wird vermutet, dass bei einer verringerten Wachstumsrate der Bakterien die Funktion der DNA-Polymerase I durch andere Enzyme ersetzt werden kann (Joyce and Grindley, 1984). Zum Beispiel könnten Proteine des Nukleotide Excisions Reparatur-Systems, UvrA, UvrB und UvrD zusammen mit anderen Polymerasen wie die DNA Polymerase III und Exonukleasen, die Funktion des Polymerase I bei der Replikation ersetzen. Ein Komplex aus UvrA und UvrB könnte demnach die RNA-DNA-Hybride des „lagging strands“ aufgrund der veränderten Konformation erkennen. Die Nuklease UvrC könnte einen Schnitt upstream des RNA-Primers bewirken. Die Helikase UvrD könnte schließlich das Primer-Fragment durch entwinden des RNA-DNA-Heteroduplexes entfernen. Eventuell ist die Hilfe weiterer Exonukleasen nötig. Nach Entfernung des Primers könnte die DNA-Polymerase III die Lücke in der DNA auffüllen. Für diese Theorie spricht, dass die Proteine UvrA, UvrB und UvrD in einer *polA*-Deletionsmutante von *E. coli* essentiell sind (Moolenaar et al., 2000). Im Gegensatz zu einer *polA*-Deletionsmutante in *E. coli*, zeigt eine *polA*-Deletionsmutante von *S. aureus* kein eingeschränktes Wachstum in Vollmedium. Die Funktion der DNA-Polymerase I scheint in *S. aureus* komplett durch andere Enzyme ersetzt werden zu können. Auch die Empfindlichkeit der *S. aureus polA*-Deletionsmutante gegenüber UV-Licht scheint nicht erhöht zu sein. Dies steht ebenfalls im Widerspruch zu *polA*-Mutanten von *E. coli* und *B. subtilis*, die eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Licht aufweisen (DeLucia und Cairns, 1969; Villani et al., 1974;

Martinez et al., 1987). *S. aureus* könnte über sehr effiziente Reparaturenzyme und DNA-Polymerasen verfügen. Nach UV-Licht Bestrahlung könnte eine sehr effektive Photolyase entstandene Pyrimidindimere reparieren. Das Gen SA0646 zeigt 33% identische Aminosäuren mit der DNA-Photolyase aus *E. coli*. Auch das Nukleotid Excisions-Reparatursystem UvrA, UvrB und UvrC existiert in *S. aureus* und könnte ebenfalls sowohl bei der DNA-Reparatur als auch bei der DNA-Replikation eine Rolle spielen. Die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I könnte durch andere Exonukleasen ersetzt werden, beispielsweise codiert SA1273 für eine putative 5'-3'-Exonuklease in *S. aureus* (Datenbanksuche, KEGG). Wichtig für den Ersatz der DNA-Polymerase I könnten andere Polymerasen sein. *S. aureus* besitzt, wie andere gram-positive Bakterien, zwei Gene die für die  $\alpha$ -Kette der DNA-Polymerase vom Typ III codieren, *dnaE* und *polC*. Beide diese Polymerasen sind essentiell für *S. aureus* (Inoue et al., 2001; Dervyn et al., 2001). Zusätzlich zeigt ein weiteres Gen in *S. aureus*, SA1710, Ähnlichkeit zur  $\alpha$ -Kette *polC* der DNA-Polymerase III (Datenbanksuche, KEGG). Diese hohe Redundanz der DNA-Polymerasen vom Typ III lässt vermuten, dass eine dieser Polymerasen auch in Reparaturprozessen beteiligt sein könnte und als Ersatz für die DNA-Polymerase I dienen kann.

#### 6.1.4 Deletion der Topoisomerase TopoIII (TopB)

Die Topoisomerase TopB ist für *S. aureus* nicht essentiell, da das entsprechende Gen *topB* vollständig deletiert werden konnte. Von den 2136 bp des *topB*-Gens sind in der Deletionsmutante nur 55 bp am N-terminalen Ende erhalten. Die Deletion von *topB* in *S. aureus* hatte außerdem keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien in LB-Medium bei 37 °C und 42 °C. Die zu 30 % identische Topoisomerase TopB aus *E. coli* ist ebenfalls nicht essentiell (DiGate and Mariani, 1988; Whoriskey et al., 1991; Schofield et al., 1992). Bislang ist nur ein Phänotyp in  $\Delta topB$ -Mutanten in *E. coli* beschrieben worden. Deletionsmutanten von TopB weisen eine erhöhte Rate an spontanen Deletionen an kurzen homologen Sequenzen auf. Außerdem wurde von einer erhöhten Häufigkeit von Frameshift-Mutationen in einer  $\Delta topB$ -Mutante berichtet (Whoriskey et al., 1991; Schofield et al., 1992; Uematsu et al., 1997). Die *topB*-Deletionsmutante in *E. coli* wurde zunächst als Mutatorstamm beschrieben und das *topB*-Gen als *mutR* bezeichnet (Whoriskey et al., 1991). Die spontane Mutationsrate in der  $\Delta topB$ -Mutante in *S. aureus* sollte ebenfalls untersucht werden. Dazu wurde das Auftreten spontan ahämolytischer Klone im *S. aureus* Wildtyp-Stamm und in der isogenen Deletionsmutante  $\Delta topB$  verglichen. Sowohl

für Wildtyp als auch für die  $\Delta topB$ -Mutante war das Auftreten von ahämolytischen Klonen mit derselben Häufigkeit zu beobachten. Durch diesen Versuch konnte kein Hinweis auf eine erhöhte Mutationsrate in der  $\Delta topB$ -Mutante in *S. aureus* erhalten werden.

Die  $\Delta topB$ -Mutante weist außerdem keine veränderte MHK gegenüber verschiedenen Antibiotika auf. Die Topoisomerase III stellt daher kein Angriffsziel der verwendeten Antibiotika dar. Die Antibiotika Novobiocin, Nalidixinsäure und Ciprofloxacin wirken hauptsächlich auf die Gyrase und die Topoisomerase IV (Fournier et al., 2000; Hopper et al., 1998; Levine et al., 1998). Die genaue Funktion der Topoisomerase TopB ist auch in *E. coli* noch nicht geklärt. Die Topoisomerase TopB könnte eine Ersatzfunktion haben oder zur Unterstützung anderer Topoisomerasen beitragen. Die Topoisomerase III (TopB) kann ebenso wie die Topoisomerase I (TopA) negative Supercoils in der DNA entspannen. Deletionsmutanten von *topA* können durch die Überexpression von *topB* überleben (Broccoli et al., 2000). Die Überexpression von *topB* kann außerdem Mutationen in *parC* und *parE*, den Untereinheiten der Topoisomerase IV, zum Teil kompensieren und ein schwaches Wachstum ermöglichen (Nurse et al., 2003). Neben der Topoisomerase IV ist auch die Topoisomerase III eine sehr effiziente Dekatenase, die nach der Replikation die Chromosomen voneinander trennen kann. Die Topoisomerase III bindet bevorzugt an einzelsträngige DNA und weist nur eine geringe Affinität für doppelsträngige DNA auf (DiGate und Marians, 1989; Zhang et al 1995). Einzelsträngige DNA-Bereiche treten beispielsweise vor Fertigstellung der Replikationsrunden am „lagging strand“ auf. Bevor die Okazaki-Fragmente aufgefüllt werden könnte die Topoisomerase III die Schwesterchromosomen trennen. Die Topoisomerase III könnte auch auf bestimmte Aufgaben spezialisiert sein. Während die Topoisomerase IV als Haupt-Dekatenase der chromosomalen DNA dient, könnte die Topoisomerase III eine wichtige Dekatenase bei manchen Plasmiden darstellen oder an dem Prozess der Plasmidübertragung beteiligt sein. Für diese Hypothese spricht auch das Vorhandensein von Topoisomerase III homologen Genen auf konjugativen Plasmiden (Li et al., 1997). Eine weitere wichtige Rolle könnte Topo III bei der RecA-abhängigen Rekombination haben. *E. coli*-Bakterien, in denen die Topoisomerase I (*topA*) mutiert ist, wachsen in Gegenwart kompensatorischer Mutationen normal. Falls in diesen Zellen jedoch auch die Topoisomerase III (*topB*)-Aktivität unterdrückt wird, bilden die Bakterien lange Filamente und eine veränderte Nucleoid-Struktur. Dieser Defekt kann durch die Deletion des *recA*-Gens unterdrückt werden. Diese

Ergebnisse legen nahe, dass das Enzym Topo III bei der Auflösung der Rekombinations-Zwischenprodukte beteiligt ist (Zhu et al., 2001).

### 6.1.5 Homologe Gene des DXP-Weges zur Isopren-Biosynthese

In *S. aureus* läuft die Isoprenbiosynthese im Gegensatz zu *E. coli* und *B. subtilis* über den Acetat/Mevalonat-Weg ab (Wilding et al., 2000; Voynova et al., 2004). In *S. aureus* sind jedoch homologe Gene zu *yhb* und *ygbP1* zu finden, die im (Nicht-Mevalonat) DXP-Weg zur Biosynthese von Isoprenmolekülen eine Rolle spielen (siehe Abb. 1). Weitere Enzyme wie Dxs, Dxr und YgbB sind essentielle Bestandteile des DXP-Weges. Homologe dieser Enzyme konnten bislang jedoch nicht in *S. aureus* nachgewiesen werden (Freiberg, 2001a). Daher ist es unwahrscheinlich, dass *S. aureus* ebenfalls über den DXP-Weg zur Isopren-Biosynthese verfügt.

Das YchB-homologe Protein (SA0453) von *S. aureus* ist zu 50 % identisch zu YabH aus *B. subtilis* und zu 30 % identisch mit YchB aus *E. coli*. Das Protein SA0453 zeigt homologe Bereiche zu GHMP-Kinasen (Galaktokinases, Homoserine Kinases, Mevalonat Kinases und Phosphomevalonat Kinase) mit einem gemeinsamen ATP-Bindungsmotiv. Mitglieder der GHMP-Kinasen-Superfamilie katalysieren vielfältige Phosphorylierungs-Reaktionen in Gegenwart von ATP. Zu den Mitgliedern der GHMP-Superfamilie gehören Kinasen, die bei der Biosynthese von Threonin eine wichtige Rolle spielen wie die Homoserine Kinase oder die Galaktokinase, die beim Galaktose-Metabolismus eine Rolle spielt. Auch Enzyme des Mevalonat-Wegs zur Isoprenbiosynthese gehören zu dieser Gruppe. Sowohl die Mevalonat Kinase, die Phosphomevalonat-Kinase als auch die Mevalonat Pyrophosphate Decarboxylase und viele Proteine unbekannter Funktion gehören zu dieser Superfamilie von GHMP-Kinasen (Bork et al., 1993; Zhou et al., 2000). Das Enzym YchB aus *E. coli* zeigt außerdem nur geringe Substratspezifität. Für YchB wurde nachgewiesen, dass dieses Enzym sowohl Isopentenylmonophosphat als auch die für den DXP-Weg relevante Reaktion, die Phosphorylierung von 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol, katalysieren kann (Lange und Croteau, 1999; Lüttgen et al., 2000). Über die Funktion des zu YchB homologen Gens SA0453 in *S. aureus* kann in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden. Das Protein SA0453 ist in *S. aureus* in LB-Medium nicht essentiell. Wachsumtsexperimente in Minimalmedium könnten Hinweise darauf geben, ob SA0453 beim Abbau bestimmter Zucker oder bei der Biosynthese von Aminosäuren oder bei anderen metabolischen Reaktionen eine Rolle spielt.

*S. aureus* besitzt außerdem zwei zu *ygbP* homologe Gene SA0241 und SA0245. Die Aminosäuresequenz dieser beiden Gene ist zu 75 % identisch. SA0241 und SA0245 zeigen je 27 % identische Aminosäuren zu *ygbP* aus *E. coli*. Die Identität zu dem entsprechenden Protein (YacM) aus *B. subtilis* beträgt für SA0241 30 % und für SA0245 32 %. In *E. coli* und *B. subtilis* codieren diese Enzyme für Cytidyl-Transferasen bei der Isoprenbiosynthese über den DXP-Weg. Die orthologen Gene SA0241 und SA0245 weisen Homologien zu Nukleotidyl-Transferasen auf (KEGG Datenbank). Reaktionen, die von Nukleotidyl-Transferasen katalysiert werden sind sehr vielfältig. Die Übertragung von NTP auf ein Substrat tritt häufig bei Zucker-Metabolismus auf. Zum Beispiel zur Biosynthese des Zellwandzuckers N-Acetylmuraminsäure wird N-Acetylglucosamin-1-Phosphat an UTP gekoppelt. Auch für die Epimerisierung von Glukose in Galaktose ist die Kopplung der Glukose an UTP nötig (Gottschalk, 1985).

In *H. influenzae* spielen *ygbP*-homologe Gene eine Rolle bei der Kapselsynthese. Das Gen *acs1* codiert für ein Protein dessen 5'-Bereich Homologien zu *ygbP* aufweist. Bei diesem Enzym handelt es sich um ein bifunktionales Enzym, dessen N-Terminus für eine Ribitol-5-Phosphat-Cytidyltransferase codiert und dessen C-Terminus die Reduktion von Ribulose-5-Phosphat zu Ribitol katalysiert (Follens et al., 1999). Die Proteine SA0241 und SA0245 sind zu 38 % identisch mit der N-terminalen Ribitol-5-Phosphat Cytidyltransferase-Domäne von *Acs1* (BLAST-Search, NCBI). Auffällig ist auch, dass die jeweils angrenzenden ORFs SA0242 und SA0246 Homologien zu Ribulose-5-Phosphat-Dehydrogenasen aufweisen. Falls SA0241 und SA0245 an der Biosynthese der Kapsel in *S. aureus* beteiligt sind, würde man erwarten, dass diese Gene nicht essentiell sind. Das Gen SA0241 konnte deletiert werden und ist daher nicht essentiell. Allerdings konnte SA0245 nicht deletiert werden. Gegen eine Beteiligung bei der Kapselsynthese von SA0241 und SA0245 spricht auch, dass diese Gene nicht zum *cap* Operon (dem Operon zur Kapselsynthese) von *S. aureus* gehören (O'Riordan und Lee, 2004). Cytidyl-Transferasen sind außerdem wichtig bei der Synthese von Phospholipiden und Teichonsäuren. In *S. aureus* sind Teichonsäuren hauptsächlich aus Poly-Ribitolphosphat aufgebaut. Die Protein SA0241 und SA0245 könnten ähnlich wie das *ygbP*-homologe Proteine aus *H. influenzae* (*acs1*) für Ribitol-Cytidyltransferasen codieren. Im Gegensatz zu *H. influenzae* würde dieses aktivierte Ribitol nicht zur Kapselsynthese, sondern zur Synthese von Teichonsäuren verwendet werden. Auch die chromosomale Umgebung der Gene SA0241 und SA0245 spricht für eine Beteiligung dieser Gene bei der Teichonsäure-Biosynthese. Dabei fällt auf,

dass nicht nur SA0241 und SA0245 hohe Homologien zueinander aufweisen, sondern auch die Proteine SA0242 und SA0246 sowie SA0243 und SA0247 zueinander zwischen 75 % und 80 % identische Aminosäuren aufweisen (Tab. 21). Vermutlich hat in dieser chromosomalen Region eine Duplikation stattgefunden (Abb. 53). SA0246 und SA0242 sind zu 60 % identisch mit *tarJ* aus *B. subtilis* W23, das für eine Ribulose-5-Phosphat-Dehydrogenase codiert. SA0243 und SA0247 sind homolog zu Polyribitolphosphat-Polymerasen. Diese drei Gene könnten an der Synthese von CDP-Ribitol beteiligt sein, das zur Synthese der Teichonsäuren benötigt wird. Die Proteine SA0242 und SA0246 würden die Reduktion von Ribulose-5-Phosphat in Ribitol-5-Phosphat katalysieren. Anschließend würde Ribitol-5-Phosphat durch die Cytidyltransferasen SA0241 und SA0245 auf CTP übertragen werden. Das dabei entstandene CDP-Ribitol könnte dann das Substrat zur Polymerisierung der Ribitol-Phosphatkette darstellen, katalysiert werden würde diese Reaktion durch SA0243 und SA0247, in Analogie zur Teichonsäurebiosynthese im *B. subtilis* Stamm W23 (Lazarevic et al., 2002).

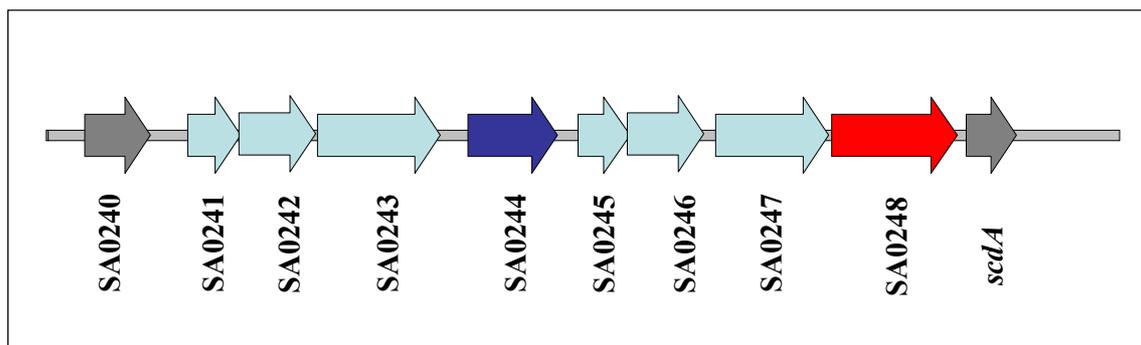


Abb.53: Chromosomale Organisation der homologen Gene SA0241 und SA0245

Tab. 21: Homologie und putative Funktion von SA0241 und SA0245 und der angrenzenden Gene.

Putatives Gen-Duplikat	Identität (Protein)	Putative Funktion
SA0241 ( <i>ygbP1</i> ), SA0245 ( <i>ygbP2</i> )	75 %	Ribitol-5-Phosphat Cytidyltransferase, 38 % identisch zum N-Terminus von Acs1, eine Ribitol-5-P Cytidyltransferase aus <i>H. influenzae</i>
SA0242, SA 0246	80 %	Ribulose-5-Phosphat-Reduktase; 60 % identisch zu TarJ, Ribulose 5-Phosphat Reduktase aus <i>B. subtilis</i> Stamm W23
SA0243, SA 0247	79 %	Polyribitolphosphat polymerase, 29 % identisch zu TagB aus <i>B. subtilis</i> Stamm 168, einer Glycerophosphotransferase
SA0244, -		Glycerophosphotransferase, zu 47 % identisch mit C-Terminus von TagF aus <i>Staphylococcus epidermidis</i>
SA0248, -		Gykosyltransferase
SA0240		Sorbitoldehydrogenase

Durch RT-PCR konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide Gene (SA0241 und SA0245) in *S. aureus* bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 transkribiert werden. Es ist daher verwunderlich, dass SA0245 essentiell ist und SA0241 deletiert werden konnte. Man könnte erwarten, dass Proteine mit 75 % identischen Aminosäuren sich gegenseitig ersetzen können und daher die Deletion eines einzelnen Gens nicht essentiell sein sollte. Eventuell konnte SA0245 aus technischen Gründen nicht deletiert werden und somit wäre SA0245 auch nicht essentiell. Die Rekombinationseffizienz in *S. aureus* ist sehr niedrig. Deletionsmutanten machten in dieser Arbeit generell nur 0,1 % -1 % der Bakterienpopulation aus.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die konditionale Mutante von SA0245 nicht nur die Expression des Gens SA0245 steuert, sondern auch die nachfolgenden Gene, die eventuell mit SA0245 in einem Operon codiert werden. Das Gen *scdA* (SA0249), ein an der Zellteilung beteiligtes Enzym, sollte nicht von der konditionalen Mutation betroffen sein, da es monocistronisch transkribiert wird. Außerdem existiert eine Insertionsmutante von *scdA*, daher ist *scdA* vermutlich nicht essentiell für *S. aureus* (Brunskill et al., 1997). Ein anderes Gen zwischen SA0245 und SA0249 könnte jedoch essentiell sein. Die putative

Glycosyltransferase SA0248 könnte ein essentielles Gen sein und mit SA0245 in einem Operon transkribiert werden. Das Gen SA0248 hat im Gegensatz zu den Genen SA0245, SA0246 und SA0247 kein stark homologes Gen im angrenzenden SA0241 Gen-Locus (vergleiche Tab. 21). SA0248 codiert für eine putative Glycosyltransferase. Glycosyltransferasen können bei der Teichonsäurebiosynthese beteiligt sein oder bei der Zellwandsynthese eine essentielle Rolle spielen (Hancock and Baddiley, 1976; Badurina et al., 2003; Kuroda et al., 2001).

Um eine endgültige Aussage über die Essentialität von SA0245 (*ygbp2*) treffen zu können, müsste analysiert werden, ob das Gen SA0245 in einem Operon mit den downstream gelegenen Genen transkribiert wird. Es wäre möglich, dass nicht SA0245 essentiell ist, sondern ein anderes Gen im Operon (Abb. 53).

Generell stehen die Enzyme zur Biosynthese von Teichonsäuren im Verdacht essentiell zu sein. In *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass *tagD* für *B. subtilis* Stamm 168 essentiell ist. TagD codiert für eine Glycerol-3-Phosphate Cytidyltransferase. Das Protein TagD spielt vermutlich eine zentrale Rolle bei der Biosynthese von Teichonsäuren, da es durch CTP aktiviertes Glycerolphosphat zur Verfügung stellt. Die verringerte Expression von *tagD* führt zu veränderter Morphologie und erhöhter Lyse der Bakterienzellen. Das Hauptpolymer der Teichonsäuren im *B. subtilis*-Stamm 168 besteht aus Poly-Glycerolphosphat (Bhavsar et al., 2001). Falls die Gene SA0241 und SA0245 bei der Teichonsäurebiosynthese eine Rolle spielen, könnte die Deletion von SA0241 die Zusammensetzung der Zellwand beeinflussen und die Sekretionseigenschaften der Bakterien dadurch verändern. Eine veränderte Zellwand könnte die verringerte Hämolyse-Aktivität der SA0241 (*ygbP1*)-Deletionsmutante erklären. Elektronenmikroskopische Aufnahmen könnten klären, ob die Zellwand in der  $\Delta$ SA0241-Mutante und der konditionalen SA0245-Mutante verändert ist. Über die Funktion von SA0241 und SA0245 konnte in dieser Arbeit nur spekuliert werden. *S. aureus* verfügt außerdem über weitere putative Teichonsäurebiosynthese-Operons (*tagA*, *tagH*, *tagG*, *tagB*, *tagX*, *tagD*, und SA0592-SA0598, Kuroda et al., 2001).

#### **6.1.6 Deletion und konditionale Expression von *nusG***

Das Gen *nusG* konnte in dieser Arbeit nicht deletiert werden und könnte daher essentiell sein. Bei der Konstruktion des Deletionsvektors wurde darauf geachtet, dass das

angrenzende *secE*-Gen bei einem Austausch des *nusG*-Gens durch die Erythromycin-Kassette nicht beschädigt wurde. In vielen Organismen bildet *secE* und *nusG* ein Operon. Das Gen *secE* ist in *B. subtilis* essentiell (Joeng et al., 1993). Ein weiteres Problem bei der Deletion von *nusG* könnten die verwendeten Fragmentgrößen zur Konstruktion des Deletionsvektors pKS $\Delta$ *nusG* darstellen. Die Erythromycin-Kassette flankierenden Fragmente waren unterschiedlich lang. Aufgrund vieler Restriktionsschnittstellen im downstream-Bereich des *nusG*-Gens konnte nur ein 383 bp großes Fragment zur Rekombination amplifiziert werden. Das zur Rekombination verwendete upstream-Fragment war dagegen 953 bp lang. Die unterschiedliche Größe dieser beiden Fragmente sowie das besonders kurze downstream-Fragment könnten zu einer verringerten Rekombinationshäufigkeit beitragen und dadurch den Austausch von *nusG* durch die Erythromycin-Kassette unwahrscheinlich machen.

Die konditionale Mutation von *nusG* durch das Xylose-regulierte System ließ ebenfalls keine eindeutige Aussage zur Essentialität von NusG zu. Das Wachstum der P*xyl*-*nusG*-Mutante war unabhängig vom Induktor Xylose und wurde auch durch die Repression der Gen-Expression durch Glukose nicht beeinflusst. Aufgrund dieser Beobachtung würde man annehmen, das NusG nicht essentiell ist (Rohrer et al., 1999). Jedoch ist nicht sicher, ob auch bei der Repression des Xylose-Promotors noch eine basale Expression von NusG stattfindet, die zum Wachstum ausreicht. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich im angrenzenden *secE*-Gen eventuell ein Promotor zur *nusG*-Expression befindet. Die Sequenz von *secE* wurde zur Insertion des Vektors pKSX*nusG* durch ein Single Crossover benötigt (siehe Abb. 34). Transkriptionsanalysen durch RT-PCR könnten Klarheit darüber schaffen wie viel Transkript von *nusG* im reprimierten Zustand noch vorhanden ist. Allerdings stellte sich durch weitere Untersuchungen heraus, dass die Insertion des konditionalen Vektors pKSX*nusG* durch ein Single-Crossover in das Genom nicht stabil war. Auch bei nicht permissiver Temperatur kam es zur Herausspaltung des Temperatur-sensitiven Vektors. Dabei wurde die wildtypische Sequenz regeneriert (siehe 6.2.1). Eine bessere Methode zur konditionalen Gen-Expression von *nusG*, die die genannten Probleme umgeht, wäre die Insertion des Pspac-Promotors vor dem Zielgen durch das unter 5.2.4 beschriebene pLL30/Pspac/pMJ8426-System (Jana et al., 2000). Vermutlich ist NusG für *S. aureus* nicht essentiell, da auch eine Insertionsmutante in *nusG* lebensfähig ist (Xia et al., 1999).

### 6.1.7 Deletion von SA1444

Das Gen SA1444 konnte in *S. aureus* nicht deletiert werden. Es ist daher möglich, dass SA1444 essentiell für *S. aureus* ist. Eine konditionale Mutation dieses Gens mit dem hier getesteten pLL30/Pspac/pMJ8426-System könnte Aufschluss über die Situation in *S. aureus* geben.

### 6.1.8 Deletion von SA1857

Das Gen SA1857 konnte deletiert werden. Daher ist dieses Gen für *S. aureus* im Gegensatz zu *E. coli* nicht essentiell. Erste Wachstums-Experimente in LB-Medium bei 37 °C ließen keinen Wachstumsnachteil der Deletionsmutante erkennen. Damit unterscheidet sich die Deletionsmutante auch deutlich von einer *ydiB*-Deletionsmutante in *B. subtilis*, die eine verringerte Wachstumsrate von 50 % aufweist (Freiberg, 2001a). Über die Funktion dieses Proteins in *S. aureus* lassen sich keine Aussagen treffen. Versuche mit dem gereinigten Protein SA1857 könnten Aufschluss darüber geben, ob SA1857 auch in *S. aureus* ein Nukleotid-bindendes Protein darstellt und ebenfalls ATPase-Aktivität besitzt.

## 6.2 Konditionale Expressionssysteme in *S. aureus*

### 6.2.1 Das Xylose-regulierte Expressionssystem

Das Xylose-regulierte Expressionssystem aus *Staphylococcus xylosus* wurde erfolgreich in *S. carnosus* (Wieland et al., 1995) und *S. aureus* (Rohrer et al., 1999) angewandt. Beide Organismen können selbst keine Xylose verwerten. Das hat den Vorteil, dass die kontrollierte Expression am Xylose-Promotor/Operator (*xylAB*) nicht durch endogene Faktoren beeinflusst wird und der Induktor (Xylose) nicht abgebaut wird. Auch ein entsprechendes Xylose-reguliertes System aus *Bacillus megaterium* wurde bereits erfolgreich zur kontrollierten Gen-Expression in *S. aureus* getestet (Zhang et al., 2000). Xylose wird von *S. aureus* durch einen unbekanntem Transporter aufgenommen. Die Bindung von Xylose an den Repressor XylR führt zur Inaktivierung des Repressors und die Transkription am Xylose-Promotor/Operator und der nachgeschalteten Gene kann stattfinden. Außerdem unterliegt die Expression an *P<sub>xyl</sub>* der Katabolit-Repression. In Gegenwart von Glukose wird die Transkription an *P<sub>xyl</sub>* unterdrückt. In Gegenwart beider Zucker, Xylose und Glukose, dominiert der Glukose-Effekt (Wieland et al., 1995). In *S. aureus* wurde das Xylose-Regulon zur konditionalen Expression des putativ essentiellen Gens *f<sub>mhB</sub>* getestet (Rohrer et al., 1999). Die Expression von *f<sub>mhB</sub>* konnte nicht durch

0,5 % Xylose induziert werden, jedoch fand eine deutliche Repression der Expression des Zielgens in Gegenwart von 0,5 % Glukose im LB-Medium statt. Die Zugabe von 0,5 % Glukose führte zu einer verlängerten Verdopplungszeit von 58 min auf 72 min in der konditionalen *Pxyl-fmhB*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. In Analogie zu diesem System wurden in dieser Arbeit das Gen *nusG* unter die Kontrolle des Xylose-Regulons gebracht. Allerdings wurde das Wachstum der *Pxyl-nusG*-Mutante nicht durch die Zugabe von 0,5 % Glukose zum LB-Medium beeinflusst. Daraus könnte der Schluss gezogen werden, dass das *nusG*-Gen nicht essentiell ist. Diese Aussage kann jedoch aufgrund mehrerer Überlegungen nicht eindeutig getroffen werden. Zum einen wurde auch das Wachstum der konditionalen Mutante *Pxyl-fmhB* nicht vollständig durch die Anwesenheit von Glukose unterdrückt. Das bedeutet, dass noch geringe Mengen des essentiellen *fmhB*-Transkripts gebildet werden, die für ein schwaches Wachstum ausreichen (Rohrer et al., 1999). In der *Pxyl-nusG*-Mutante könnten in Gegenwart von Glukose ebenfalls noch geringe Mengen des Transkripts *nusG* vorhanden sein, die für ein normales Wachstum ausreichen. Die Repression an *Pxyl* durch den Glukose-Effekt ist nicht vollständig. Ein weiterer Nachteil dieses Expressionssystems ist die instabile Insertion des Xylose-Regulons vor dem Zielgen. Da der komplette Vektor durch ein Single Crossover-Ereignis vor dem Zielgen integriert wird, kommt es zur Generierung von homologen Sequenzen auf dem Chromosom. Der Vektor kann bei Rekombination dieser homologen Sequenzen wieder aus dem Genom geschnitten werden. Dabei wird die wildtypische Sequenz auf dem Chromosom regeneriert. Selbst bei einer erhöhten Temperatur von 42 °C konnte die Amplifikation des Temperatur-sensitiven Shuttle-Vektors nicht vollständig unterbunden werden. Eine erneute Untersuchung der *Pxyl-nusG*-Mutante im Southern Blot ergab, dass sich der Insertionsvektor regeneriert hatte. Bei der konditionalen Mutante *Pxyl-nusG* handelt es sich um eine Mischpopulation aus konditionalen Mutanten *Pxyl-nusG* und Wildtyp mit Plasmid pKSX*nusG*. Für das essentielle Gen *dnaE* konnte selbst nach mehrmaliger Subkultivierung bei 42 °C keine einheitliche Population aus *Pxyl-dnaE*-Mutanten gewonnen werden. Ein Teil der Bakterien behielt die wildtypische Sequenz mit dem Insertionsplasmid pKSX*dnaE*. Das Xylose regulierte System erwies sich als instabil und steht außerdem im Verdacht, keine vollständige Repression durch Glukose zu ermöglichen. Daher wurde dieses System zur Analyse essentieller Gene nicht weiter verwendet.

### 6.2.2 Kontrollierte Synthese von Antisense-RNA durch das Xylose-Regulon

Das Xylose-Regulon von *S. xylosus* (vergleiche 5.2.1) wurde zur Entwicklung eines Expressionsplasmids in *S. carnosus* verwendet. Das Lipase-Gen (*lip*) wurde unter der Kontrolle des *P<sub>xyl</sub>*-Promotors durch 0,5 % Xylose in LB-Medium stark induziert und führt zur einer 40-fachen Zunahme der extrazellulären Lipase-Aktivität (Wieland et al., 1995). In *S. aureus* wurde das Gen der  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*) mit dem Xylose-Regulon auf einem Plasmid (pRB473) fusioniert. Auch in diesem Stamm konnte die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch Xylose in LB-Medium stark induziert werden (U. Wallner, persönliche Mitteilung). Die gute Induzierbarkeit des Xylose-Regulons bildete die Grundlage zur Herstellung eines Xylose-regulierten Antisense-Plasmids. Das Xylose-Regulon war auf dem Plasmid pRB473 vorhanden. Die zu untersuchenden Gene oder Gen-Fragmente wurden in Antisense-Orientierung hinter das Xylose-Regulon kloniert. Bei Zugabe von 0,5 % Xylose zum Medium sollte es zu einer Induktion der Gen-Expression an *P<sub>xyl</sub>* kommen. Dabei sollten große Mengen der Antisense-RNA des Zielgens entstehen und die komplementäre Sense-RNA (mRNA) des Zielgens abfangen. Die Antisense-Konstrukte sollten zunächst mit bekannten essentiellen Genen *ligA* und *dnaE* hergestellt werden. Für das Gen *ligA* wurden zwei verschiedene Konstrukte, die entweder nur 750 bp des *ligA*-Gens enthielten oder das komplette *ligA*-Gen (2070 bp) umfassten, getestet. Das Antisense-Konstrukt von *dnaE* umfasste 795 bp. Keines dieser Antisense-Konstrukte beeinflusste das Wachstum von *S. aureus* bei deren Induktion durch 0,5 % Xylose.

Im Gegensatz zu dieser Beobachtung konnten Ji et al. (2001) zahlreiche essentielle Gene in *S. aureus* durch Antisense-Konstrukte identifizieren. Bei diesem Ansatz wurde die chromosomale DNA von *S. aureus* geschert. Die erhaltenen DNA-Fragmente waren 200-800 bp lang und wurde hinter den induzierbaren *P<sub>xyl/tet</sub>* Promotor kloniert. Das *xyl/tet* regulierbare System besteht aus dem starken Promotor *P<sub>xyl</sub>* aus *B. subtilis* und *tet*-regulatorischen Elementen von *Tn10* aus *E. coli* (Geissendorfer und Hillen, 1990). In diesem Ansatz konnten 150 Gene in *S. aureus* identifiziert werden, die durch die Induktion der entsprechenden Antisense-RNA vermindert exprimiert wurden. Die Induktion der entsprechenden Antisense-RNA führte zu einer Verringerung des Wachstums von *S. aureus* (Ji et al., 2001). Es könnte sein, dass die Induktion an dem *P<sub>xyl</sub>* Promotor aus *B. subtilis* stärker ist als an dem in dieser Arbeit verwendeten *P<sub>xyl</sub>*-Promotor aus *Staphylococcus xylosus*. Eine größere Menge an Antisense-RNA könnte eine effektivere Wechselwirkung mit dem Sense-Transkript eingehen und die Sense-RNA (mRNA) neutralisieren. Allerdings

tauchen die Gene *dnaE* und *ligA* nicht unter den Antisense-Mutanten in der Arbeit von Ji et al. (2001) auf. Möglicherweise spielt auch die Stabilität der Antisense-RNA sowie deren Sekundärstruktur eine Rolle. In einer weiteren Arbeit wurde ebenfalls das komplette Genom von *S. aureus* gesichert und in ein Xylose-induzierbares Expressionsplasmid, in Analogie zu dem von Ji et al., (2001) beschriebenen System, kloniert. Zur Expression der Antisense-RNA wurde hier ein optimierter Bakteriophagen-Promotor (T5 P<sub>N25</sub>) verwendet (LeGrice, 1990). In diesem Ansatz konnte *ligA* als essentielles Gen identifiziert werden, jedoch wird *dnaE* als nicht essentiell bezeichnet und steht damit im Widerspruch zu den Untersuchungen an einer Temperatur-sensitiven *dnaE*-Mutante (Forsyth et al., 2002; Inoue et al., 2001). Außerdem wird in der Arbeit von Forsyth et al. (2002) das Gen SA1063 (*pknB*) als essentiell bezeichnet und steht damit im Widerspruch zu der vorliegenden Arbeit. Insgesamt kann man jedoch zumindest bei Genen, die für ribosomale Proteine codieren, eine gute Übereinstimmung der von Forsyth et al. (2002) und Ji et al. (2001) identifizierten essentielle Gene feststellen. Ein Antisense-Ansatz mit Zufallsfragmenten aus einem kompletten gesicherten Genom könnte daher eine Erfolg versprechende Strategie zur Auffindung essentieller Gene sein. Das Design einer spezifischen Antisense-RNA gegen ein bestimmtes Gen ist dagegen fehleranfällig. Es scheint RNA-Sequenzen zu geben, die sich nicht als Substrat der Antisense-Inhibierung eignen (Forsyth et al., 2002).

### 6.2.3 pMUTIN/Pspac

Der Vektor pMUTIN wurde zur Inaktivierung und zur konditionalen Mutation zahlreicher Gene in *B. subtilis* verwendet (Vagner et al., 1998). Auch in *S. aureus* wurden konditionale Mutanten zweier essentieller Gene mit Hilfe des pMUTIN4 hergestellt (Zhang et al., 2000). Auf dem Plasmid pMUTIN ist der Pspac-Promotor und der Repressor *lacI* codiert (Abb. 37). Pspac besteht aus dem *E. coli lac*-Operator O1, fusioniert an einen Promotor des SPO-1 Phagen aus *B. subtilis* (Yansura und Henner, 1983). Bei dem hier verwendeten Vektor pMUTIN4 war der *lac*-Operator O1 durch eine perfekte palindromische Sequenz „oid“ ausgetauscht worden. Diese Sequenz ermöglicht eine bessere Bindung des LacI-Repressors an den Operator. Außerdem wurden in den Vektor pMUTIN4 zusätzliche Terminator-Sequenzen t<sub>1</sub>t<sub>2</sub> aus dem *rrnB* Operon aus *E. coli* upstream von Pspac eingebracht. Die zusätzlichen Terminatoren sollten ein Durchlesen von upstream gelegenen Promotoren verhindern (Vagner et al., 1998). In Gegenwart eines zusätzlichen Plasmides in trans, auf dem eine zusätzliche Kopie des Repressors *lacI* codiert war, konnten Mutanten essentieller Gene (*metRS*, *defI*), erhalten werden, deren Wachstum in Abwesenheit des Induktors IPTG vollständig gehemmt war (Zhang et al., 2000). Eine wesentliche Eigenschaft des

pMUTIN-Vektors ist die Abwesenheit eines gram-positiven „origin of replication“. Die homologe Rekombination und Integration des Vektors muss sofort nach der Transformation erfolgen. Die Selektion der Insertionsmutanten erfolgte in Gegenwart von 10 µg/ml Erythromycin. Unter Erythromycin- Selektionsdruck sollte die Insertion von pMUTIN, im Gegensatz zu der Insertion eines Shuttle Vektors (siehe 6.2.1), stabil sein. Es konnten jedoch keine Insertionsmutanten von pMUTIN erhalten werden, weder das Vektorkonstrukt pKSM*pknB* zur Mutation des nicht-essentiellen Gens *pknB* noch das Vektorkonstrukt pKSM*dnaE* zur Mutation des essentiellen Gens *dnaE*, konnten in das Genom integriert werden. Auch besonders hohe Konzentrationen des zu transformierenden Plasmides (bis zu 3 µg) lieferten keine Insertionsmutanten. Eventuell könnte man versuchen durch Protoplasten-Transformation die Transformationsrate zu erhöhen. In den durchgeführten Experimenten war sowohl die Transformationseffizienz als auch die Rekombinationseffizienz von *S. aureus* zu gering, um Insertionsmutanten zu gewinnen.

#### 6.2.4 pLL30/ Pspac/pMJ8426-Expressionssystem

Bei diesem Expressionssystem wurde ebenfalls Pspac zur konditionalen Gen-Expression verwendet. Der Vorteil gegenüber dem pMUTIN/Pspac-System liegt darin, dass sich die Insertionskassette auf dem Shuttle-Vektor pLL30 befindet. Der Vektor pLL30 kann nach erfolgter Transformation in den Zielstamm *S. aureus* RN4220 zunächst amplifiziert werden. Die erhöhte Kopienzahl des Vektors macht ein Rekombinationsereignis in *S. aureus* wahrscheinlich. Im Gegensatz zu dem Xylose-regulierten System, das sich ebenfalls auf einem Shuttle-Vektor befand, erfolgt die Integration des regulierbaren Promotors Pspac vor dem Zielgen durch ein Doppel-Crossover. Nach Verlust des Temperatur-sensitiven Shuttle-Vektors pLL30 ist die Integration des Promotors vor dem Zielgen stabil. Dies ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber dem Xylose-regulierten System, bei dem das Xylose-Regulon durch ein Single-Crossover vor dem Zielgen integriert wurde, diese Integration war reversibel. Bei dem Xylose-regulierten System liegt nach erfolgtem Single-Crossover die zur Rekombination verwendete 5'-Region des Zielgens doppelt auf dem Chromosom vor. Das 5'- Fragment bleibt hinter dem wildtypischen Promotor auf dem Chromosom erhalten. Das hat außerdem den Nachteil, dass kleine Gene nicht mit diesem System mutiert werden können. Es muss mit einer Restaktivität der 5'-Region des Zielgens gerechnet werden. Dagegen kann bei dem pLL30/Pspac/pMJ8426-System ein beliebig großes Fragment des Zielgens und angrenzende Gene zur Klonierung und Rekombination verwendet werden. Ein Problem, das bei beiden Systemen bleibt ist allerdings, dass Gene,

die sich downstream des mutierten Gens befinden und mit diesem in einem Operon codiert werden, ebenfalls der Kontrolle des eingeführten Promotors unterliegen (siehe 6.1.5).

Bei der Insertion des Pspac Promotors vor dem Zielgen wurde gleichzeitig eine Terminatorsequenz (*ter*) aus dem *rrnB* Operon aus *E. coli* upstream des Pspac-Promotors integriert. Dadurch soll die Expression des Zielgens von upstream gelegenen Promotoren abgeschirmt werden. Die Insertionskassette enthält außerdem eine Chloramphenicol-Resistenzkassette (*cat*) zur Selektion der Mutanten (Abb. 40). Der Temperatur-sensitive Shuttle-Vektor pLL30 enthält eine Tetrazyklin-Resistenz. Nach erfolgtem doppeltem Crossover können potentielle Mutanten vorselektiert werden, da sie nach Integration der *cat-ter-Pspac*-Kassette Chloramphenicol-resistent und nach Verlust des Vektors pLL30 Tetrazyklin-sensitiv sind (Jana et al., 2000). Die kontrollierte Expression an Pspac kann erst nach Transformation des Vektors pMJ8426 stattfinden. Auf diesem Plasmid ist der Repressor *lacI* codiert. Da das Plasmid in mehreren Kopien vorliegt, erhöht sich auch die Kopienzahl des Repressor LacI in der Zelle. Zusätzlich wird der Repressor LacI von einem starken Promotor, dem Promotor des Penicillinase-Gens aus *Bacillus licheniformis*, konstitutiv exprimiert. Die große Menge des Repressors LacI stellt eine gute Repression an Pspac sicher. Die konditionale Expression eines essentiellen Genes (*murE*) wurde mit diesem System pLL30/Pspac/pMJ8426 in *S. aureus* erfolgreich durchgeführt (Jana et al., 2000). Auch in dieser Arbeit konnten das bekannte essentielle Gen *ligA* und das bislang nicht charakterisierte Gen SA0245 mit diesem System erfolgreich mutiert werden. Das Wachstum dieser konditionalen Mutanten war in Gegenwart des Repressorplasmides pMJ8426 abhängig von der Zugabe des Induktors IPTG.

### 6.2.5 Die konditionale Mutanten Pspac-*ligA* und Pspac-*ygbP2*

Die Repression an Pspac durch LacI ist relativ „dicht“. Jedoch zeigte die mit diesem System erhaltene Pspac-*ligA*-Mutante in Flüssigkultur erst bei der zweiten Subkultivierung ohne IPTG einen deutlichen Wachstumsdefekt. Möglicherweise reichen wenige Transkripte von *ligA* aus, um das Wachstum der Bakterien zu ermöglichen. Bei mehrmaliger Subkultivierung der konditionalen Pspac-*ligA*-Mutante könnte es zur Ausdünnung des *ligA*-Gen-Produkts kommen. Vermutlich ist erst nach Unterschreitung der Mindestmenge des *ligA*-Transkripts eine Hemmung des Wachstums zu erkennen. Das Wachstum der Pspac-*ligA*-Mutante konnte nach dreistündiger Hemmung bei nachträglicher Zugabe von IPTG nicht mehr induziert werden. Nach Ausdünnung des *ligA*-Transkripts könnten zu viele Fehler in der DNA entstanden sein, die eine Wiederaufnahme des Wachstums nach IPTG-

Zugabe nicht mehr ermöglichen (Abb. 45). Beim Wachstum auf Agarplatte war in Gegenwart von 10 µg/ml Tetrazyklin und in Abwesenheit von IPTG eine deutliche Hemmung der *ligA*- und der *ygbP2*-Mutante zu erkennen. Die hohe Konzentration an Tetrazyklin könnte die Kopienzahl des Repressorplasmids pMJ8426 erhöhen. Die erhöhte Menge des Repressorplasmids pMJ8426, und damit des Repressors LacI, könnte zu einer besonders dichten Repression an Pspac führen. Das Wachstum der Pspac-*ygbP2*-Mutante konnte in Flüssigmedium nicht vollständig unterdrückt werden. Auch mehrmaliges Subkultivieren der Mutante in Abwesenheit von IPTG hatte keine vollständige Wachstumshemmung zur Folge. Es ist denkbar, dass in Abwesenheit von SA0245 (und weiterer Gene im putativen Operon) noch ein stark reduziertes Wachstum der Zellen stattfinden kann. Demnach wären die Gene des *ygbP2*-Operons nicht essentiell sondern nur für eine optimale Wachstumsrate nötig. Gegen diese Beobachtung spricht allerdings, dass das Wachstum der Pspac-*ygbP2*-Mutante auf LB-Agarplatten mit 10 µg/ml Tetrazyklin und ohne IPTG vollständig unterdrückt werden kann.

#### **6.2.6 Die konditionale Pspac-*ligA*-Mutante im Tierversuch**

Erste Versuche in Mäusen (Gelfoam-Modell) zeigen, dass das konditionale pLL30/Pspac/pMJ8426-Expressionssystem auch in vivo funktionell ist. Die Verabreichung von Tetrazyklin sorgt für die stabile Vererbung des Repressorplasmids pMJ8426 auch in den Bakterien im Tier. Der Induktor IPTG kann über das Trinkwasser verabreicht werden. In Abwesenheit des Induktors IPTG war das Wachstum der Pspac-*ligA*-Mutante im Gelfoam vollständig unterdrückt. In Gegenwart des Induktors IPTG konnte eine Vermehrung der Pspac-*ligA*-Mutante festgestellt werden. Das Wachstum der konditionalen Mutante war in Gegenwart von IPTG etwas geringer als im Wildtyp. Die vorherrschende IPTG-Konzentration im Gelfoam könnte zu gering sein, um eine optimale Expression von *ligA* zu ermöglichen. Außerdem könnte die Regulation des Ligase-Gens vom artifiziellen Promotor Pspac zu einem geringen Wachstumsnachteil im Vergleich zur Expression vom wildtypischen Promotor führen. Um die allgemeine Anwendbarkeit dieses konditionalen In-vivo-Systems zu überprüfen, werden gegenwärtig weitere konditionale Mutanten mit diesem System getestet. Nach diesem ersten positiven Experiment steht nun erstmals ein konditionales In-vivo-Expressionssystem für *S. aureus* zur Verfügung, mit Hilfe dessen putative Targetgene in vivo validiert werden können.

### 6.2.7 Übersicht über die verwendeten Systeme zur konditionalen Gen-Expression

Tab. 22: Vergleich der verwendeten Expressionssysteme.

Methoden	Vorteil	Nachteil
<b>pBT2-<i>xyI</i>R, Plasmid-Integration</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Shuttle-Vektor kann vor Rekombinationsereignis amplifiziert werden</li> <li>• Gute Induktion an <i>PxyI</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Integration eines Shuttle-Vektors durch ein Single-Crossover Ereignis ist instabil</li> <li>• Die Repression an <i>PxyI</i> ist nicht „dicht“</li> <li>• Methode nicht geeignet für kurze Gene</li> <li>• Konditionale Mutation beeinflusst alle nachfolgende Gene im Operon</li> </ul>
<b>pMUTIN, Pspac, Plasmid-Integration</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stabile Integration des Vektors, da dieser nicht in gram-positiven replizieren kann</li> <li>• Repression an Pspac ist relativ „dicht“</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Transformations- und Rekombinationshäufigkeit in <i>S. aureus</i> macht die Integration des Vektors unwahrscheinlich</li> <li>• Methode nicht geeignet für kurze Gene</li> <li>• Konditionale Mutation beeinflusst alle nachfolgende Gene im Operon</li> </ul>
<b>Antisense-RNA, pRB473-<i>xyI</i>R</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schnelle Methode, kein Rekombinationsereignis nötig</li> <li>• Hohe Induktionsrate an <i>PxyI</i></li> <li>• Keine konstitutive Expression des Zielgens nötig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Methode funktioniert nicht mit jeder Antisense-RNA (abhängig von Menge, Stabilität der RNA und/oder Sekundärstruktur)</li> <li>• Es gibt keine allgemeine Regeln zum optimalen Design einer Antisense-RNA</li> </ul>
<b>pLL30/Pspac/ pMJ8426</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Shuttle-Vektor, kann vor dem Rekombinationsereignis amplifiziert werden</li> <li>• Integration des Pspac-Promotors durch ein doppeltes Crossover, ist stabil</li> <li>• Pspac gilt als relativ dicht, Expression großer Mengen an LacI von Plasmid pMJ8426 möglich</li> <li>• Mutation auch von kleinen Genen möglich, Größe des zu mutierenden Gens ist beliebig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zeitaufwendige Methode</li> <li>• Mutagenese verläuft über konstitutive Expression</li> <li>• Konditionale Mutation beeinflusst alle nachfolgende Gene im Operon</li> </ul>

### 6.3 Ausblick

Multiresistente Krankheitserreger sind ein weltweites Problem. In Krankenhäusern haben sich neben multiresistenten *S. aureus* auch multiresistente *S. epidermidis* sowie verschiedene multiresistente Enterokokken-Stämme und *Pseudomonas*-Stämme etabliert. Das Auftreten von Methicillin-resistenten *S. aureus*- und multiresistenten *Streptococcus pneumoniae*- Stämmen in der immunkompetenten Bevölkerung gibt Anlass zu weiterer Besorgnis. Die Entwicklung neuer Antibiotika ist daher von vorrangigem Interesse. Dank zahlreicher sequenzierter bakterieller Genome lässt sich eine Vorauswahl neuer potentieller Zielstrukturen von Antibiotika am Computer (in silico) treffen. Dadurch werden auch in Zukunft geeignete Targetstrukturen identifiziert werden. Von besonderem Interesse sind dabei Zielstrukturen, die über eine Vielzahl von Organismen verbreitet sind. Aber auch Antibiotika die nur gegen eine bestimmte Bakterienart wirksam sind können, z. B. zur Therapie von Tuberkulose, äußerst wertvoll sein. Besonders interessant sind Gene, die für das Wachstum der Bakterien essentiell sind. Gene, die unter optimalen Wachstumsbedingungen in Vollmedien nicht essentiell sind, können dennoch in vivo essentiell sein. Aus diesem Grund ist eine Überprüfung der Zielstruktur im Tierexperiment wichtig. Auch Virulenzfaktoren, die zur Etablierung und zum Erhalt einer Infektion beitragen, kommen als Angriffspunkt für die Antibiotika-Entwicklung in Frage. Für die In-vivo-Targetvalidierung sind konditionale Expressionssysteme, die eine Repression des Zielgens im Verlauf der Infektion ermöglichen, eine wesentliche Voraussetzung. Dadurch kann der Effekt einer Antibiotikagabe im Verlauf der Infektion simuliert werden. Durch die verringerte Expression eines Gens kann außerdem seine Wechselwirkung mit einer bestimmten inhibitorischen Substanz bestätigt werden. Die MHK gegenüber einem Inhibitor sollte sich verringern, wenn die Zielstruktur nur noch minimal exprimiert wird.

Neben dem Auffinden neuer bakterieller Zielstrukturen gilt es auch alternative Strategien weiter zu verfolgen. Neben der Suche nach neuen antibakterielle Substanzen in bislang wenig untersuchten Ökosystemen wie z.B. marinen Ökosystemen könnten auch weitere Mikroorganismen im Erdreich, die bislang nicht kultivierbar waren, potentielle Antibiotika-Produzenten sein. Ein vielversprechender Ansatz besteht auch in der Entwicklung spezifischer Antikörper gegen immunodominante Strukturen von pathogenen Mikroorganismen. Hier sind bereits einige aussichtsreiche Kandidaten in der klinischen Testung.

## 7. Literatur

**Ackerley DF, Gonzalez CF, Keyhan M., et al.** (2004). Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. Environ. Microbiol., **6** (8): 851-860.

**Alberts B., Bray D., Lewis J., et al.** (1995). Molekularbiologie der Zelle. VCH, **3. Auflage**.

**Allali-Hassani A., Campbell T.L., Ho A., et al.** (2004). Probing the active site of YjeE: a vital *Escherichia coli* protein of unknown function. Biochem. Journal, **Manuscript BJ20041082**.

**Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., et al.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., **25**: 3389-3402.

**Antelmann H., Engelmann S., Schmid R., et al.** (1996). General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis*: cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. J. Bacteriol., **178** 6571-6578.

**Antelmann H., Engelmann S., Schmid R., et al.** (1997). Expression of a stress- and starvation-induced *dps/pexB*-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor  $\sigma^B$  in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., **179**: 7251-7256.

**Aravind L., Makarova K.S. and Koonin E.V.** (2000). Survey and Summary: Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. Nucleic Acids Res., **28** (18): 3417-3432.

**Aslund F., Zheng M., Beckwith J., et al.** (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. PNAS, **96**: 6161-6165.

**Asnis R. E.** (1957). The reduction of furacin by cell-free extracts of furacin-resistant and parent-susceptible strains of *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys., **66**: 208-216.

**Av-Gay Y., Sarwat J. and Drews S.** (1999). Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase PknB. Infect. Immun., **67** 11: 5676-5682.

**Baba T., Takeuchi F., Kuroda M., et al.** (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. The Lancet, **359**: 1819-1827.

**Badurina D. S., Zolli-Juran M. and Brown E.D.** (2003). CTP:glycerol 3-phosphate cytidyltransferase (TarD) from *Staphylococcus aureus* catalyzes the cytidyl transfer via an ordered Bi-Bi reaction mechanism with micromolar  $K_m$  values. Biochim. Biophys., **1646**: 196-206.

**Bakal C.J. and Davies J.E.** (2000). No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria. Cell Biol., **10**: 32-38.

**Bandow J.E., Brötz H., Leichert L.I.O., et al.** (2003). Proteomic approach to understanding antibiotic action. Antimicrob. Agents Chemother., **47** (3): 948-955.

**Barber M. and Rozwadowska-Dowzenko M.** (1948). Infection by penicillin-resistant staphylococci. Lancet, **ii**: 641-644.

**Bhavsar A.P., Beveridge T.J. and Brown E.D.** (2001). Precise deletion of *tagD* and controlled depletion of its product, glycerol 3-phosphate cytidyltransferase, leads to irregular morphology and lysis of *Bacillus subtilis* grown at physiological temperature. J. Bacteriol., **183** (22): 6688-6693.

**Boitel B., Ortiz-Lombardia M., Duran R., et al.** (2003). PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Microbiol., **49** (6): 1493-1508.

**Bork P., Sander C. and Valencia A.** (1993). Convergent evolution of similar enzymatic function of different protein folds in ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. Protein Sci., **2** (1): 31-40.

**Broccoli S., Phoenix P. and Drolet M.** (2000). Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. Mol. Micro., **35** (1): 58-68.

**Brock T.D.** (1997). Biology of Microorganisms. Prentice-Hall International, Inc., **Eighth Edition**.

**Bruck I. and O'Donnell M.** (2000). The DNA replication machine of a gram-positive organism. J. Biol. Chem., **275** (37): 28971-28983.

**Brückner R.** (1992). A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Gene, **122**: 187-192.

**Brückner R.** (1997). Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. FEMS Microbiol. Letters, **151**: 1-8.

**Brunskill E.W., de Jonge B.L.M. and Bayles K.W.** (1997). The *Staphylococcus aureus scdA* gene: a novel locus that affects cell division and morphogenesis. Microbiol., **143**: 2877-2882.

**Bsat N., Chen L. and H. J.D.** (1996). Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes. J. Bacteriol., **178** (22): 6579-6586.

**Bsat N., Herbig A.F., Casillas-Martinez L., et al.** (1998). *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. Mol. Microbiol., **29**: 189-198.

**Burns C.M. and Richardson J.P.** (1995). NusG is required to overcome a kinetic limitation to Rho function at an intragenic terminator. PNAS, **92**: 4738-4742.

**Burns C.M., Richardson L.V. and Richardson J.P.** (1998). Combinatorial effects of NusA and NusG on transcription elongation and Rho-dependent termination in *E. coli*. J. Mol. Biol., **278**: 307-316.

**Burova E., Hung S.C., Sagitov V., et al.** (1995). *Escherichia coli* NusG protein stimulates transcription elongation rates in vivo and in vitro. J. Bacteriol., **177** (5): 1388-1392.

**Chaba R., Raje M. and Chakraborti P.K.** (2002). Evidence that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* regulates morphological changes associated with cell division. Eur. J. Biochem., **269**: 1078-1085.

**Cha R., B. W.J. and Rybak M.J.** (2003). Bactericidal activities of daptomycin, quinupristin-dalfopristin, and linezolid against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. Antimicrob. Agents Chemother., **47** (12): 3960-3963.

- Chan P.F., Foster S.J., Ingham E., et al.** (1998). The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor  $\sigma^B$  controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. J.Bacteriol., **180** (23): 6082-6089.
- Chen L., James L.P. and Helmann J.D.** (1993). Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions. J. Bacteriol., **175**: 5428-5437.
- Chen L., Keramati L. and Helmann J.D.** (1995). Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. PNAS, **92**: 8190-8194.
- Chopra I., Hodgson J., Metcalf B., et al.** (1997). The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. Antimicrobial Agents Chemother., **41** (3): 497-503.
- Corbett MD, Chipko BR and Batchelor AO** (1980). The action of chloride peroxidase on 4-chloroaniline. N-oxidation and ring halogenation. Biochem. J., **187** (3): 893-903.
- De Lencastre H., Wu S.W., Pinho M.G., et al.** (1999). Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin. Microbiol Drug Resistance, **5** (3): 163-175.
- De Sousa MA. and De Lencastre H.** (2004). Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. FEMS Immunol. Med. Microbiol., **40** (2): 101-111.
- De Vito J. and Das A.** (1994). Control of transcription processivity in phage  $\lambda$ : Nus factors strengthen the termination-resistant state of RNA polymerase induced by N antitermiantor. PNAS, **91**: 8660-8664.
- DeLucia P. and Cairns J.** (1969). Isolation of an *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase. Nature, **224** (225): 1164-1166.
- Dermody J.J., Robinson G.T. and Sternglanz R.** (1979). Conditional-lethal deoxyribonucleic acid ligase mutant of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **139**: 701-704.
- Dervyn E., Suski C., Daniel R., et al.** (2001). Two essential DNA Polymerases at the bacterial replication fork. Science, **294**: 1716-1719.
- Diaz A., Lacks S.A. and Lopez P.** (1992b). The 5'-3' exonuclease activity of DNA polymerase I is essential for *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Micro., **6** (20): 3009-3019.
- Diaz A., Pons M.E., Lacks S.A., et al.** (1992a). *Streptococcus pneumoniae* DNA polymerase I lacks 3'-to-5'-exonuclease activity: localization of the 5'-to-3'-exonucleolytic domain. J. Bacteriol., **174**: 2014-2024.
- DiGate R.J. and Marians K. J.** (1988). Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **263** (26): 13366-13373.
- DiGate R.J. and Marians K. J.** (1989). Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. J. Biol. Chem., **264**: 17924-17930.
- Downing W.L., Sullivan S.L., Gottesman M., et al.** (1990). Sequence and transcriptional pattern of the essential *E. coli secE-nusG* operon. J. Bacteriol., **172**: 1621-1627.

**Drews S., Hung F. and Av-Gay Y.** (2001). A protein kinase inhibitor as an antimicrobial agent. FEMS Microbiol. Letters, **205**: 369-374.

**Drlica K.** (1999). Mechanism of fluoroquinolone action. Curr. Opin. Microbiol., **2**: 504-508.

**Eisenreich W., Schwarz M., Cartayrade A., et al.** (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. Chem. Biol., **5** (9): R221-233.

**Enright M.C.** (2003). The evolution of a resistant pathogen- the case of MRSA. Curr. Opin. Pharmacol., **3**: 474-479.

**Follens A., Veiga-Da-Cunha M., Merckx R., et al.** (1999). *acsI* of *Haemophilus influenzae* type a capsulation locus region II encodes a bifunctional ribulose 5-Phosphate reductase-CDP-ribitol pyrophosphorylase. J. Bacteriol., **181** (7): 2001-2007.

**Forsyth R.A., Haselbeck R.J., Ohlsen K.L., et al.** (2002). A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol., **43** (6): 1387-1400.

**Fournier, B., X. Zhao, T. Lu, et al.** (2000). Selective Targeting of Topoisomerase IV and DNA Gyrase in *Staphylococcus aureus*: Different Patterns of Quinolone-Induced Inhibition of DNA Synthesis. Antimicrobiol. Agent and Chemotherapy, **44** (8): 2160-2165.

**Foussard M., Cabantous S., Pedelacq JD., et al.** (2001). The molecular puzzle of two-component signaling cascades. Microbes and Infection, **3**: 417-424.

**Freiberg C.** (2001a). Persönliche Mitteilung.

**Freiberg C., Wieland B., Spaltmann F., et al.** (2001b). Identification of novel essential *Escherichia coli* genes conserved among pathogenic bacteria. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., **3** (3): 483-489.

**Friedman DI. and Court DL.** (1995). Transcription antitermination: the lambda paradigm update. Mol. Microbiol., **18**: 191-200.

**Fuangthong M., Herbig A.F., Bsat N., et al.** (2002). Regulation of the *Bacillus subtilis fur* and *perR* genes by RerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. J. Bacteriol., **184** (12): 3276-3286.

**Fukuto JM., Di Stefano EW., Burstyn JN., et al.** (1985). Mechanism of oxidation of N-hydroxyphentermine by superoxide. Biochemistry, **24** (15): 4161-4167.

**Gabrielsen M., Rohdich F., Eisenreich W., et al.** (2004). Biosynthesis of isoprenoids. A bifunctional IspDF enzyme from *Campylobacter jejuni*. Eur. J. Biochem., **271**: 3028-3035.

**Galinier A., Kravanja M., Engelmann R., et al.** (1998). New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. PNAS, **95**: 1823-1828.

**Geissendorfer M. and Hillen W.** (1990). Regulated expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis* using the Tn10 encoded *tet* regulatory elements. Appl. Microbiol. Biotechnol., **33** (6): 657-663.

**Gertz S., Engelmann S., Schmid R., et al.** (2000). Characterization of the  $\sigma^B$ -regulon in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., **182** (24): 6983-6991.

- Giachino P., Engelmann S. and Bischoff M.** (2001).  $\sigma^B$  Activity depends on *rsbU* in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., **183** (6): 1843-1852.
- Gillet Y., Issartel B., Vanhems P., et al.** (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet, **359**: 753-759.
- Gleich U., Pohl B., Weber-Heynemann J., et al.** (2003). Differential fluorescence induction in *Streptococcus agalactiae*. 55.DGHM-Tagung, **Poster MP049**.
- Gordon E.** (2000). The crystal structure of the penicillin-binding protein 2X from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. J. Mol. Biol., **299**: 477-485.
- Gottschalk G.** (1985). Bacterial Metabolism. Springer Verlag, **Second Edition**.
- Guzman L.M., Belin D., Carson M.J, et al.** (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P<sub>BAD</sub> promoter. J. Bacteriol., **177**: 4121-4130.
- Hancock I. and Baddiley J.** (1976). In vitro synthesis of the unit that links teichoic acid to Peptidolycan. J. Bacteriol., **125** (3): 880-886.
- Hanlon W.A., Inouye M. and Inouye S.** (1997). Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. Mol. Microbiol., **23** (3): 459-471.
- Hecht S., Eisenreich W., Adam P., et al.** (2001). Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. PNAS, **98** (26): 14837-14842.
- Hecker M. and Völker U.** (1998). Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. Mol. Microbiol., **29** 1129-1136.
- Heilmann C., Hussain M., Peters G., et al.** (1997). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. Mol. Microbiol., **24**: 1013-1024.
- Helmann J.D., Wu M.F.W., Gaballa A., et al.** (2003). The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. J. Bacteriol., **185** (1): 243-253.
- Henkin T.M.** (1996). Control of transcription termination in prokaryotes. Annu. Rev. Genet., **30**: 35-57.
- Herbig A.F. and Helmann J.D.** (2001). Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulation the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. Mol. Micro., **41** (4): 849-859.
- Hershberger E., Donabedian S., Konstantinou K., et al.** (2004). Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. Clin. Infect. Dis., **38** (1): 92-98.
- Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., et al.** (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother., **40**: 135-136.
- Holden M.T.G., Feil E.J., Lindsay J.A., et al.** (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. PNAS, **101** (26): 9786-9791.

- Hopper, D.C.** (1998). Bacterial Topoisomerases, Anti-Topoisomerases, and Anti-Topoisomerase Resistance. Clinical Infectious Disease, **27** (Suppl1): 54-63.
- Horsburgh M.J., Aish J. L., White I.J., et al.** (2002).  $\sigma^B$  modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional *rsbU* strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. J.Bacteriol., **184** (19): 5457-5467.
- Horsburgh M.J., Clements M.O., Crossley H., et al.** (2001). PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun., **69** (6): 3744-3754.
- Hueck C., Hillen W. and Saier M.H. Jr.** (1994). Analysis of a cis-active sequence mediating catabolite repression in gram-positive bacteria. Res. Microbiol., **145**: 503-518.
- Ingham C.J., Dennis J. and Furneaux** (1999). Autogenous regulation of transcription termination factor Rho and the requirement for Nus factors in *Bacillus subtilis*. Mol Micro, **31** (2): 651-663.
- Inoue R., Kaito C., Tanabe M., et al.** (2001). Genetic identification of two distinct DNA polymerases, DnaE and PolC, that are essential for chromosomal DNA replication in *Staphylococcus aureus*. Mol. Genet. Genomics, **266**: 564-571.
- Ito T., Ma X. X., Takeuchi F., et al.** (2004). Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrobial Agents Chemother.: 2637-2651.
- Ito T., Okuma K., Ma X. X., et al.** (2003). Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug. Resist. Update, **6**: 41-52.
- Jana M., Luong TT., Komatsuzawa H., et al.** (2000). A method for demonstrating gene essentiality in *Staphylococcus aureus*. Plasmid, **44**: 100-104.
- Jevons MP.** (1961). Celbenin-resistant staphylococci. BMJ, **1**: 124-125.
- Ji Y., Zhang B., Van Horn S.F., et al.** (2001). Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. Science, **293**: 2266-2269.
- Joeng S.M., Yoshikawa H. and Takahashi H.** (1993). Isolation and characterization of the *secE* homologue gene of *B. subtilis*. Mol. Microbiol., **10**: 133-142.
- Johnsson D., Mölling P., Stralin K., et al.** (2004). Detection of Pantone-Valentine leukocidin gene in *Staphylococcus aureus* by LightCycler PCR: clinical and epidemiological aspects. CMI, **10**: 884-889.
- Joyce C. M. and Grindley N. D. F.** (1984). Method for determining whether a gene of *Escherichia coli* is essential: application to the *polA* gene. J. Bacteriol., **158** (2): 636-643.
- Kaczmarek F.S., Zaniewski R.P., Gootz T.D., et al.** (2001). Cloning and functional characterization of an NAD<sup>+</sup>-dependent DNA ligase from *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., **183** (10): 3016-3024.
- Kim L., Mogk A. and Schumann W.** (1996). A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. Gene, **181**: 71-76.

- Klemperer N., Zhang D., Skangalis M., et al.** (2000). Cross-utilization of the  $\beta$  sliding clamp by replicative polymerases of evolutionary divergent organisms. J. Biol. Chem., **275** (34): 26136-26143.
- Kobayashi K., Ehrlich S.D., Albertini A., et al.** (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. PNAS, **100** (8): 4678-4683.
- Kobori T., Sasaki H., Lee W.C., et al.** (2001). Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nirtocompounds. J. Biol. Chem., **276** (4).
- Kollas AK., Duin EC., Eberl M., et al.** (2002). Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. FEBS Lett., **532** (3): 432-436.
- Kresken M., Hafner D., Schmitz FJ., et al.** (2001). PEG-Resistenzstudie. Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.
- Kullik I. and Giachino P.** (1997). The alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus*: regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. Arch. Microbiol., **167** 151-159.
- Kullik I., Giachino P. and Fuchs T.** (1998). Deletion of the alternative sigma factor  $\sigma^B$  in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. J. Bacteriol., **180** (18): 4814-4820.
- Kuroda M., Kuroda H., Oshima T., et al.** (2003). Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol., **49** (3): 807-821.
- Kuroda M., Kuwahara-Arai K. and Hiramatsu K.** (2000). Identification of the up- and downregulated genes in Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. Biochem. Biophys. Res. Communications, **269**: 485-490.
- Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., et al.** (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet, **357**: 1225-1240.
- Laipis P.J. and Ganesan A.T.** (1972). Deoxyribonucleic acid polymerase I-deficient mutant of *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem., **247** (18): 5867-5871.
- Lange B.M. and Croteau R.** (1999). Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. PNAS, **96** (24).
- LaPlante KL. and Rybak MJ.** (2004). Daptomycin- a novel antibiotic against Gram-positive pathogens. Expert Opin. Pharmacother., **5** (11): 2321-2331.
- Lazarevic V., Abellan FX., Möller S.B., et al.** (2002). Comparison of ribitol and glycerol teichoic acid genes in *Bacillus subtilis* W23 and 168: identical functions, similar divergent organization, but different regulation. Microbiol., **148**: 815-824.
- Leeb M.** (2004). A shot in the arm. Nature, **431**: 892-893.
- LeGrice S.F.J.** (1990). Regulated promoter for high-level expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis*. Methods Enzymol., **185**: 201-214.
- Leichert L.I.O., Scharf C. and Hecker M.** (2003). Global characterization of disulfide stress in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., **185** (6): 1967-1975.

- Leonard C.J., Aravind L. and Koonin E.V.** (1998). Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. Genome Research, **8**: 1038-1047.
- Levine C., Hiasa H. and M. K. J.** (1998). DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. BBA, **1400**: 29-43.
- Lewin B.** (1998). Molekularbiologie der Gene. Spektrum Lehrbuch. 6. Auflage
- Li J., Horwitz R., McCracken S., et al.** (1992). NusG, a new *E. coli* elongation factor required for processive antitermination of transcription by the N protein of phage  $\lambda$ . J. Biol. Chem., **267**: 6012-6019.
- Li J., Mason W. and Greenblatt J.** (1993). Elongation factor NusG interacts with termination factor  $\rho$  to regulate termination and antitermination of transcription. Genes Dev., **7**: 161-172.
- Li Z., Hiasa H., Kumar U., et al.** (1997). The *traE* gene of plasmid RP4 encodes a homologue of *Escherichia coli* DNA topoisomerase III. J. Biol. Chem., **272** (31): 19582-19587.
- Li Z., Montragon A., Hiasa H., et al.** (2000). Identification of a unique domain essential for *Escherichia coli* DNA topoisomerase III-catalysed decatenation of replication intermediates. Mol Micro, **35** (4): 888-895.
- Lichtenthaler H.K.** (2000). Sterols and isoprenoids. Biochemical Society, **28** (6): 785-789.
- Lindsay J.A. and Foster S.J.** (2001). *zur*: a  $Zn^{2+}$ -responsive regulatory element of *Staphylococcus aureus*. Microbiol., **147**: 1259-1266.
- Liochev S.I., Hausladen A. and Fridovich I.** (1999). Nitroreductase A is regulated as a member of the *soxRS* regulon of *Escherichia coli*. PNAS, **96**: 3537-3539.
- Liu D., Repaka P., Taremi S.S., et al.** (2002). Letter to the Editor: Backbone 1H, 15N and 13C resonance assignments of YqgF, an *Escherichia coli* protein of unknown structure and function. J. Biomol. NMR, **23**: 159-160.
- Liu D., Wang YS. and Wyss D.F.** (2003). Letter to the Editor: Solution structure of the hypothetical protein YqgF from *Escherichia coli* reveals an RNase H fold. J. Biomol. NMR, **27**: 389-392.
- Low RL., Rashbaum SA. and Cozzarelli NR.** (1976). Purification and characterization of DNA polymerase III from *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem., **251**: 1311-1325.
- Lowy F.D.** (1998). *Staphylococcus aureus* infections. New Engl. J. Medicine, **339** (8): 520-553
- Lundstrom TS. and Sobel JD.** (2004). Antibiotics for gram-positive bacterial infections: vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and daptomycin. Infect. Dis. Clin. North Am., **18** (3): 651-668.
- Lüttgen H., Rohdich F., Herz S., et al.** (2000). Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. PNAS, **97** (3): 1062-1067.

- Madec E., Laszkiewicz A., Iwanicki A., et al.** (2002). Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. Mol. Microbiol., **2**: 571-586.
- Maki H., Horiuchi T. and Kornberg A.** (1985). The polymerase subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. I. Amplification of the *dnaE* gene product and polymerase activity of the alpha subunit. J. Biol. Chem., **260**: 12982-12986.
- Martinez S., Lopez P., Espinosa M., et al.** (1987). Complementation of *Bacillus subtilis* *polA* mutants by DNA polymerase I from *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Gen. Genet., **210**: 203-210.
- McCalla D.R., Kaiser C. and Green M.H.L.** (1978). Genetics of nitrofurazone resistance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **133** (1): 10-16.
- McCalla D.R., Olive P., Tu Y., et al.** (1975). Nitrofurazone-reducing enzymes in *E. coli* and their role in drug activation in vivo. Can. J. Microbiol., **21** (10): 1484-1491.
- McCalla D.R., Reuvers A. and Kaiser C.** (1970). Mode of action of nitrofurazone. J. Bacteriol., **104** (3): 1126-1134.
- McDevitt D. and Rosenberg M.** (2001). Exploiting genomics to discover new antibiotics. TRENDS Microbiol., **9** (12): 611-617.
- McHenry CS** (1988). DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. Annu. Rev. Biochem., **57**: 519-550.
- Meens J., Klose M. and Freudl R.** (1994). The *Staphylococcus carnosus* *secE* gene: cloning, nucleotide sequence, and functional characterization in *Escherichia coli* mutant strains. FEMS Microbiol. Lett., **117** (1): 113-119.
- Merino M., Carbajo J., Nunez-Vergara L.J., et al.** (2000). Nitro radical anion formation from nitrofurantoin in carbon electrodes. Bol. Soc. Chil. Quim., **45** (1): 1-9.
- Miller C., Folkes LK., Mottley C., et al.** (2002b). Revisiting the interaction of the radical anion metabolite of nitrofurantoin with glutathione. Arch. Biochem. Biophys., **397** (1): 113-118.
- Miller D., Urdaneta V., Weltman A., et al.** (2002a). Public health dispatch: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*---Pennsylvania, 2002. Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report, **Oktober 11**, **51**: 902.
- Miyake K., Onaka H., Horinouchi S., et al.** (1994). Organization and nucleotide sequence of the *secE-nusG* region of *Streptomyces griseus*. Biochim. Biophys. Acta., **1217** (1): 97-100.
- Miyazaki E., Chen J., Ko C., et al.** (1999). The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (*orf159*) gene encodes an anti-sigma factor of SigB. J. Bacteriol., **181** (9): 2846-2851.
- Moch C., Schrögel O. and Allmansberger R.** (1998). The  $\sigma^D$ -dependent transcription of the *ywcG* gene from *Bacillus subtilis* is dependent on an excess of glucose and glutamate. Mol. Micro., **27** (5): 889-898.
- Moch C., Schrögel O. and Allmansberger R.** (2000). Transcription of the *nfrA-ywcH* Operon from *Bacillus subtilis* is specifically induced in response to heat. J. Bacteriol., **182** (16): 4384-4393.
- Mogk A., Völker A., Engelmann S., et al.** (1998). Nonnative proteins induce expression of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon. J. Bacteriol., **180**: 2895-2900.

- Moir D.T., Shaw K.J., Hare R.S., et al.** (1999). Genomics and antimicrobial drug discovery. Antimicrobial Agents Chemother., **43** (3): 439-446.
- Mongodin E., Finan J., Climo M.W., et al.** (2003). Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to Vancomycin. J. Bacteriol., **185** (15): 4638-4643.
- Moolenaar G.F., Moorman C. and Goosen N.** (2000). Role of the *Escherichia coli* nucleotide excision repair proteins in DNA replication. J. Bacteriol., **182** 20: 5706-5714.
- Morrissey J.A., Cockayne A., Brummell K., et al.** (2004). The staphylococcal ferritins are differentially regulated in response to iron and manganese and via PerR and Fur. Infect. Immun., **72** (2): 972-979.
- Mostertz J., Scharf C., Hecker M., et al.** (2004). Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. Microbiol., **150**: 497-512.
- Mukhopadhyay S., Kapatral V., Xu W., et al.** (1999). Characterization of a Hank's type serine/threonine kinase and serine/threonine phosphoprotein phosphatase in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., **181** 6615-6622.
- Munoz-Dorado J., Inouye S. and Inouye M.** (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. Cell, **67** (5): 995-1006.
- Novick R.** (2000). Pathogenicity factors and their regulation. Gram-positive pathogens. ASM Press, ed. by V. A. Fischetti et al.: 392-407.
- Nurse P., Levine C., Hassing H., et al.** (2003). Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **278** (7): 8653-8660.
- Ohlsen K.** (2001). Persönliche Mitteilung.
- O'Riordan K. and Lee J.C.** (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin. Microbiol. Reviews, **17** (1): 218-234.
- Okazaki R., Arisawa M. and Sugino A.** (1971). Slow joining of newly replicated DNA chains in DNA polymerase I-deficient mutants of *Escherichia coli*. PNAS, **68**: 2954-2957.
- Page J.E., Hause G., Raschke M., et al.** (2004). Functional analysis of the final steps of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing. Plant Physiol., **134**: 1401-1413.
- Palma M. and Cheung A.L.** (2001).  $\sigma^B$  activity is controlled by *rsbU* and an additional factor(s) during bacterial growth. Infect. Immun., **69** (12): 7858-7865.
- Pasman Z. and von Hippel P.H.** (2000). Regulation of Rho-dependent transcription termination by NusG is specific to the *Escherichia coli* elongation complex. Biochem., **39**: 5573-5585.
- Paterson E.S., Boucher S.E. and Lambert I.B.** (2002). Regulation of the *nfsA* gene in *Escherichia coli* by SoxS. J. Bacteriol., **184** (1): 51-58.
- Peterson F.J., Mason R.P., Hovsepian M., et al.** (1979). Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. J. Bio. Chem., **254** (10): 4009-4014.

**Petricikova K. and Petricek M.** (2003). Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme. Microbiol., **149**: 1609-1621.

**Potter D. and Miziorko H.M.** (1997). Identification of catalytic residues in human mevalonate kinase. J. Biol. Chem., **272**: 25449-25454.

**Projan S. J.** (2000). Antibiotic resistance in the Staphylococci. Gram-positive Pathogens. ASM press, ed. by V. A. Fischetti et al.: 463-470.

**Pruss G. J., Manes S.H. and Drlica K.** (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants; increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. Cell, **31**: 35-42.

**Puttikhunt C., Nihara T. and Yamada Y.** (1995). Cloning, nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *nusG* gene of *S. coelicolor*. Mol. Gen. Genet., **247**: 118-122.

**Rachid S., Ohlsen K., Wallner U., et al.** (2000). Alternative transcription factor  $\sigma^B$  is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. J. Bacteriol., **182** (23): 6824-6826.

**Rajagopal L., Clancy A. and Rubens C.E.** (2003). A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylates an inorganic pyrophosphatase and affects growth, cell segregation, and virulence. J. Biol. Chem., **278** (16): 14429-14441.

**Reidhaar-Olsen J.F., Rhees B.K. and Hammer J.** (2001). Genomics approaches to drug discovery. J. Cell. Biochem. Suppl., **37**: 110-119.

**Reizer J., Hoischen C., Titgemeyer F., et al.** (1998). A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. Mol. Micro., **27**: 1157-1169.

**Robinson D.A. and Enright M.C.** (2004). Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Inf. Disease, **10**: 92-97.

**Robinson V.L., Buckler D.R. and S. A.M.** (2000). A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. Nature Structural Biol., **7** 8: 626-633.

**Rohdich F., Wungsinataweekul J., Fellermeier M., et al.** (1999). Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. PNAS, **96** (21): 11758-11763.

**Rohmer M.** (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in algae and higher plants. Nat. Prod. Rep., **16** (5): 565-574.

**Rohrer S., Ehlert K., Tschierske M., et al.** (1999). The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. PNAS, **96**: 9351-9356.

**Rupp M.E., Fey P.D., Heilmann C., et al.** (2001). Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. J. Infect. Dis., **183**: 1038-1042.

**Sancar A.** (1994). Mechanisms of DNA excision repair. Science, **266**: 1954-1956.

**Sastry S.S. and Jayaraman R.** (1984). Nitrofurantoin-resistant mutants of *Escherichia coli*: Isolation and mapping. Mol. Gen. Genet., **196**: 379-380.

- Schofield MA., Agbunag R., Michaels ML., et al.** (1992). Cloning and sequencing of *Escherichia coli mutR* shows its identity to *topB*, encoding topoisomerase III. J. Bacteriol., **174** (15): 5168-5170.
- Sharma R. C. and Smith K. C.** (1987). Role of DNA Polymerase I in postreplication repair: a reexamination with *Escherichia coli ΔpolA*. J. Bacteriol., **169** 10: 4559-4564.
- Shi L., Potts M. and K. P.J.** (1998). The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. FEMS Microbiol. Reviews, **22**: 229-253.
- Sievert D. M., Boulton M. L., Stoltman G., et al.** (2002). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. . Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report, **July 5, 51**: 565-567.
- Singh GS.** (2004). Beta-lactams in the new millennium. Part-II: cepheems, oxacepheems, penams and sulbactam. Mini Rev. Med. Chem., **4** (1): 93-109.
- Squires C.L. and Zaporjets D.** (2000). Proteins shared by the transcription and translation machines. Annu. Rev. Microbiol., **54**: 775-798.
- Storz G. and Imlay J.A.** (1999). Oxidative Stress. Curr. Op. Microbiol., **2**: 188-194.
- Stryer L.** (1996). Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, **4. Auflage**.
- Sullivan S.L. and Gottesman M.** (1992). Requirement for *E. coli* NusG protein in factor-dependent transcription termination. Cell, **68**: 989-994.
- Swaney S.M., Aoki H., Ganoza M.C., et al.** (1998). The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., **31**: 735-743.
- Takahashi J., Komatsuzawa H., Yamada S., et al.** (2002). Molecular characterization of an *atl* null mutant of *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Immunol., **46** (9): 601-612.
- Tepljakov A., Obmolova G., Tordova M., et al.** (2002). Crystal structure of the YjeE protein from *Haemophilus influenzae*: a putative Atpase involved in cell wall synthesis. Proteins, **48**: 220-226.
- Timson D.J., Singleton M.R. and Wigley D.B.** (2000). DNA ligases in the repair and replication of DNA. Mutat. Res., **460**: 301-318.
- Timson D.J. and Wigley D.B.** (1999). Functional domains of an NAD<sup>+</sup>-dependent DNA ligase. J. Mol. Biol., **285**: 73-83.
- Torres M., Balada JM., Zellars M., et al.** (2004). In vivo effect of NusB and NusG on rRNA transcription antitermination. J. Bacteriol., **186** (5): 1304-1310.
- Tsiodras S., Gold H. S., Sakoulas G., et al.** (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. The Lancet, **358** (9277): 207-208.
- Tu Y. and McCalla D.R.** (1975). Effects of activated nitrofurans on DNA. Biochim. Biophys. Acta., **402** (2): 142-149.
- Udo H., Munoz-Dorado J., Inouye M., et al.** (1995). *Myxococcus xanthus*, a gram-negative bacterium, contains a transmembrane protein serine/threonine kinase that blocks the secretion of beta-lactamase by phosphorylation. Genes Dev, **9** (8): 9972-983.

Uematsu N., Eda S. and Yamamoto K. (1997). An *Escherichia coli topB* mutant increases deletion and frameshift mutations in the *supF* target gene. Mutat. Res., **383** (3): 223-230.

Uziel O., Borovok I., Schreiber R., et al. (2004). Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress. J. Bacteriol., **186** (2): 326-334.

Vagner V., Dervyn E. and Ehrlich S.D. (1998). A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. Microbiol., **144**: 3097-3104.

Villani G., Canosi U., Fortunato A., et al. (1974). Properties of a *Bacillus subtilis* strain lacking DNA polymerase I. Nucleic-Acid Res., **1** 3: 461-477.

Vitikainen M., Pummi T., Airaksinen U., et al. (2001). Quantitation of the capacity of the secretion apparatus and requirement for PrsA in Growth and Secretion of  $\alpha$ -Amylase in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., **183** (6): 1881-1890.

Völker U., Maul B. and Hecker M. (1999). Expression of the  $\sigma_B$ -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., **181**: 3942-3948.

Voynova N.E., Rios S. E. and Miziorko H.M. (2004). *Staphylococcus aureus* mevalonate kinase: isolation and characterization of an enzyme of the isoprenoid biosynthetic pathway. J. Bacteriol., **186** (1): 61-67.

Wahlström E., Vitikainen M., Kontinen V.P., et al. (2003). The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in *Bacillus subtilis*. Microbiol., **149**: 569-577.

Wang Q.M., Peery R.B., Johnson R.B., et al. (2001). Identification and characterization of a monofunctional glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., **183** (16): 4779-4785.

Washburn R.S., M. A., Bryant AP., et al. (2001). *rho* is not essential for viability or virulence in *S. aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., **45** (4): 1099-1103.

Watanabe M., Nishino T., Takio K., et al. (1998). Purification and characterization of wild-type and mutant "classical" nitroreductases of *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem., **273** (37): 23922-23928.

Weber H., Engelmann S., Becher D., et al. (2004). Oxidative stress triggers thiol oxidation in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Staphylococcus aureus*. Mol. Micro., **52** (1): 133-140.

Whiteway J., Koziarz P., Veall J., et al. (1998). Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of *nfsA* and *nfsB* in development of resistance to 5-nitrofur derivatives in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **180** (21): 5529-5539.

Whoriskey S.K., Schofield MA. and Miller JH. (1991). Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants with altered rates of deletion formation. Genetics, **127**: 21-30.

Wieland KP., Wieland B. and Götz F. (1995). A promoter-screening plasmid and xylose-inducible, glucose-repressible expression vectors from *Staphylococcus carnosus*. Gene, **158**: 91-96.

Wilding E.I., Brown J.R., Bryant A.P., et al. (2000). Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci. J. Bacteriol., **182**: 4319-4327.

**Williams R.C., Rees M.L., Jacobs M.F., et al.** (2003). Production of *Bacillus anthracis* protective antigen is dependent on the extracellular chaperone, PrsA. J. Biol. Chem., **278** (20): 18056-18062.

**Wu S., De Lencastre H. and Tomasz A.** (1996). Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. J. Bacteriol., **178** (20): 6036-6042.

**Xia M., Lunsford R.D., McDevitt D., et al.** (1999). Rapid method for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. Plasmid, **42**: 144-149.

**Yamada M., Espinosa-Aguirre J.J., Watanabe M., et al.** (1997). Targeted disruption of the gene encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538. Mutation Research, **375**: 9-17.

**Yamada S., Sugai M., Komatsuzawa H., et al.** (1996). An autolysin ring associated with cell separation of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., **178** (6): 1565-1571.

**Yansura D.G. and Henner D.J.** (1984). Use of the *Escherichia coli lac* repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. PNAS, **81**: 439-443.

**Yeats C., Finn R.D. and Bateman A.** (2002). The PASTA domain: a  $\beta$ -lactam-binding domain. TRENDS Biochem. Sciences, **27** (9): 438-440.

**Youngman R.J., Osswald W.F. and Elstner E.F.** (1982). Mechanisms of oxygen activation by nitrofurantoin and relevance to its toxicity. Biochem. Pharmacol., **31** (23): 3723-3729.

**Zellars M. and Squires C.L.** (1999). Antiterminator-dependent modulation of transcription elongation rates by NusB and NusG. Mol. Microbiol., **32** (6): 1296-1304.

**Zenno S., Kobori T., Tanokura M., et al.** (1998). Purification and characterization of NfrA1, a *Bacillus subtilis* nitro/flavin reductase capable of interacting with the bacterial luciferase. Biosci. Biotechnol. Biochem., **62** (10): 1978-1987.

**Zenno S., Koike H., Kumar A.N., et al.** (1996a). Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase. J. Bacteriol., **178** (15): 4508-4514.

**Zenno S., Koike H., Tanokura M., et al.** (1996b). Conversion of NfsB, a minor *Escherichia coli* Nitroreductase, to a flavin reductase similar in biochemical properties to FRaseI, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*, by a single amino acid substitution. J. Bacteriol., **178** (15): 4731-4733.

**Zhang H. L., Malpure S. and R. J. DiGate** (1995). *Escherichia coli* DNA Topoisomerase III is a site-specific DNA binding protein that binds asymmetrically to its cleavage site. J. Biol. Chem., **270** (40): 23700-23705.

**Zhang L., Fan F., Palmer L.M., et al.** (2000a). Regulated gene expression in *Staphylococcus aureus* for identifying conditional lethal phenotypes and antibiotic mode of action. Gene, **255**: 297-305.

**Zhang L., Rosander A., Jacobsson K., et al.** (2000b). Expression of staphylococcal protein Sbi is induced by human IgG. FEMS Immunol. Med. Microbiol., **28**: 211-218.

**Zheng M., Aslund F. and Storz G.** (1998). Activation of the OxyR transcriptional factor by reversible disulfide bond formation. Science, **279**: 1718-1721.

**Zheng M. and Storz G.** (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. Biochem. Pharmacol., **59**: 1-6.

**Zheng M., Wang X., Templeton L.J., et al.** (2001). DNA Microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. J. Bacteriol., **183** (15): 4562-4570.

**Zhou T., Daugherty M., Grishin NV., et al.** (2000). Structure and mechanism of homoserine kinase: prototype for the GHMP kinase superfamily. Structure Fold Des., **8** (15): 1247-1257.

**Zhu Q., Pongpech P. and R. J. DiGate** (2001). Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. PNAS, **98** (17): 9766-9771

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
CFU	Colony forming unit
D-Ala	D-Alanin
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DXP	1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate-Weg
EDTA	Ethylendiamintertraacetat
ESTPK	<u>e</u> karyotic-type <u>S</u> er/ <u>T</u> hr <u>p</u> rotein <u>k</u> inase
et al.	et altera (und andere)
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
i. p.	intra peritoneal (in die Bauchhöhle)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LD <sub>50</sub>	letale Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere stirbt
M	molar
MCS	<u>M</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MWCO	<u>M</u> olecular <u>w</u> eight <u>c</u> ut <u>o</u> ff
nt	Nukleotide

---

µg	Microgramm
µl	Microliter
ng	Nanogramm
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
OD <sub>340</sub>	Optische Dichte bei 340 nm Wellenlänge
ORF	Offener Leserahmen ( <u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame)
Ori	Replikationsursprung
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft
PVL	Panton-Valentine Leukocidin
RBS	Ribosomen-Bindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
s	Sekunde
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSC	Standard Saline Citrate
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
V	Volt
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 8.2 Publikationen und Präsentationen

**Streker K., Freiberg C., Labischinski H., Hacker J., Ohlsen K.** *Staphylococcus aureus* NfrA (SA0367) is a FMN-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response J. Bacteriol., (Accepted Dec., 2004).

**Lührmann A., Streker K., Schüttfort A., Daniels J.J.D., Haas A.**(2001). *Afipia felis* induces uptake by macrophages directly into a nonendocytic compartment. PNAS, **98** (13): 7271-7276.

**Streker K., Freiberg C., Labischinski H., Hacker J., Ohlsen K.** YwcG is not essential in *Staphylococcus aureus* and possesses NADPH-Oxidase activity. Posterpräsentation auf der VAAM-Jahrestagung, 28.03-31.03.2004 in Braunschweig.

**Streker K., Ziebuhr W., Hacker J., Freiberg C., Labischinski H., Ohlsen K.** Investigation of controlled gene expression systems in *Staphylococcus aureus*. Posterpräsentation auf der DGHM-Tagung 28.09-1.10.2003 in Dresden.

### 8.3 Lebenslauf

Karin Streker

geb. am 22.01.1975 in Stuttgart

#### Schulausbildung

1981-1985    Grundschule in Großaspach

1985-1994    Gymnasium in Backnang

6/1994        Abitur

#### Studium

11/1994        Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Würzburg:  
Schwerpunkte Mikrobiologie (Hauptfach), Genetik, Zell- und  
Entwicklungsbiologie

9/1997-12/1997    Praktikum an der „University of California, San Diego“ in der  
Arbeitsgruppe von Prof. M. H. Saier Jr.

3/1999-01/2000    Diplomarbeit an der Universität Würzburg am Lehrstuhl für  
Mikrobiologie unter Anleitung von PD Dr. A. Haas,  
Tiltel der Diplomarbeit: „Reifung von Makrophagen, die fakultativ  
intrazelluläre Bakterien enthalten“.

01/2000        Abschluss: Diplom-Biologin  
Gesamtnote: sehr gut

2/2000-10/2000    Abschließende Experimente im Anschluss an die Diplomarbeit bei  
PD Dr. A. Haas

seit 11/2000      Anfertigung der Dissertation am Institut für Molekulare  
Infektionsbiologie der Universität Würzburg unter Anleitung von  
Prof. Dr. Dr. h.c. mult. J. Hacker

Würzburg, Januar 2005