

**Molekularbiologische Untersuchungen zur
Eignung Virulenz-relevanter Faktoren als
Zielstrukturen für die Entwicklung neuer
Antibiotika gegen *Staphylococcus aureus***

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

vorgelegt von
Antje Michel
aus Hamburg

Würzburg 2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender:

.....

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

2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig 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, Mai 2005

Antje Michel

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 sowie der Ermöglichung der Teilnahme an verschiedenen Tagungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Knut Ohlsen für das ständige Interesse, die Diskussionsbereitschaft und die tatkräftige Hilfe am Fortgang dieser Arbeit sowie die Offenheit für neue Ideen.

Bei Dr. Joachim Ullrich von Intervet Innovation GmbH möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere für die interessante Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Zielgene.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Jürgen Kreft, Universität Würzburg, für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Franziska Agerer und PD Dr. Christof Hauck vom Zentrum für Infektionsforschung möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, interessante Diskussionen und Übernahme der Zellkulturarbeiten bedanken.

Prof. Dr. Mathias Herrmann und Karin Hilgert, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Saarland, danke ich für die Analyse der Fibronectin-Bindungskapazität der $\Delta clpP$ -Mutante.

Prof. Dr. Michael Hecker und Dr. Susanne Engelmann, Institut für Mikrobiologie, Universität Greifswald, gilt mein Dank für die Ermöglichung eines Einblicks in die Proteomanalyse und eines netten Aufenthaltes in Greifswald.

Bei Prof. Dr. G. Krohne, Biozentrum Würzburg, bedanke ich mich für die Ermöglichung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen der $\Delta clpP$ -Mutante.

Dr. Christian Hüttinger gilt mein Dank für die sehr hilfreiche Unterstützung bei der Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie sowie die Auswertung und Durchführung der Rattenversuche.

Vielen Dank an die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts, die stets hilfsbereit waren und für ein gutes Arbeitsklima sorgten. Insbesondere danke ich Hilde Merkert, Karin Streker, Annika Rademacher, Hennes Kränzler und Uschi Wallner.

Vielen Dank an meine Familie für die Ermöglichung des Studiums und die moralische Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Eike für seine große Unterstützung und Geduld.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	5
SUMMARY	7
1. EINLEITUNG	9
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.2. Identifizierung neuer Targets für die Entwicklung antimikrobieller Strategien	10
1.2.1. Ausgewählte Zielgene	17
1.2.1.1. ClpP, die proteolytische Untereinheit der ATP-abhängigen Proteasen	18
1.2.1.2. Das ArlRS-Zwei-Komponenten-System	19
1.2.1.3. Die Prolinpermease PutP	20
1.2.1.4. Das Purinbiosynthese-Enzym PurH	21
1.2.1.5. Das SsrA-SmpB-System und der Trans-Translationsprozess	22
1.3. Zielsetzung der Arbeit	25
2. MATERIAL	26
2.1. Geräte	26
2.2. Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Enzyme und verwendete Kits	27
2.3. Medien, Agarplatten und Antibiotika	27
2.4. Bakterienstämme	30
2.5. Oligonukleotide	31
2.6. Plasmide	34
3. METHODEN	36
3.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren	36
3.1.1. Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	36
3.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
3.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. aureus</i>	37
3.1.4. Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. aureus</i>	37
3.1.5. Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>S. aureus</i> (Qiagen RNeasy-Kit)	38
3.1.6. Aufreinigung von Nukleinsäuren	39
3.1.7. Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle	39
3.1.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
3.1.8.1. Standard-PCR	40
3.1.8.2. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR, semiquantitativ)	41
3.1.9. Sequenzierung	42
3.1.10. Klonierung	42
3.1.10.1. Restriktion von DNA	42
3.1.10.2. Dephosphorylierung von Plasmiden	42

3.1.10.3.	Ligation von Restriktionsfragmenten	42
3.1.10.4.	Ligation von PCR-Produkten mit dem pGEM-T Vektor-System	43
3.1.11.	Transformation von DNA	43
3.1.11.1.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (CaCl ₂ -Methode)	43
3.1.11.2.	Herstellung elektrokompeter <i>S. aureus</i> -Zellen	43
3.1.11.3.	Transformation von <i>E. coli</i> mit der CaCl ₂ -Methode	44
3.1.11.4.	Elektroporation von <i>S. aureus</i>	44
3.1.11.5.	Phagentransduktion	44
3.1.12.	Standard-Agarosegelelektrophorese	45
3.1.13.	Southern Blot-Analyse	46
3.1.13.1.	Markierung der Sonde, Hybridisierung und Entwicklung des Blots	46
3.1.14.	Denaturierende Agarosegelelektrophorese	47
3.1.15.	Northern Blot-Hybridisierung	48
3.2.	Herstellung von Deletionsmutanten	48
3.2.1.	Konstruktion von Vektoren für die Herstellung von Deletionsmutanten	48
3.2.2.	Integration in das Genom	49
3.3.	Arbeiten mit DNA-Microarrays	51
3.3.1.	Markierung von cDNA mit Fluoreszenzfarbstoffen	51
3.3.2.	Hybridisierung von DNA-Microarrays	52
3.3.3.	Einscannen und bioinformatische Analyse der Microarray-Daten	53
3.4.	Computerunterstützte Suche nach konservierten Operator-sequenzen	53
3.5.	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	54
3.6.	Adhärenzassay	54
3.7.	Autolyseassay (Mani, 1993)	55
3.8.	Infektionsexperimente mit 293T-Epithelzellen	55
3.9.	Infektionsversuche in einem Katheter-assoziierten Modell in der Ratte	56
3.10.	Verwendete Websites und Computerprogramme	57
4.	ERGEBNISSE	58
4.1.	Herstellung und Überprüfung einer <i>clpP</i>-Deletionsmutante	58
4.1.1.	Phänotypische Charakterisierung der <i>clpP</i> -Deletionsmutante	59
4.1.1.1.	Wachstum des Stamme 8325Δ <i>clpP</i> in Flüssigkultur bei verschiedenen Temperaturen	59
4.1.1.2.	Temperaturabhängige <i>clpP</i> -Transkription in <i>S. aureus</i> 8325	62
4.1.1.3.	Kolonie- und Zellmorphologie von 8325 Δ <i>clpP</i>	63
4.1.1.4.	Wachstum von 8325Δ <i>clpP</i> unter anaeroben Bedingungen	64
4.1.1.5.	Triton X-100 induzierte Autolyse von 8325 Δ <i>clpP</i>	66
4.1.1.6.	Veränderte physiologische Eigenschaften der 8325Δ <i>clpP</i> -Mutante	66
4.1.1.7.	Hämolytische Aktivität der 8325Δ <i>clpP</i> -Mutante	67
4.1.1.8.	Adhärenz-Assay der 8325Δ <i>clpP</i> -Mutante an Polystyren	68
4.1.1.9.	Internalisierung der 8325Δ <i>clpP</i> -Mutante durch 293T-Epithelzellen	68

4.1.1.10.	Überprüfung der Fibronectin-Bindungs­kapazität von 8325 Δ <i>clpP</i>	69
4.1.2.	Differenzielle Transkriptomanalyse der 8325 Δ <i>clpP</i> -Mutante mittels Microarray-Hybridisierung	70
4.1.2.1.	Einfluss der <i>clpP</i> -Deletion auf die Transkription Virulenzfaktor-kodierender Gene	74
4.1.2.2.	Zuordnung der in der Δ <i>clpP</i> -Mutante deregulierten Gene in regulatorische Transkriptionseinheiten	75
4.1.2.3.	Einfluss der <i>clpP</i> -Deletion auf die Hitzeschock-Genexpression	77
4.1.2.4.	Vergleich der in <i>B. subtilis</i> Spx-regulierten Gene mit differenziell transkribierten Genen in <i>S. aureus</i> 8325 Δ <i>clpP</i>	79
4.1.2.5.	Identifizierung potenziell Fur-regulierter Gene in Δ <i>clpP</i>	82
4.1.2.6.	Identifizierung potenziell PerR-regulierter Gene in Δ <i>clpP</i>	83
4.1.2.7.	Identifizierung potenziell MntR-regulierter Gene in Δ <i>clpP</i>	84
4.1.2.8.	Identifizierung Potenziell LexA-regulierter Gene in Δ <i>clpP</i>	85
4.1.2.9.	Identifizierung potenziell σ^B -abhängiger Gene in Δ <i>clpP</i>	86
4.1.2.10.	Identifizierung potenziell YycF-regulierter Gene in Δ <i>clpP</i>	90
4.1.2.11.	Identifizierung potenziell Fnr/ArcR-regulierter Gene in Δ <i>clpP</i>	92
4.1.2.12.	Identifizierung potenziell NreBC-regulierter Gene in Δ <i>clpP</i>	93
4.1.2.13.	Identifizierung potenziell Katabolit-regulierter Gene in Δ <i>clpP</i>	95
4.1.2.14.	Überprüfung der veränderten Transkription ausgewählter Gene der 8325 Δ <i>clpP</i> -Mutante	97
4.1.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 4.1.	99
4.2.	Herstellung und Überprüfung <i>arlS</i>- und <i>arlR</i>-Deletionsmutanten	100
4.2.1.	Phänotypische Charakterisierung der <i>arlS</i> und <i>arlR</i> Deletionsmutanten	102
4.2.1.1.	Adhärenz-Assay der Δ <i>arlR</i> - und Δ <i>arlS</i> -Mutanten an Polystyren	102
4.2.1.2.	Hämolytische Aktivität der 8325 Δ <i>arlR</i> - und Δ <i>arlS</i> -Mutanten	103
4.2.1.3.	Triton X-100 induzierte Autolyse der Δ <i>arlR</i> - und Δ <i>arlS</i> -Mutanten	103
4.2.1.4.	Internalisierung der 8325 Δ <i>arlR</i> - und Δ <i>arlS</i> -Mutante durch 293T-Zellen	105
4.2.1.5.	Infektionsversuche mit den Mutanten 377 Δ <i>arlS</i> und COL Δ <i>arlR</i> in einem Katheter-assoziierten Rattenmodell	105
4.2.2.	Differenzielle Transkriptomanalyse der 8325 Δ <i>arlR</i> -Mutante mittels Microarray-Hybridisierung	107
4.2.2.1.	Einfluss der <i>arlR</i> -Deletion auf die Transkription von Virulenzfaktoren	108
4.2.2.2.	Auswirkung der <i>arl</i> -Inaktivierung auf die RNAIII-Expression in 8325 Δ <i>arlR</i>	110
4.2.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 4.2	111
4.3.	Herstellung und Überprüfung der <i>putP</i>- und <i>purH</i>-Deletionsmutanten	112
4.3.1.	Infektionsversuche mit der Mutante MA12 Δ <i>purH</i> in einem Rattenmodell	115
4.3.2.	Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 4.3	116
4.4.	Inaktivierung der Gene <i>ssrA</i> und <i>smpB</i>	117
4.4.1.	Herstellung der <i>smpB::ermB</i> - und <i>ssrA::ermB</i> -Insertionsmutanten in <i>S. aureus</i> MA12 und COL	117
4.4.2.	Herstellung einer Deletionsmutante <i>S. aureus</i> 8325 Δ <i>ssrA</i>	122
4.4.3.	Herstellung konditional letaler Mutanten	123

4.4.3.1.	Kontrollierte Expression der Gene <i>smpB</i> - und <i>ssrA</i> durch das Xylose-Regulon	125
4.4.3.2.	Antisense-RNA-Strategie zur Hemmung der Expression der Gene <i>smpB</i> und <i>ssrA</i>	128
4.4.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 4.4	132
5.	DISKUSSION	133
5.1.	Die Inaktivierung von <i>clpP</i> in <i>S. aureus</i> 8325 führt zu der veränderten Transkription unterschiedlicher globaler Regulons und beeinflusst die Virulenz	133
5.2.	.Die Inaktivierung von <i>arlRS</i> führt zu einer Attenuierung der Virulenz und einem stark veränderten globalen Transkriptionsprofil	146
5.3.	Die Deletion von <i>purH</i> führt zu einer Attenuierung von <i>S. aureus in vivo</i>	147
5.4.	Essentialität der Gene <i>smpB</i> und <i>ssrA</i> in <i>S. aureus</i>	148
6.	LITERATURVERZEICHNIS	152
7.	ANHANG	170
7.1.	Microarray-Daten $\Delta clpP$	170
7.2.	Microarray-Daten $\Delta arlR$	181
7.3.	Abkürzungsverzeichnis	191
7.4.	Publikationen und Präsentationen	193
7.5.	Lebenslauf	194

ZUSAMMENFASSUNG

Staphylococcus aureus ist ein bedeutender opportunistischer Krankheitserreger, der eine Vielzahl von Infektionen in Menschen und Tieren hervorrufen kann. Das Krankheitsbild reicht von leichten Hautinfektionen bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen wie Endokarditis, Sepsis oder Pneumonien. *S. aureus* spielt eine wichtige Rolle bei nosokomial erworbenen Infektionen, die vor allem bei immungeschwächten Patienten vorkommen. Besonders die Antibiotikaresistenzentwicklung von *S. aureus*-Stämmen ist problematisch. Neben der Etablierung von Methicillin-resistenten Stämmen (MRSA) in Krankenhäusern, wurden bereits zahlreiche weitere Resistenzen beschrieben. Als wirksame Antibiotika können zur Zeit oft nur noch Vancomycin, Synercid oder Linezolid zur Therapie eingesetzt werden. Jedoch wurde bereits von Isolaten mit mittlerer bis hoher Vancomycin-, Synercid- oder Linezolid-Resistenz berichtet. Die alarmierende Resistenzentwicklung in *S. aureus* verdeutlicht, dass die Entwicklung neuer Antibiotika und die Identifizierung neuer bakterieller Angriffsstrukturen dringend erforderlich ist.

Gängige antiinfektive Therapeutika sind gegen die bakterielle Zellwandsynthese, den DNA- und RNA-Stoffwechsel oder die Proteinbiosynthese gerichtet. In dieser Arbeit sollten Virulenz-relevante Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Antibiotika untersucht werden. Insgesamt wurden sieben Gene analysiert, von denen vier zu Anfang dieser Arbeit in *S. aureus* noch nicht charakterisiert waren. Die Zielgene (*clpP*, *purH*, *ssrA* und *smpB*) in *S. aureus* sollten deletiert werden, um ihre Überlebensnotwendigkeit *in vitro*- und *in vivo* zu überprüfen. Eine Deletion gelang bei den Genen *clpP* und *purH*, die somit als nicht essenziell in *S. aureus* zu betrachten sind. Die bereits zuvor als nicht-essenziell charakterisierten Gene *arlR*, *arlS* und *putP* wurden deletiert und die Mutanten $\Delta clpP$, $\Delta arlR$, $\Delta arlS$, $\Delta purH$ und $\Delta putP$ wurden phänotypisch in Hinsicht auf ihren Einfluss auf die Pathogenität in *S. aureus* analysiert. Die differenzielle Genexpression der Mutanten $\Delta clpP$ und $\Delta arlR$ wurde mit Hilfe von Microarray-Hybridisierungsexperimenten untersucht.

Die $\Delta clpP$ -Mutante zeigte einen starken Wachstumsdefekt bei verschiedenen Temperaturen (30, 37, 42°C) und war nicht mehr in der Lage bei 20°C zu wachsen. Ebenso war das Wachstum unter anaeroben Bedingungen stark beeinträchtigt. Der Stamm $\Delta clpP$ wies eine verringerte hämolytische Aktivität sowie eine verminderte Adhärenz an Polystyren auf. Außerdem konnte eine stark erhöhte autolytische Aktivität in einem Triton X-100-Assay beobachtet werden. In einem Invasions-

Zellkulturassay mit 293T-Epithelzellen konnte eine ~10-fach erhöhte Invasivität im Vergleich zu dem isogenen Wildtyp festgestellt werden. Die Komplementierung der $\Delta clpP$ -Mutante durch Einführung eines *clpP*-Expressionsvektors führte nahezu bei allen getesteten Bedingungen zur Wiederherstellung des wildtypischen Phänotyps.

Die Transkriptomanalyse der $\Delta clpP$ -Mutante ergab eine deutliche Veränderung in der Genexpression (15 % aller Gene). Eine computerunterstützte Analyse der Upstreambereiche der deregulierten Gene führte zu der Identifizierung verschiedener Regulons, die bei der bakteriellen Antwort auf verschiedene Stressbedingungen eine Rolle spielen. Die *clpP*-Deletion betrifft besonders Regulatoren, deren Aktivität in Abhängigkeit zu veränderten Redox-Bedingungen reguliert wird, wie z. B. verschiedenen Stressbedingungen und Anaerobiose.

Die Konstruktion der $\Delta arlR$ - und $\Delta arlS$ -Mutanten führte zu einer gesteigerten hämolytischen Aktivität, einer erhöhten Adhärenz an Polystyren sowie einer erhöhten autolytischen Aktivität in Triton X-100-Assays. Die Internalisierungsrate durch 293T-Epithelzellen war vermindert. Die $\Delta arlR$ -Mutante wurde in einem Katheter-assoziierten Infektionsmodell in Ratten eingesetzt. Die kompetitive Infektion mit Mutante und Wildtyp ergab einen deutlichen Nachteil bei der Etablierung einer Infektion durch die Mutante.

Die Transkriptomanalyse der 8325 $\Delta arlR$ -Mutante in der exponentiellen und in der stationären Phase unterstreicht den großen Einfluss des ArlRS-Zwei-Komponenten-Systems auf die Regulation der Genexpression in *S. aureus*. In der exponentiellen Phase wurden insgesamt 5 % und in der stationären Phase 15 % der Gene differenziell exprimiert.

$\Delta purH$ - und $\Delta putP$ -Mutanten wiesen *in vitro* keine Veränderungen im Wachstumsverhalten, der Biofilmbildung oder hämolytischen Aktivität auf. In einem Infektionsmodell in Ratten führte die Deletion von *purH* in dem *S. aureus*-Stamm MA12 zu einer signifikanten Verminderung der Virulenz.

Die Herstellung von *smpB*- und *ssrA*-Deletionsmutanten verlief ohne Erfolg. Es wurde versucht, einen direkten Nachweis für den essenziellen Charakter dieser Gene durch den Einsatz konditional letaler Expressionssysteme zu erbringen. Weder der Austausch des wildtypischen durch einen regulierbaren Promotor noch eine Antisense-RNA-Strategie war für eine eindeutige Klärung dieser Frage ausreichend. Es konnte durch diese Arbeit jedoch gezeigt werden, dass die Antisense-RNA-Strategie eine Beeinträchtigung des Wachstums von *S. aureus* bewirkt.

Summary

Staphylococcus aureus is an important opportunistic pathogen that can cause a wide range of diseases in humans and animals. 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 a rising number of patients is becoming increasingly complicated. The remaining 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 emphasises the need to develop new antibiotics.

Currently, well-established therapeutics targeting processes of cell wall biosynthesis, DNA and RNA metabolism, and protein biosynthesis. This study comprises the investigation of putative targets of novel antibiotics. Therefore, seven target genes were selected and functionally characterised *in vitro* and *in vivo*. Four of these genes have not been characterised in *S. aureus* at the beginning of this study. A deletion mutagenesis approach for these genes (*clpP*, *purH*, *ssrA* and *smpB*) should provide an indication of their essentiality for the organism. *clpP* and *purH* could be successfully inactivated, supporting their non-essential role in *S. aureus*.

The non-essential genes *arlR*, *arlS* and *putP* were inactivated and different phenotypic studies of the *S. aureus* deletion mutants $\Delta clpP$, $\Delta arlR$, $\Delta arlS$, $\Delta purH$ and $\Delta putP$ were performed. Whole genome microarray analysis was applied on $\Delta clpP$ and $\Delta arlR$ mutants to study the manifold transcriptional changes by the inactivation of these two regulators in *S. aureus*.

The growth rate of $\Delta clpP$ was strongly reduced at different temperatures (30°C, 37°C, 42°C) and completely inhibited at 20°C. Growth was highly impaired under anaerobic conditions. Moreover, ClpP deficiency resulted in a reduced hemolytic activity and diminished adherence to polystyren as well as a strongly enhanced autolytic activity. The invasiveness of $\Delta clpP$ was significantly elevated (~10-fold) compared to the isogenic wildtype as shown in an invasion assay with the 293T epithelial cell line. All

these effects could be successfully reverted by complementation of the mutant strain with a vector expressing the native *clpP* sequence.

The microarray analysis of $\Delta clpP$ revealed a strong shift of the bacterial transcriptome (15 % of all genes were differentially regulated). Especially regulators and genes which reply to varying redox conditions, for example as a result of different stresses or anaerobiosis, were shown to be affected at the transcriptional level.

Deletion mutants of the virulence-associated two component system genes *arlR* and *arlS* caused a higher hemolytical activity, enhanced adherence to polystyrene and an enhanced autolytic activity in a Triton X-100 assay. Furthermore, internalisation of $\Delta arlRS$ bacteria by 293T epithelial cells was diminished, and $\Delta arlR$ was significantly less infectious than the wildtype in a catheter-related infection model in rats.

The microarray analysis of $\Delta arlR$ in the exponential and stationary growth phase revealed a strong influence of the ArlRS-system on gene expression in *S. aureus*. In the exponential phase a total of 5 %, and in the stationary phase 15 % of all genes were differentially regulated.

$\Delta purH$ and $\Delta putP$ showed no alterations of growth, biofilm formation or hemolytic properties compared to the wild type strain. Inactivation of *purH*, however, caused a significant attenuation of *S. aureus* MA12 in a rat-infection model.

Since the construction of *ssrA* and *smpB* deletion mutants have failed, conditional lethal expression systems should be utilised to address the question of essentiality of these genes. It could be shown by this study that neither the genetic exchange of the wildtype promoter with an *in vitro* adjustable promoter nor an antisense RNA-based approach were sufficient to clarify the status of *ssrA* and *smpB* as essential genes in *S. aureus*. Importantly, the expression of antisense RNAs for both genes resulted in a growth defect of *S. aureus*.

1. EINLEITUNG

1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken sind fakultativ anaerobe, unbewegliche, sporenlöse Kokken, die den grampositiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt zugeordnet werden. *Staphylococcus aureus* ist ein weit verbreiteter human- und tierpathogener Mikroorganismus, der als Kommensale in der Haut- und Schleimhautflora von Säugetieren und Vögeln vorkommt (Kloos & Lambe, 1991). Die von *S. aureus* hervorgerufenen Infektionen können in drei Kategorien eingeteilt werden: (i) lokale, oberflächliche Infektionen, wie Wundinfektionen und Abszesse, (ii) invasive, systemische Erkrankungen wie Osteomyelitis, Pneumonie, Endokarditis, Mastitis oder Sepsis und (iii) toxinvermittelte Erkrankungen, wie das Staphylococcal-Scaled-Skin-Syndrom (SSSS), das toxische-Schock-Syndrom (TSS) (Musser et al., 1990) sowie Nahrungsmittelvergiftungen (LeLoir et al., 2003). Die Infektionen der beiden ersten Kategorien können einer Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren zugeschrieben werden, deren Expression eine komplexe Regulation voraussetzt, die in *S. aureus* als Antwort auf intra- und extrazelluläre Signale koordiniert wird (Chan & Foster, 1998; Lindsay & Foster, 1999; Novick, 2000; Balaban et al., 2001; Cheung, 2002; Novick, 2003a). Daran sind, neben dem *agr*-System (*a*ccessory *g*ene *r*egulator), verschiedene globale Regulationselemente wie SarA (*s*taphylococcal *a*ccessory *r*egulator), verschiedene SarA-Homologe, ArIRS und Rot beteiligt (McNamara & Iandolo, 1998; Fournier et al., 2001; Cheung, 2002; Novick, 2003a; Cheung et al., 2004).

S. aureus ist ein bedeutender Erreger nosokomialer Infektionen und verursacht 20 - 30 % der jährlichen Todesfälle der im Krankenhaus erworbenen Infektionen, durch die in den USA bis zu 97.000 Menschen pro Jahr sterben (www.cdc.gov). Von besonderer Aktualität sind schwerwiegende nekrotische Entzündungen mit möglicher Todesfolge bei der immunkompetenten Bevölkerung, die durch *S. aureus*-Stämme (‘community acquired MRSA’) hervorgerufen werden, deren Ursprung nicht mit Krankenhäusern in Verbindung gebracht werden kann.

Ein großes Problem stellt die steigende Zahl multiresistenter Keime dar (Projan, 2000). Für *S. aureus* wurden bereits Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika beschrieben. Die molekularen Grundlagen für die Etablierung multiresistenter *S. aureus*-Stämme beruhen maßgeblich auf horizontalem Gentransfer und mobilen

genetischen Elementen. Die Entwicklung ist eine Folge des enormen Selektionsdrucks, welchem die Keime vor allem in Krankenhäusern unterliegen. Die Resistenz gegenüber Penicillin wurde kurz nach der Einführung durch den Erwerb von Penicillinasen entwickelt (Barber & Rozwadowska-Dowzenko, 1948). In der heutigen Zeit sind ~90 % aller klinischen *S. aureus*-Isolate gegenüber Penicillin resistent. In der Folge wurden Penicillinase-stabile β -Lactamantibiotica, wie das Methicillin eingesetzt. Anfang der 60er Jahre wurde der erste Methicillin-resistente *S. aureus*-Stamm (MRSA) beschrieben (Jevons, 1961). Heute sind in Deutschland 21 % aller *S. aureus*-Isolate Methicillin-resistent (Kresken & Hafner, 2001). Diese Isolate verfügen über ein zusätzliches Penicillin-Bindeprotein (PBP2'), welches eine verringerte Affinität gegenüber β -Lactamverbindungen aufweist und von dem Gen *mecA* kodiert wird. Diese Stämme sind gegen alle bekannten β -Lactamantibiotika einschließlich der Cephalosporine und Carbapeneme resistent (Hiramatsu *et al.*, 1997; Projan, 2000; Robinson & Enright, 2004). *S. aureus*-Infektionen wurden anschließend vermehrt mit Glykopeptid-Antibiotika, wie Vancomycin und Teicoplanin behandelt. 1997 traten in Japan erste Resistenzen gegen Vancomycin auf (Hiramatsu *et al.*, 1997; Tenover *et al.*, 1998). *S. aureus*-Stämme mit gesteigerter Resistenz gegenüber Vancomycin wurden kurze Zeit später isoliert. Diese Stämme enthalten die aus Enterokokken stammende Vancomycin-Resistenzdeterminante *vanA* sowie das Methicillin-Resistenzgen *mecA* (Miller *et al.*, 2002; Sievert & Boulton, 2002; Chang *et al.*, 2003; Weigel *et al.*, 2003; Tenover *et al.*, 2004). Multiresistente MRSA-Stämme, die gleichzeitig eine erhöhte Vancomycin-Resistenz aufweisen, sind nur schwer mit Antibiotika zu behandeln (De Sousa & De Lancastre, 2004). Gegen diese Stämme wirken nur noch die neuesten Antibiotika Linezolid, Synercid oder Daptomycin (Cha *et al.*, 2003; LaPlante & Rybak, 2004; Lundstrom & Sobel, 2004). Allerdings wurden bereits Linezolid- und Synercid-resistente Stämme beschrieben (Hershberger *et al.*, 2004).

1.2. Identifizierung neuer Targets für die Entwicklung antimikrobieller Strategien

Die stetig steigende Zahl der gegen die geläufigen Antibiotika-Therapien resistenten Bakterien macht es notwendig, neue Ziele für die Entwicklung antimikrobieller Therapien zu identifizieren. Bislang wurden für diese Therapien Substanzen eingesetzt, die entweder bakterizid oder bakteriostatisch sind, um pathogene

Bakterien aus dem infizierten Wirt zu eliminieren. Dabei handelt es sich um Substanzen, die nur in einige der bakteriellen Stoffwechselwege, wie Zellwandsynthese, Nukleinsäuremetabolismus oder Proteinsynthese eingreifen. In den letzten Jahren wurden neue Methoden zur Identifizierung von putativen Angriffsziele (Targets) etabliert, welche die Suche nach neuen Therapieansätzen unterstützen. Die vollständige Sequenzierung zahlreicher Bakteriengenome (www.tigr.org), ebenso wie das „Humane Genomprojekt“ ermöglichen die Identifikation konservierter Gene durch subtraktive Genomanalyse, die für die Entwicklung von Breitband-Antibiotika von großer Bedeutung sind (Galperin & Koonin, 1999). Bevorzugte Angriffsziele sind Gene, die für Proteine kodieren, welche essenziell für das Wachstum und das Überleben einer Vielzahl von Bakterienspezies sind und keine Homologien zu eukaryontischen Genen aufweisen. Daneben sind Faktoren von Interesse, die entweder direkt oder indirekt an der Etablierung einer Infektion beteiligt sind. Dabei handelt es sich neben Virulenzfaktoren vor allem um Proteine, die eine Rolle in der bakteriellen Physiologie und Stressantwort ausüben und für die Anpassung innerhalb des Wirts essenziell sind.

Die für die Identifizierung potenzieller Targets eingesetzten Strategien umfassen verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Methoden. Eine Methode für die Identifikation essenzieller Gene im großen Maßstab stellt die Antisense-RNA-Methode dar. Konditional exprimierte DNA-Fragmente in „Antisense“-Orientierung führen zu einem Wachstumsnachteil bei Klonen, in denen die Expression eines essenziellen Gens durch die Anwesenheit der Antisense-RNA unter *in vitro*-Bedingungen gehemmt wurde (Ji *et al.*, 2001; Forsyth *et al.*, 2002; Yin & Ji, 2002; Ji *et al.*, 2004). Für die Identifikation von Faktoren, die für eine Infektion essenziell sind, wurden verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Methoden entwickelt. Mit Hilfe von *in vitro*-Methoden können definierte Kulturbedingungen hergestellt werden, die die Situation *in vivo* simulieren (DiRita & Mekalanos, 1989). Mit Untersuchungen zum Wachstum unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. pH, Temperatur, Eisenkonzentration, Osmolarität sowie Zellkulturassays zur Untersuchung von Adhäsion, Invasion und Zytotoxizität, können Informationen über die zugrunde liegenden Mechanismen einer Infektion gewonnen werden. Es ist jedoch nicht möglich, die tatsächliche Vielseitigkeit eines Infektionsverlaufs mit allen Aspekten der Wirt-Pathogen-Interaktion darzustellen. Deshalb wurden *in vivo*-Strategien entwickelt (Übersicht: (Chiang *et al.*, 1999; Handfield & Levesque, 1999; Shea *et al.*, 2000; Shelburne & Musser, 2004)),

wie STM („signature-tagged mutagenesis“) (Hensel *et al.*, 1995; Mei *et al.*, 1997; Coulter *et al.*, 1998), IVET („*in vivo* expression technology“) (Mahan *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1998), DFI („differential fluorescence induction“) (Valdivia & Falkow, 1996, 1997; Schneider *et al.*, 2002) und quantitative Methoden wie DNA-Microarrays (de Saizieu *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 2000; Yarwood *et al.*, 2002) und quantitative RT-PCR (qRT-PCR)(Goerke *et al.*, 2001a; Goerke *et al.*, 2001b; Wolz *et al.*, 2002; Shelburne & Musser, 2004).

Die STM-Methode ermöglicht eine Überprüfung einer großen Anzahl von Mutanten in verschiedenen Tiermodellen. Jede Mutante, die durch Transposon-Mutagenese erzeugt wurde, wird mit einer spezifischen DNA-Sequenz markiert und für die Etablierung einer Infektion in einem *in vivo*-Modell eingesetzt. Anschließend kann die An- oder Abwesenheit einer individuellen Mutation der reisolierten Mutanten mittels PCR anhand der markierten DNA-Sequenz ermittelt werden (Hensel *et al.*, 1995). Die IVET-Methode ermöglicht eine positive Selektion von Genen, deren Promotoren unter *in vivo*-Bedingungen aktiviert sind. Dazu wird in dem zu untersuchenden Stamm ein für das Überleben im Wirt essenzielles Gen deletiert. Anschließend wird über einen Vektor das promotorlose Gen in den Stamm transformiert. Nach der Infektion in einem Tiermodell können Mutanten selektioniert werden, die aufgrund der Insertion des essenziellen Gens hinter einen aktiven Promotor überlebensfähig waren. Eine alternative Variante stellt die Resolvase-IVET dar, in der die promotorlose Resolvase nach Integration hinter einen aktiven Promotor eine Antibiotika-Kassette herausschneidet und so im Anschluss eine Selektion der Mutanten ermöglicht (Lowe *et al.*, 1998). Mit der DFI-Methode wird das promotorlose Reporter-gen, das für GFP („green fluorescent protein“) kodiert eingesetzt. Diese Methode erlaubt die Detektion der aktivierten Promotoren in *in vivo*- und *in vitro*-Systemen mittels Durchfluss-Zytometrie und konfokaler Lasermikroskopie (Hautefort *et al.*, 2003).

Aufgrund der Vielseitigkeit der durch *S. aureus* verursachten Infektionen, die von dem Zusammenspiel verschiedener Virulenzfaktoren verursacht werden, besteht die Schwierigkeit virulenzassoziierte Gene in einzelnen Tiermodellen nachzuweisen. Coulter *et al.* versuchten dieser Problematik Rechnung zu tragen, indem die mittels der STM-Methode identifizierten Mutanten in verschiedenen Infektionsmodellen überprüft wurden (Coulter *et al.*, 1998). Dieser Ansatz wurde ebenfalls bei der Überprüfung von Mutanten in *Streptococcus pneumoniae* verfolgt (Polissi *et al.*, 1998). Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass manche Virulenzdeterminanten

für eine Vielzahl von Infektionen benötigt werden, während andere sehr spezifisch für die jeweilige Wirtsumgebung sind (Coulter *et al.*, 1998; Polissi *et al.*, 1998). Interessanterweise wurden mit IVET und STM im Gegensatz zu *S. pneumoniae* für *S. aureus* überwiegend Gene identifiziert, die in die bakterielle Physiologie involviert sind (Mei *et al.*, 1997; Chiang *et al.*, 1999).

Die vollständige Sequenzierung zahlreicher bakterieller Genome ermöglicht die Suche nach konservierten Genen *in silico*. Ein Beispiel für konservierte Targets, die sich potenziell für die Entwicklung von Breitband-Antibiotika eignen, ist die Gruppe der Zwei-Komponenten-Systeme (Stephenson & Hoch, 2002, 2004). Diese sind unter Prokaryonten weit verbreitet und stellen integrale Elemente der adaptiven regulatorischen Prozesse dar, die die Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen ermöglichen. Manche der Zwei-Komponenten-Systeme konnten als essenziell identifiziert werden, wodurch ihre Bedeutsamkeit als potenzielle Targets unterstrichen wird. Ein klassisches Zwei-Komponenten-System ermöglicht die Signaltransduktion über eine Sensor-Kinase, bei der es sich in der Regel um ein integrales Membranprotein mit Histidinkinase-Aktivität handelt. Nach Aktivierung durch ein spezifisches Signal erfolgt die Phosphorylierung des Response-Regulators, der seinerseits als Transkriptionsfaktor die Genexpression als Anpassung an die jeweiligen Umweltbedingungen moduliert (siehe Übersicht (Galperin, 2004)). Die Komponenten Sensor-Kinase und Response-Regulator verfügen über hochkonservierte Domänen (Hoch & Varughese, 2001), die sich als Ziel für die Entwicklung antibakterieller Substanzen anbieten. Zwei-Komponenten-Systeme spielen eine wichtige Rolle bei der Virulenzentwicklung und Antibiotikasensitivität. In *S. pneumoniae* wurden 13 Zwei-Komponenten Systeme identifiziert, von denen sieben für die Virulenz in einem murinen Respirationstraktmodell benötigt werden (Throup *et al.*, 2000). Bei Enterokokken ist das VanSR-Zwei-Komponenten System verantwortlich für die Vancomycin-Resistenz. Vancomycin bindet an das D-Alanyl-D-Alanin-Dipeptid der Peptidoglykanvorläufermoleküle, wodurch die Zellwandsynthese gestört wird (Reynolds, 1989). Die Sensor-Kinase VanS wird durch Vancomycin induziert und moduliert einen Mechanismus, der dazu führt, dass D-Alanyl-D-Alanin durch das Depsipeptid D-Alanyl-D-Laktat ersetzt wird. Das so modifizierte Peptidoglykan weist eine geringere Affinität für Glykopeptid-Antibiotika auf (Arthur *et al.*, 1996). Das YycFG-Zwei-Komponenten-System ist essenziell für verschiedene grampositive Bakterien (Fabret & Hoch, 1998; Federle *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 1999;

Martin *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000; Ferretti *et al.*, 2001). Für *S. aureus* ist nur die Sensor-Kinase YycG essenziell (Martin *et al.*, 1999). Eine Punktmutation im Response-Regulator YycF führte zu einer Veränderung der Sensitivität gegenüber Makrolid-Antibiotika und zu der Attenuierung der Virulenz in einem *in vivo*-Modell (Martin *et al.*, 1999). YycFG könnte somit ein geeignetes Target für die Entwicklung bakterizider Substanzen darstellen, die gegen eine große Gruppe pathogener Bakterien wirken.

Die fundamentale Rolle der Zwei-Komponenten-Systeme für die Anpassungsfähigkeit und die Virulenzentwicklung wird durch den Prozess des Quorum-Sensing unterstrichen, der die zell-dichte-abhängige Zell-Zell-Kommunikation über ein kleines sekretiertes Molekül ermöglicht (siehe auch 1.2.1.2) (Miller & Bassler, 2001). Bei grampositiven Bakterien handelt es sich dabei um ein Oligopeptid, über das verschiedene zelluläre Prozesse kontrolliert werden, wie Virulenz (Mayville *et al.*, 1999; Lyon *et al.*, 2000), Vancomycin-induzierter Zelltod (Novak *et al.*, 1999), genetische Kompetenz (Tortosa & Dubnau, 1999; Tortosa *et al.*, 2001), Entwicklung (Perego, 1997) und Produktion von antimikrobiellen Peptiden (Kleerebezem *et al.*, 1997; Kleerebezem & Quadri, 2001). Das *agr*-System der Staphylokokken ist ein Quorum-Sensing-System, das für die globale Regulation der Virulenzfaktorexpression und die Etablierung einer Vielzahl von Infektionen verantwortlich ist. Der Zusammenhang von *agr* und der Pathogenese wurde in verschiedenen Infektionsmodellen, wie z. B. in einem murinen subkutanen Abszessmodell (Bunce *et al.*, 1992), Arthritis (Abdelnour *et al.*, 1993), und Kaninchen-Endokarditis (Cheung *et al.*, 1994) nachgewiesen. *Agr* spielt eine Rolle bei der Invasion und Apoptose von bovinen Epithelzellen (Wesson *et al.*, 1998). Mittels STM-Studien wurde das Gen *agrA* in *S. aureus* sowie ein *agrA*-Homolog in *Listeria monocytogenes* in murinen Sepsismodellen als Virulenz-assoziiert identifiziert (Mei *et al.*, 1997; Autret *et al.*, 2003).

Die Regulation der Virulenzfaktorexpression durch das *agr*-System erfolgt durch die Sekretion des Thiolakton-Oligopeptid (AIP: autoinducing peptide), das in Abhängigkeit von der Zelldichte im umgebenden Medium akkumuliert. Nach dem Erreichen einer kritischen Konzentration aktiviert es die Sensor-Kinase AgrC, die den Phosphotransfer auf den Response-Regulator AgrA bewirkt. Phosphoryliertes AgrA führt zur Autoaktivierung des *agr*-Systems, die die Hemmung der Expression verschiedener zellwandgebundener Proteine und die Aktivierung der Expression

vieler sezernierter Virulenzfaktoren zur Folge hat (siehe Übersicht: (Cheung, 2002; Novick, 2003a). Die Struktur des AIP variiert zwischen verschiedenen *S. aureus*-Stämmen, sodass in Abhängigkeit der spezifischen AgrC-AIP-Interaktionen eine Einteilung in vier Gruppen vorgenommen werden kann (Ji *et al.*, 1997; Otto, 2001). AIP ist für die Aktivierung der Virulenzentwicklung innerhalb einer Gruppe verantwortlich, während Stämme anderer Gruppen gehemmt werden. In einem murinen Infektionsmodell konnte gezeigt werden, dass das autoinduzierende Peptid der Gruppe II, die Bildung eines Hautabszesses durch einen Stamm der Gruppe I inhibiert (Mayville *et al.*, 1999). Aufgrund der für die spezifische Interaktion verantwortlichen Struktur des Thiolakton-Oligopeptids, wurde ein verkürztes AIP synthetisiert, das in der Lage war, die Virulenz aller vier Gruppen zu hemmen (Lyon *et al.*, 2000). Daraus ergibt sich ein interessanter therapeutischer Ansatz gegen Staphylokokken sowie weitere pathogene Bakterien, die über ein Quorum-Sensing-System mit einem Oligopeptid-Signalmolekül verfügen. Das Ziel einer Therapie ist jedoch die Eliminierung der Bakterien aus dem infizierten Wirt. Da die Regulation der Virulenzfaktorexpression durch das *agr*-System erst spät während des Infektionsverlaufs eine Rolle spielt, ist es fraglich, ob es sich als Target eignet. Die Problematik der Beurteilung eines Targets zeigt sich weiterhin durch den Vergleich zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Studien. In humanem Sputum wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen, dass die Expression von Virulenzfaktoren unabhängig von *agr* reguliert wird (Goerke *et al.*, 2001b). In einem subkutanen Kaninchen-Infektionsmodell wurde nachgewiesen, dass das Effektormolekül des *agr*-Systems, RNAIII herunterreguliert ist, während die Expression vieler Virulenzgene induziert ist (Yarwood *et al.*, 2002).

Da die verminderte Virulenz einer *agr*-Mutante letztlich auf die veränderte Virulenzfaktorexpression zurückzuführen ist, stellen Virulenzfaktoren selbst einen weiteren interessanten Ansatz für die Entwicklung neuer antibakterieller Strategien dar (siehe Übersicht: (Alksne & Projan, 2000). Dabei steht die Verhinderung der Etablierung einer Infektion im Vordergrund. Virulenzfaktoren werden als akzessorische Genprodukte beschrieben, die für die Virulenz *in vivo* und nicht für die Überlebensfähigkeit *in vitro* benötigt werden (Wood & Davis, 1980). Sie stellen somit Fitnessfaktoren dar, die es dem Bakterium ermöglichen, sich an die bestimmten Bedingungen innerhalb eines Wirts, während eines Infektionsverlaufs anzupassen. Mit Ausnahme der Toxinosen, wie das „Toxic Shock Syndrome“, das durch das Toxin

TSST-1 verursacht wird (Bohach *et al.*, 1990), das „Staphylococcal Scaled Skin Syndrome“, verursacht durch die Toxine Exfoliatin A und B (Iandolo, 1989) und Nahrungsmittelvergiftung, verursacht durch Enterotoxine A - O (Iandolo, 1989; Jarraud *et al.*, 2001), ist die Virulenz von *S. aureus* durch eine Vielzahl von Virulenzfaktoren bedingt. Basierend auf den jeweiligen biologischen Aktivitäten können diese Virulenzfaktoren in drei funktionelle Kategorien eingeteilt werden: (i) zellwandgebundene Proteine, die u. a. die Adhärenz zu Wirtszellen bzw. -geweben vermitteln, (ii) Proteine, die die Gewebeerstörung und somit die Ausbreitung der Bakterien fördern und (iii) Proteine, die die Bakterien vor der Immunabwehr schützen. Die zeitliche Abfolge der Virulenzfaktorenexpression während eines Infektionsverlaufs kann stark vereinfacht mit dem Bakterienwachstum *in vitro* verglichen werden (siehe Abb. 1). Nachdem einige Bakterien in den Wirt eingedrungen sind, müssen sie eine geeignete Nische besetzen (lag-Phase) und die Abwehrmechanismen des Wirts umgehen, um ihre Vermehrung (exponentielle Phase) und anschließende Verbreitung innerhalb eines Wirts oder zwischen mehreren Wirten zu gewährleisten (post-exponentielle, stationäre Phase) (Jones & Falkow, 1996). Zellwandgebundene Proteine, die sogenannten Adhäsine vermitteln die Initiation einer Infektion durch Bindung an die extrazelluläre Matrix des Wirts. Dazu zählen beispielsweise die Fibronectin-bindenden Proteine (Fnb, FnbB), Fibrinogen-bindende Proteine (ClfA/B, FbpA, Fib), Elastin-bindendes Protein (EbpS) oder Collagen-bindendes Adhäsine (Cna). In ihrer Gesamtheit werden sie als MSCRAMM's (Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) bezeichnet (Patti *et al.*, 1994; Foster & Hook, 1998). Viele dieser zellwandgebundenen Proteine verfügen über ein konserviertes LPXTG-Motif, das für die Sortase-vermittelte Verankerung an der Peptidoglykanschicht dient. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Sortase-Mutante eine stark verminderte Virulenz in einem murinen Infektionsmodell aufweist (Mazmanian *et al.*, 2000). Die Fibronectin-bindenden Proteine sind für die Invasion von *S. aureus* in Säugierzellen verantwortlich. Die Internalisierung von *S. aureus* spielt v. a. bei chronischen Infektionen eine große Rolle, da die Bakterien innerhalb der eukaryontischen Zellen persistieren können und dort vor der Immunabwehr des Wirts sowie verschiedenen Antibiotika geschützt sind. Viele *S. aureus*-Infektionen sind assoziiert mit Gewebeerstörung, was unter anderem in der Fähigkeit der intrazellulären Bakterien zur Induktion der Apoptose der Wirtszellen begründet ist (Bayles *et al.*, 1998; Wesson *et al.*, 1998). Oberflächenassoziierte Proteine,

insbesondere Adhäsine bieten sich für die Bekämpfung von *S. aureus*-Infektionen durch entsprechende Vakzinierungsstrategien an (Foster, 1991; Flock & Brennan, 1999). Eine Immunisierung gegen FnBPs ist in bestimmten Infektionen z. B. Mastitis und Endokarditis protektiv (Schennings *et al.*, 1993; Mamo *et al.*, 1994; Rennermalm *et al.*, 2001) und eine Immunisierung gegen ClfA schützt bei Arthritis (Josefsson *et al.*, 2001). Weiterhin wurde ein Vakzin gegen die bei der Mehrzahl der Klinikisolate auftretenden Kapselpolysaccharide CP5 und CP8 erfolgreich getestet (Fattom *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997).

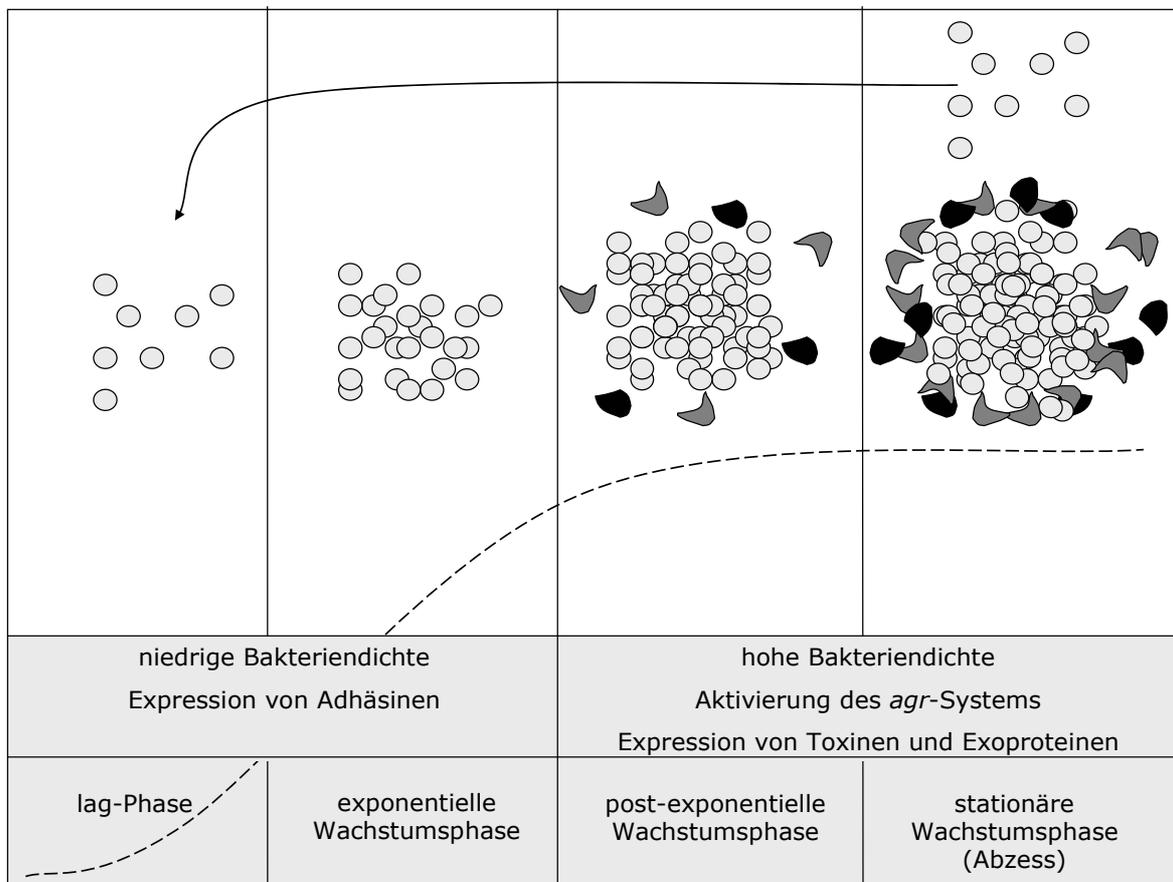


Abb. 1 Infektionsverlauf und Virulenzfaktorexpression in *S. aureus* *in vivo* und *in vitro*. Vergleich der Virulenzfaktorexpression während des Wachstums in einer statischen Kultur und während einer Infektion (mod. nach (Alksne & Projan, 2000))

1.2.1. Ausgewählte Zielgene

Die Antibiotikaresistenzentwicklung in *S. aureus* macht die Entwicklung neuer Antibiotika dringend erforderlich. In dieser Arbeit sollten potenzielle Zielstrukturen für die Therapie gegen *S. aureus* identifiziert und charakterisiert werden. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit dem Industriepartner Intervet Innovation GmbH Gene mit ungeklärter Rolle in der Virulenzentwicklung von *S. aureus* ausgewählt und untersucht. Dabei handelt es sich um globale Virulenzregulatoren (*arIRS*) und *in vivo*-

Überlebensfaktoren (*purH*, *clpP*, *putP*, *ssrA*, *smpB*), deren Eignung für die Antiinfektiva-Entwicklung überprüft werden sollte.

1.2.1.1. ClpP, die proteolytische Untereinheit der ATP-abhängigen Proteasen

In verschiedenen STM-Studien wurden viele Gene identifiziert, deren Produkte in die Stressantwort involviert sind (Shea *et al.*, 2000). Verschiedene Proteasen der ATP-abhängigen Clp-Familie wurden als essenziell für die Virulenzentwicklung identifiziert (Hensel *et al.*, 1995; Mei *et al.*, 1997; Polissi *et al.*, 1998). ClpP, die proteolytische Untereinheit der ATP-abhängigen Clp- (casinolytic protease) Proteasen wurden zuerst in *E. coli* identifiziert (Katayama *et al.*, 1988). Der Clp-Protease-Komplex setzt sich aus einer Protease mit ATPase-Aktivität (ClpA oder ClpX in *E. coli* und ClpX oder ClpC in *B. subtilis*) und einer proteolytischen Domäne (ClpP) zusammen (Gottesman, 1992; Maurizi, 1992; Gottesman, 1996). In *E. coli* ist die ClpP-vermittelte Proteolyse Bestandteil der Hitzeschockantwort und führt zur Degradation fehlgefalteter Proteine, die unter verschiedenen Stressbedingungen in der Zelle akkumulieren. Daneben ist der Protease-Komplex für die Degradation verkürzter Peptide verantwortlich, die durch das SsrA-SmpB-System markiert wurden (siehe auch 1.2.1.5) sowie für die Bereitstellung von Aminosäuren durch Degradation nicht-essenzieller Proteine bei Nährstoffmangel (Reeve, 1984; Gottesman, 1998). Neben diesen Funktionen spielen die Clp-Proteasen in verschiedenen regulatorischen Prozessen eine Rolle, indem sie die Abundanz von Proteinen mit regulatorischer Funktion kontrollieren (zur Übersicht: Gottesman, 1992; Hengge & Bukau, 2003; Jenal & Hengge-Aronis, 2003). In *E. coli* ist ClpXP involviert in die regulatorische Degradation von Regulatoren, wie den Sigma-Faktor RpoS, das UmuD-SOS-Protein sowie verschiedene Phagenproteine (Frank *et al.*, 1996; Gottesman, 1996; Zhou, 1998). Die Degradation der Substratproteine wird über bestimmte Aminosäuresequenzen gesteuert, die als Erkennungssignal dienen. Flynn *et al.* identifizierten mehr als 50 Proteine in *E. coli*, die als potenzielle Substrate für ClpXP in Frage kommen (Flynn *et al.*, 2003). Weitere Substrate mit regulatorischer Funktion wurden in anderen Mikroorganismen identifiziert, wie z. B. CtrA in *Caulobacter crescentus*, SigmaS und FlhC/FlhD in *S. typhimurium*, PopR in *Streptomyces lividans* und der LexA-homologe Regulator HdiR in *Lactococcus lactis* (Jenal & Fuchs, 1998; Webb *et al.*, 1999; Viala & Mazodier, 2002; Savijoki *et al.*, 2003; Tomoyasu *et al.*, 2003). In *B. subtilis* sind Clp-Substrate in die Peptidoglykanbiosynthese, Kompetenz und Sporulation sowie Hitzeschockantwort

involviert (Hahn *et al.*, 1998; Msadek *et al.*, 1998; Derre *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 2001; Pan Q, 2001; Nakano *et al.*, 2003a; Kock *et al.*, 2004).

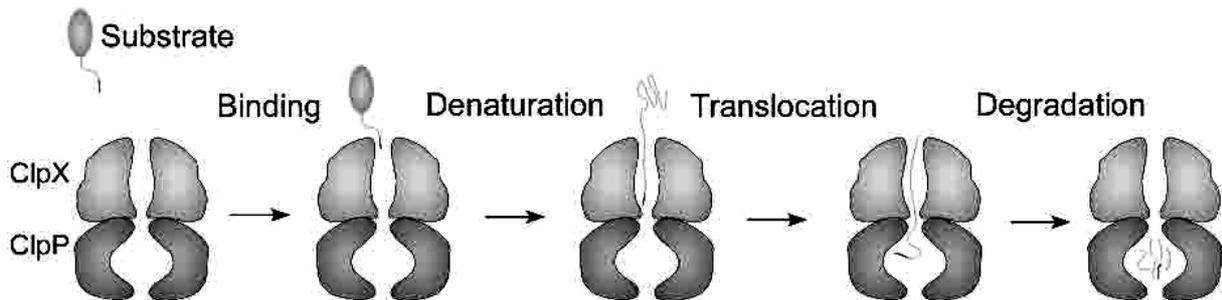


Abb. 2 Substrate für die ClpXP-Degradation werden durch ClpX über Peptid-Erkennungssequenzen gebunden, aufgefalt und zu ClpP geleitet und dort anschließend degradiert (aus (Siddiqui *et al.*, 2004))

Das Gen *clpP* war in einer STM-Studie in *S. typhimurium* für das Überleben in der Milz essenziell. Die Inaktivierung der ClpP-Funktion führte zu einer Attenuierung der Virulenz *in vivo* und zu einer persistenten Infektion in Mäusen (Hensel *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2001). In *S. pneumoniae* wurde das Gen *clpC* mittels STM in einem murinen Pneumoniemodell als virulenzassoziiertes Faktor ermittelt und die Virulenz einer temperatursensitiven *clpP*-Mutante war in einem murinen Lungen- und Sepsismodell stark attenuiert (Polissi *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 2002). Eine weitere STM-Studie zeigte, dass *clpX* in *S. aureus* in einem murinen Sepsismodell essenziell ist. In einem murinen Abszessmodell zeigten *clpX*- und *clpP*-Mutanten eine starke Attenuierung der Virulenz (Mei *et al.*, 1997; Frees *et al.*, 2003). In *L. monocytogenes* ist *clpP* essenziell für das Überleben in murinen Makrophagen (Gaillot *et al.*, 2000; Gaillot *et al.*, 2001). In *Yersinia enterocolitica* beeinflusst ClpP die wachstumsphasen- und temperaturabhängige Regulation der Expression des Virulenzfaktors *ail* und beeinflusst indirekt die Biofilmbildung in *Pseudomonas fluorescens* (Pederson *et al.*, 1997; O'Toole & Kolter, 1998). *clpP*-Mutationen in den grampositiven Bakterien *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *L. lactis* und *S. aureus* führen zu Wachstumsbeeinträchtigungen unter verschiedenen Stressbedingungen (Gerth *et al.*, 1998; Msadek *et al.*, 1998; Frees & Ingmer, 1999; Fedhila *et al.*, 2002; Frees *et al.*, 2003).

1.2.1.2. Das ArlRS-Zwei-Komponenten-System

Das ArlRS-Zwei-Komponenten-System setzt sich aus dem Response-Regulator ArlR und der Sensor-Kinase ArlS zusammen. Der *arl*-Locus wurde bei Untersuchungen zur Regulation des „Multidrug“-Resistenz-Transporters NorA mit Hilfe einer Transposon-

Mutagenese-Strategie identifiziert (Fournier *et al.*, 2000). Die *arl*-Mutante wies eine verstärkte Autolyse und veränderte Peptidoglykan-Hydrolase-Aktivität auf (Fournier & Hooper, 2000). Mutationen in diesem Locus führten zur einer Steigerung der Expression verschiedener extrazellulärer Virulenzfaktoren, wie z. B. Alpha-Hämolysin, Protein A, Lipase und Serinprotease. In den Mutanten konnten erhöhte RNAlI- und RNAlII-Konzentrationen festgestellt werden. Somit handelt es sich bei dem ArlRS-System um einen negativen Regulator der *agr*-Expression (Fournier *et al.*, 2001). Die Inaktivierung des Gens *arlS* hatte eine Attenuierung der Virulenz in einem Sepsismodell in Mäusen zur Folge (Benton *et al.*, 2004). Das Interesse an dem ArlRS-Zwei-Komponenten System beruht auf der noch weitgehend ungeklärten Rolle in der Regulation der Virulenzfaktorexpression in *S. aureus*.

1.2.1.3. Die Prolinpermease PutP

Viele Wirts-assoziierte Pathogene weisen aufgrund von Genomreduktion eingeschränkte Biosyntheseleistungen auf (Fraser *et al.*, 1995; Lewis & Babiuk, 1999; Chalker & Lunsford, 2002). Aus diesem Grund sind sie darauf angewiesen, einige essenzielle Nährstoffe wie diverse Aminosäuren, Nukleotide oder Vitamine vom Wirt zu importieren. Prolin ist eine essenzielle Aminosäure für *S. aureus* und dient als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (Gladstone, 1937; Ratzkin *et al.*, 1978; Wood, 1988; Wengender & Miller, 1995). Die Prolinauxotrophie von *S. aureus* stellt vermutlich eine Anpassung an seinen warmblütigen Wirt dar (Schwan *et al.*, 2004). Daneben gilt Prolin als osmoprotektive Substanz für *S. aureus*, *B. subtilis* und gramnegative Bakterien, da es unter Bedingungen mit hoher Osmolarität in der Bakterienzelle akkumuliert (Wood, 1988; Csonka & Hanson, 1991; Bae & Miller, 1992; Graham & Wilkinson, 1992; Townsend & Wilkinson, 1992; Pourkomialian & Booth, 1994; Wengender & Miller, 1995; von Blohn *et al.*, 1997).

S. aureus verfügt über zwei Prolinaufnahmesysteme: ein hoch affines System (*putP*) für die Aufnahme von Prolin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, und ein weiteres System (*proP*-Homolog) mit geringerer Affinität, das in Abhängigkeit zu den osmotischen Bedingungen reguliert wird (Bae & Miller, 1992; Townsend & Wilkinson, 1992; Wengender & Miller, 1995). Die Inaktivierung des *putP*-Gens, führt zu einer Reduzierung der Prolinaufnahme und zu einer Verminderung der Überlebensfähigkeit von *S. aureus* in verschiedenen Tiermodellen (murines systemisches, Wund- und Abszessmodell, und Kaninchen-Endokarditismodell (Schwan *et al.*, 1998; Bayer *et al.*, 1999). *putP*-Mutanten in *E. coli* und *S. typhimurium* sind nicht in der Lage

ausreichende Mengen L-Prolin *in vivo*, innerhalb von Abszessen, kardialen Geweben oder Wundgeweben aufzunehmen, und ihr maximales Wachstum aufrechtzuerhalten (Motojima *et al.*, 1978; Myers *et al.*, 1991). Das Wachstum der *S. aureus putP*-Mutante ist besonders in Organen mit niedrigen Prolinkonzentrationen reduziert, wie in der Milz und der Leber der Maus (Schwan *et al.*, 1998; Schwan *et al.*, 2004). PutP stellt somit einen wichtigen Faktor für das Überleben von *S. aureus* in Umgebungen mit niedrigen Prolinkonzentrationen im Wirt dar, wie z. B. das endokardiale Gewebe (Durack & Beeson, 1972) oder dem menschlichen Urin (Inoue *et al.*, 1999).

1.2.1.4. Das Purinbiosynthese-Enzym PurH

Aufgrund der erschwerten Verfügbarkeit von Purinen innerhalb des Wirtsgewebes stellt bei pathogenen Bakterien die Purinbiosynthese einen essenziellen Stoffwechselweg *in vivo* dar (Shea *et al.*, 2000). Das Gen *purH* ist in einem Operon mit elf weiteren Genen organisiert (*purEKCSQLFMNHD*), das unter der Kontrolle von PurR, einem Purinsynthese-Repressor, steht. Es kodiert für ein bifunktionales Enzym, der AICAR-Transformylase/IMP-Cyclohydrolase, das in die Purinnukleotidbiosynthese involviert ist und die letzten beiden Schritte der *de novo*-IMP-Biosynthese katalysiert (siehe Abb. 3) (Zalkin & Nysgaard, 1996). IMP stellt das erste Nukleotid im *de novo*-Purinbiosyntheseweg dar.

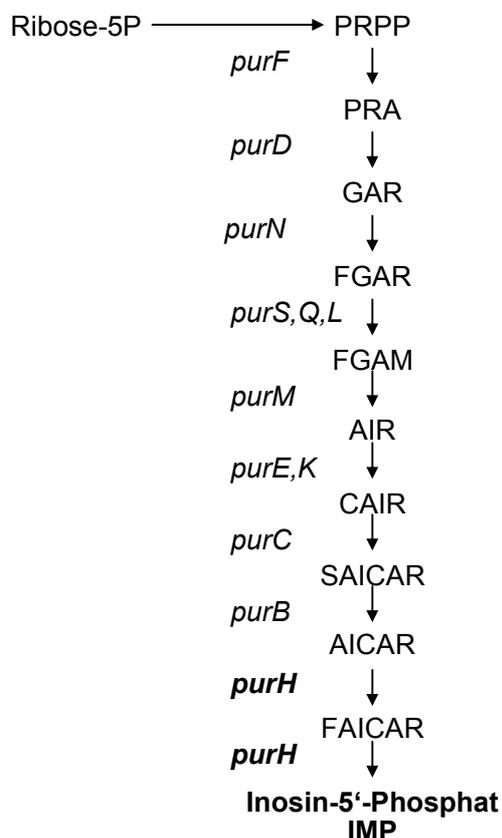


Abb. 3 Die *de novo*-Purinbiosynthese. Die von dem *pur*-Operon (kursiv) kodierten Enzyme katalysieren die Synthese von Inosin-5' Phosphat ausgehend von PRPP.

In STM-Studien wurden in *S. aureus* und *S. pneumoniae* Gene der Purinbiosynthese identifiziert, die essenziell für das Überleben in verschiedenen Infektionsmodellen sind (Mei *et al.*, 1997; Coulter *et al.*, 1998; Polissi *et al.*, 1998). In *L. monocytogenes* ist die Expression der Gene *purD* und *purH* in eukaryontischen Zellen stark induziert (Klarsfeld *et al.*, 1994). *pur*-Mutanten in *S. typhimurium* und *P. aeruginosa* sind *in vivo* attenuiert (Mahan *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1996). Für die Virulenz von *Pasteurella multocida* wurden verschiedenen Purinbiosynthesegene als bedeutsam erkannt. In einer STM-Studie wurde das Gen *purN* in einem murinen Infektionsmodell identifiziert (Fuller *et al.*, 2000). Eine Mutation in *purF* führte zu verringerter Virulenz in verschiedenen Infektionsmodellen (Harper *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Expression von *pur*-Genen im Blut infizierter Hühner erhöht ist (Boyce *et al.*, 2002). Im Serum mit *Vibrio vulnificus* infizierter Patienten wurden vermehrt Antikörper gegen PurH in in einer IVIAT-Studie (*in vivo*-induced antigen technology) nachgewiesen. In einem Zellkulturassay wies die *purH*-Mutante verringerte Zytotoxizität auf (Kim *et al.*, 2003). In *S. aureus* war bei Wachstum in Milch die Transkription der Purinbiosynthesegene *purH*, *purD* und *yexA* stark aktiviert und eine *purH*-Mutante war im Wachstum in Molke beeinträchtigt (Lammers *et al.*, 2000). Auch in *L. monocytogenes* zeigte eine *purH*-Mutante einen Wachstumsdefekt in definiertem Medium (Klarsfeld *et al.*, 1994). Mittlerweile wurden Ansätze verfolgt, in denen purinbiosynthesedefekte Mutanten für die Entwicklung von virulenzattenuierten Vakzinstämmen in *Yersinia pestis* und *Shigella flexneri* getestet wurden (Cersini *et al.*, 1998; Cersini *et al.*, 2003; Flashner *et al.*, 2004). Purinauxotrophe *Salmonella*-Stämme zeigten ebenfalls eine attenuierte Virulenz *in vivo* und wurden bereits als Vakzinstämmen eingesetzt (Levine *et al.*, 1987).

1.2.1.5. Das SsrA-SmpB-System und der Trans-Translationsprozess

Für die Wahl des SsrA-SmpB-System als ein putatives Target für antibakterielle Therapien sprechen gleich mehrere Gründe. Es ist innerhalb der Prokaryonten hochkonserviert und spielt eine Rolle in einem für *S. aureus* möglicherweise essenziellen Prozess, der in dieser Form bei Eukaryonten nicht vorkommt (Frischmeyer *et al.*, 2002). SsrA (für small stable RNA), auch als 10Sa RNA oder tmRNA bekannt, ist ein bei allen Eubakterien hochkonserviertes RNA-Molekül (Williams, 2002), das über Bereiche mit tRNA- und mit mRNA-Funktion verfügt (Komine *et al.*, 1994; Atkins & Gesteland, 1996; Jentsch, 1996; Keiler & Sauer, 1996). Das SsrA-SmpB-System erfüllt die grundlegende Funktion der Trans – Translation,

bei dem es sich um ein Translationskontrollsystem handelt. Diese Funktion führt zu der Befreiung von Ribosomen, die durch unvollständig translatierter Proteine blockiert wurden. Dabei werden fehlerhafte Polypeptide markiert und der Degradation zugeführt (Übersicht siehe: (Muto *et al.*, 1998; Karzai *et al.*, 2000; Gillet & Felden, 2001; Withey & Friedman, 2002; Williams, 2003). Während des Translationsprozesses kann es aus mehreren Gründen zu einer Blockierung der Ribosomen kommen, wie beispielsweise fehlerhafte mRNA, die durch eine Leserasterverschiebung über kein korrektes Stopp-Kodon verfügt, Stopp-Kodons mit geringer Effektivität (Collier *et al.*, 2002) sowie tRNA-Mangel (Roche & Sauer, 1999; Hayes *et al.*, 2002b).

blockiertes Ribosom:

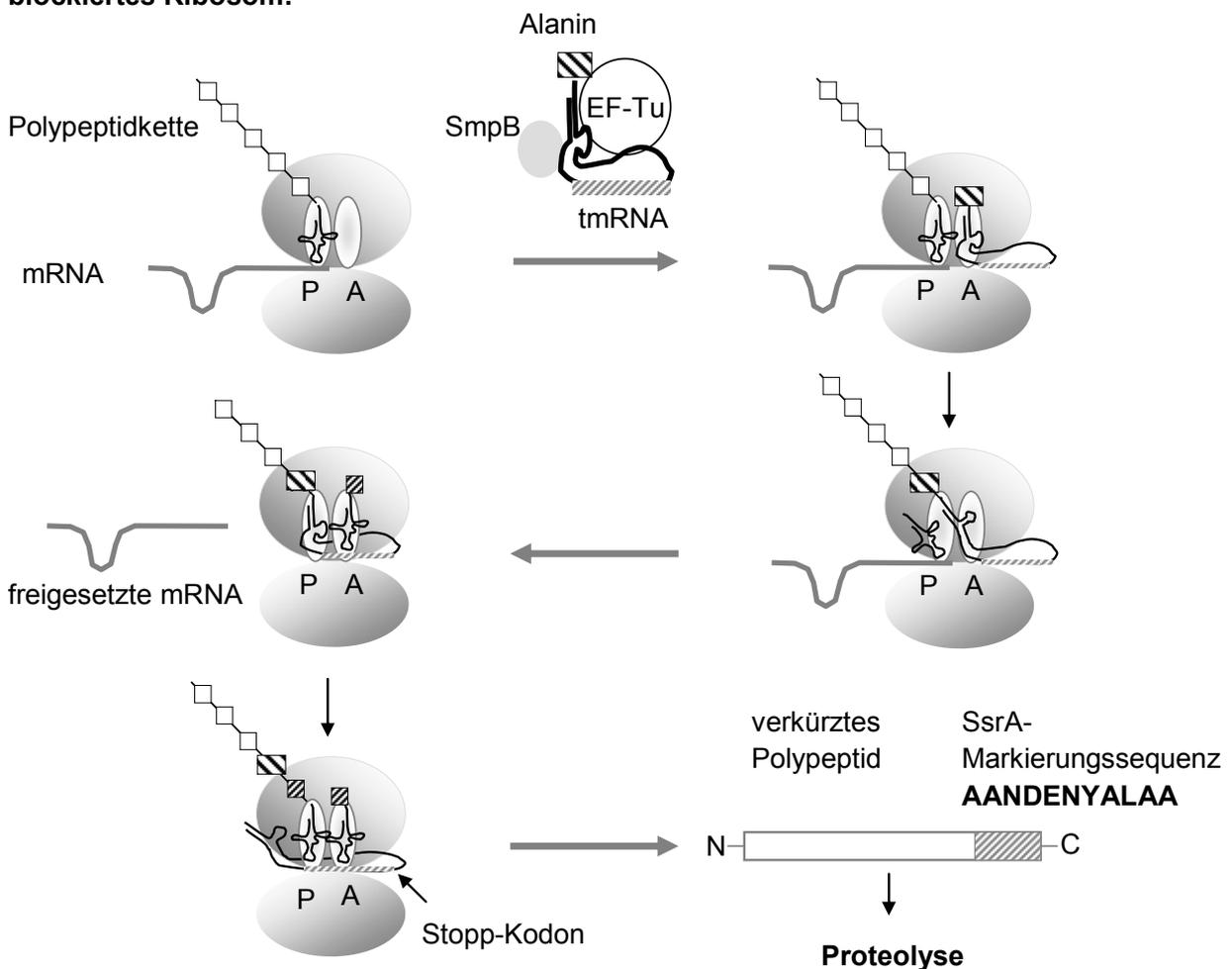


Abb. 4 Übersicht über den SsrA-SmpB-vermittelten Trans-Translations-Prozess (nach (Vioque & de la Cruz, 2003)). Erläuterungen siehe Text.

In der Zelle liegt die tmRNA mit dem Protein SmpB (small st^uable protein B) assoziiert vor, das die Bindung an die 70S-Untereinheit des Ribosomen vermittelt (Karzai *et al.*, 1999). Die durch die Alanyl-tRNA-Synthetase aminoacylierte tmRNA interagiert mit dem Elongationsfaktor Tu (Ef-Tu) und GTP und formt einen ternären Komplex (Komine *et al.*, 1994; Rudinger-Thirion *et al.*, 1999). In ihrer Funktion als tRNA gelangt die tmRNA an die Akzeptor-Seite des blockierten Ribosoms und fügt Alanin an die unvollständig translatierte Polypeptidkette an (Abb. 4). Im nächsten Schritt dient der für die mRNA-Funktion benötigte Bereich der tmRNA als Matrize für den Translationprozess. Dabei wird eine kurze Peptidsequenz (11 Aminosäuren) an die C-terminale Aminosäuresequenz der wachsenden Polypeptidkette gehängt. Die Translation wird schließlich durch Einführung eines korrekten Stopp-Kodons beendet (Keiler *et al.*, 1996; Muto *et al.*, 1998; Hayes *et al.*, 2002a; Sunohara *et al.*, 2002). Die Markierungssequenz ist hochkonserviert und dient als Erkennungssequenz für verschiedene Proteasen, wodurch das fehlerhafte Polypeptid degradiert wird. Für *E. coli* wurden vier Proteasen identifiziert, die markierte Proteine im Zytoplasma degradieren. ClpXP, ClpAP und FtsH (HflB) (Keiler & Sauer, 1996; Gottesman, 1998; Herman *et al.*, 1998). Das SsrA-SmpB-System ist in die Stressantwort bei *B. subtilis* und *E. coli* involviert und die Inaktivierung des Systems führt zu Wachstumsbeeinträchtigungen unter verschiedenen Bedingungen (Oh & Apirion, 1991; Muto *et al.*, 2000). Für *Neisseria gonorrhoeae* konnte es als essenziell nachgewiesen werden und eine Transposon-Mutagenese-Studie deutet auf die essenzielle Rolle in *Mycoplasma genitalium* und *Mycoplasma pneumoniae* hin (Hutchison *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000). Bei *Salmonella typhimurium* wird das System für die vollständige Virulenzentwicklung benötigt (Julio *et al.*, 2000). In *S. typhimurium* und *E. coli* weisen Mutanten, in denen der Trans-Translationsprozess inaktiviert wurde, eine Hypersensitivität gegenüber verschiedene Proteinsynthese-Inhibitoren auf (de la Cruz & Vioque, 2001; Abo *et al.*, 2002). Das SsrA-SmpB-System ist essenziell für das Überleben in Anwesenheit subletaler Proteinsyntheseinhibitor-Konzentrationen (Vioque & de la Cruz, 2003).

1.3.Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die beschriebenen putativen Targets zu inaktivieren und die daraus resultierenden Auswirkungen auf *S. aureus* zu charakterisieren. Die Gene *clpP*, *arlR*, *arlS*, *putP*, *purH*, *ssrA* und *smpB* sollten durch homologe Rekombination mit Hilfe einer Erythromycin-Resistenzkassette (*ermB*) inaktiviert werden. Sollte das ausgesuchte Zielgen sich nicht deletieren lassen, sollten alternative Strategien zum Einsatz kommen. Hierzu wurden konditional letale Systeme verwendet, in denen durch gesteuerte Expression des zu untersuchenden Gens die Überlebensnotwendigkeit nachgewiesen werden sollte. Um Hinweise zur Eignung dieser Faktoren als Ziele für die Entwicklung neuer Antiinfektiva zu gewinnen, sollten die erfolgreich hergestellten Deletionsmutanten mit besonderem Interesse auf die Virulenzentwicklung phänotypisch charakterisiert werden. Mit Microarray-Hybridisierungsexperimenten sollten der Einfluss der Genen *clpP* und *arlR* auf die globale Genexpression in *S. aureus* untersucht werden.

2. MATERIAL

2.1. Geräte

Autoklaven	Integra Bioscience, H+P Varioklav
Brutschränke	Heraeus, Memmert
Elektrophoresekammern	Hartenstein (Würzburg), BioRad
Elektroporator	BioRad
FastPrep F120	BIO 101, Savant
Filme	Hyperfilm ECL, Amersham
Film-Entwicklung	Agfa (Curix60)
Heizblöcke	Eppendorf-Thermostat 5320, Liebisch
Hybridisierungsöfen	Hybaid (Mini 10)
Magnetrührer	GLW (M21)
Microarray-Scanner	Genepix 4000B, Molecular Dynamics
Mikroliterpipetten	Gilson, Eppendorf
Mikroskope	Leitz, Zeiss
Mikrowellengerät	Siemens
Netzgeräte	BioRad Power Pac 300, Consort E455
PCR-Thermocycler	Biometra (T3 Thermocycler)
pH-Meter	WTW pH 523, Metrohm-Herisau
Phosphoimager	Amersham Bioscience (Typhoon 4600)
Photometer	Pharmacia, Amersham Bioscience
Real-Time PCR Cycler	iCycler (MyiQ), BioRad
Schüttelinkubator	Braun-Melsungen (Clim-O-Shake)
Sequenzierer	MWG-Biotech (LiCor Modell 4000) Perkin Elmer (ABI PRISM)
Speedvac-Concentrator	UNIVAPO 150H Uniequipe
Sterilarbeitsbank	NuAire II Type A/B3, Heraeus Lamin Air HBB2448, Flow Gelaire
Tisch-Mixer	Eppendorf, Mixer 5432
Ultraschallgerät	Branson Sonifier B12
UV-Fotoanlage	Mitsubishi, BioRad

Methoden

Vakuumpumpe	Pharmacia LKB, Vacu, Gene Pump
Vortexer	GLW (L46)
Waagen	Sartorius 2403, Satorius Feinwaage
Wasserbad	GFL 1083, Memmert
Zentrifugen	Heraeus, Megafuge 1.0 R; Minifuge RF Eppendorf, Zentrifuge 5415C Beckmann J2-21 und J-21B mit JA10 und JA20 Festwinkelrotoren

2.2. Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Enzyme und verwendete Kits

Sämtliche Verbrauchsmaterialien lieferten die Firmen ABgene, BioRad, Eppendorf, Falcon, Greiner, Peqlab, Millipore, Nalge Nunc International, Nalgene, Sarstedt und Schleicher & Schüll. Die verwendeten Chemikalien, Enzyme, Antibiotika und Nährstoffe wurden von den Firmen Applichem, 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
- Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits with AmpliTaq DNA Polymerase, FS; Applied Biosystems
- GENE CLEAN III Kit, Q-BIO gene, Europe
- iQ, SYBR Green Supermix, BioRad, München, Deutschland
- pGEM-T Easy Vector System, Promega, Madison, USA
- Qiaquick PCR-Purification-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
- RNeasy-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
- Sequi Therm DNA Sequencing Kit-LC; Epicentre Technologies
- SuperScript III Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, California

2.3. Medien, Agarplatten und Antibiotika

Medien für Flüssigkulturen und Agarplatten wurden bei 120°C und 1 bar für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Zusätze wurden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen der Lösungen auf 40-50°C zugegeben.

LB-Medium:	Bactotrypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Methoden

B-Medium:	Bactotrypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
TSB-Medium:	Trypticase Soy Broth (Difco)	30 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Agarplatten:

Zu den jeweiligen Medien wurden 1,5 % Agar hinzugefügt.

LB-X-Gal-Platten:

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

Blutagarplatten:

5 % Kaninchen- oder Schafsblut zu abgekühltem (50°C) LB-Agar geben

MKP-Platten (Mannitol-Kochsalz-Phenolrot-Platten):

Pepton	10 g
Fleischextrakt	1 g
NaCl	75 g
Mannitol	10 g
Phenolrot	0,025 g
Agar	12 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

CDM-Medium (chemisch definiertes Medium):

Es wurden fünf Chemikalien-Gruppen getrennt vorbereitet und nach dem Autoklavieren (Gruppen 1 und 5) bzw. nach Sterilfiltration (Gruppen 2, 3 und 4) zusammengegeben. Der pH-Wert jeder Gruppe wurde auf 7,0 eingestellt. Die Mengenangaben beziehen sich auf 1 l Medium.

Gruppe 1

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	5 mg
K ₂ HPO ₄	200 mg
KH ₂ PO ₄	200 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄	5 mg

Gruppe 2

Alanin	100 mg
Arginin	100 mg
Aspartat	100 mg
Cystein	50 mg

Methoden

Glutamat	100 mg
Glycin	100 mg
Histidin	100 mg
Isoleucin	100 mg
Leucin	100 mg
Lysin	100 mg
Methionin	100 mg
Phenylalanin	100 mg
Prolin	100 mg
Hydroxyprolin	100 mg
Serin	100 mg
Tryptophan	100 mg
Tyrosin	100 mg
Valin	100 mg
Gruppe 3	
p-Aminobenzoesäure	0,2 mg
Biotin	0,2 mg
Niacinamid	1 mg
β-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid	2,5 mg
Pyridoxamin	1 mg
Riboflavin	2 mg
Gruppe 4	
Adenin	20 mg
Guanin-Hydrochlorid	20 mg
Uracil	20 mg
Gruppe 5	
Glukose	5000 mg
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	10 mg
Na ₂ HPO ₄	300 mg
NaHCO ₃	500 mg

Antibiotika:

Tabelle 1 In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stocklösung (gelöst in)
Ampicillin	100 mg/ml (H ₂ O _{dest.})
Chloramphenicol	10 mg/ml (100 % EtOH)
Erythromycin	10 mg/ml (70 % EtOH)
Gentamicin	10 mg/ml (H ₂ O _{dest.})

Die Aufbewahrung aller Antibiotika-Stammlösungen erfolgte bei -20°C.

2.4. Bakterienstämme

Tabelle 2 In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

S. aureus-Stamm	Genotyp	Herkunft/ Referenz
8325	NCTC 8325; Wildtyp mit 11 Bp-Deletion in <i>rsbU</i>	Laborstammsammlung
RN4220	NCTC 8325-4-r; Restriktionsmutante mit 11 Bp-Deletion in <i>rsbU</i>	(Kreiswirth, 1983)
8325-4	NCTC 8325, 8325-Derivat, von Prophagen und Plasmiden befreit	Laborstammsammlung
8325-SH1000	8325-4-Derivat, <i>rsbU</i> ⁺	(Horsburgh <i>et al.</i> , 2002a)
MA12	MSSA, klinisches Isolat, Nasenabstrich	(Rachid <i>et al.</i> , 2000)
377	Newbould 305 (ATCC 29740), bovines mastitis-Isolat	(Newbould, 1974)
COL	MRSA, hohe Methicillin-Resistenz, Tetrazyklin-Resistenzplasmid	Tübingen
Wood46	α -Hämolyisin produzierender Stamm	(Gray & Kehoe, 1984)
Cowan	NCTC 8530; klinisches Isolat (septische Arthritis)	Laborstammsammlung
MA12 <i>ssrA</i>	MA12 mit <i>ermB</i> -Insertion in <i>ssrA</i> , Em ^R	diese Arbeit
377P <i>xylR</i> <i>smpB</i>	377 mit <i>xylR::smpB</i> -Fusion	diese Arbeit
8325 Δ <i>arlR</i>	8325 mit <i>arlR</i> -Deletion, <i>arlR::ermB</i> , Em ^R	diese Arbeit
8325 Δ <i>arlS</i>	8325 mit <i>arlS</i> -Deletion, <i>arlS::ermB</i> , Em ^R	diese Arbeit
8325 Δ <i>arlR-arlR</i> ⁺	8325 Δ <i>arlR</i> , pHPS <i>arlRS</i>	diese Arbeit
COL Δ <i>arlS</i>	COL mit <i>arlR</i> -Deletion, <i>arlS::ermB</i> , Em ^R	diese Arbeit
Wood46 Δ <i>arlS</i>	Wood46 mit <i>arlS</i> -Deletion, <i>arlS::ermB</i> , Em ^R	diese Arbeit
377 Δ <i>arlR</i>	377 mit <i>arlR</i> -Deletion, <i>arlR::ermB</i> , Em ^R	diese Arbeit
8325 Δ <i>clpP</i>	8325 mit <i>clpP</i> -Deletion, <i>clpP::ermB</i> , Em ^R	diese Arbeit
8325 Δ <i>clpP-clpP</i> ⁺	8325 Δ <i>clpP</i> , pHPS <i>clpP</i> , Em ^R , Cm ^R	diese Arbeit
8325 Δ <i>putP</i>	8325 mit <i>putP</i> -Deletion, <i>putP::ermB</i> , Em ^R	diese Arbeit
8325 Δ <i>purH</i>	8325 mit <i>purH</i> -Deletion, <i>purH::ermB</i> , Em ^R	diese Arbeit
MA12 Δ <i>purH</i>	MA12 mit <i>purH</i> -Deletion, <i>purH::ermB</i> , Em ^R	diese Arbeit
8325 Δ <i>agrC</i>	8325 mit <i>agrC</i> -Deletion, <i>agrC::ermB</i> , Em ^R	(Schauß, 2002)
RN <i>xylR</i>	RN4220 mit pRB <i>xylR</i>	diese Arbeit
RN <i>xylR</i> <i>smpB</i> <i>ssrA</i>	RN4220 mit pRB <i>xylR</i> <i>smpB</i> <i>ssrA</i>	diese Arbeit
RN <i>xylR</i> <i>smpB</i>	RN4220 mit pRB <i>xylR</i> <i>smpB</i>	diese Arbeit
RN <i>xylR</i> <i>ssrA</i>	RN4220 mit pRB <i>xylR</i> <i>ssrA</i>	diese Arbeit
RN <i>xylR</i> 263	RN4220 mit pRB <i>xylR</i> 263	diese Arbeit

S. aureus-Stamm	Genotyp	Herkunft/ Referenz
RNxy/R505	RN4220 mit pRBxy/R505	diese Arbeit
RNxy/R750	RN4220 mit pRBxy/R750	diese Arbeit
RNxy/R567	RN4220 mit pRBxy/R567	diese Arbeit
weitere Bakterienstämme		
<i>S. carnosus</i> -TM300	nicht-pathogene Staphylokokken-Art	(Schleifer & Fischer, 1982)
<i>S. epidermidis</i> RP62A	Blutkultur-Isolat, <i>ica</i> -positiv	Laborstammsammlung
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^-), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>GyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ^- , $\Delta(\text{argF-lac})\text{U169}$, $\Phi 80\text{dlacZ } \Delta\text{M15}$	BRL, Bethesda Research Laboratories

2.5. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-ARK, MWG-Biotech und Qiagen Operon bezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Primernamen/ Schnittstelle	Sequenz (5' → 3')	Lage^a	Länge^b
ΔarlR Deletionsmutante:			
arlR1/ <i>HindIII</i>	CCC <u>AAG CTT</u> GGG TTA TGT GCA GCT ATG	-937	934
arlR2/ <i>BamHI</i>	CGG <u>GAT CCG</u> TAC ACC TCA TAT TAC GAC	-3	
arlR3/ <i>PstI</i>	AAC <u>TGC AGG</u> TGG CGT TGG GTA TGT GAT A	+634	
arlR4/ <i>EcoRI</i>	GGA <u>ATT CGA</u> TGT CAG ATC CGT ATC	+1662	
ΔarlS Deletionsmutante:			
arlS1/ <i>HindIII</i>	CCC <u>AAG CTT</u> CGC ACA TTG AAA TGA TGT G	-1027	1030
arlS2/ <i>BamHI</i>	CGG <u>GAT CCC</u> ATC GTA TCA CAT ACC CAA CG	+3	
arlS3/ <i>PstI</i>	AAC <u>TGC AGC</u> ATG ACT GAG ACG TCA ATC	+1357	
arlS4/ <i>EcoRI</i>	GGA <u>ATT CCG</u> CAG CAA TCG TAA TAG TAC G	+2325	
Komplementierung der ΔarlR-Mutante:			
arlK1/ <i>BamHI</i>	CGG <u>GAT CCG</u> GTA AGG CCT TGT GTT ACA GT	-255	2601
arlK4/ <i>EcoRI</i>	CGG <u>AAT TCTCG</u> CAC CGA AGT TTA CAG GA	+2346	
ΔclpP Deletionsmutanten:			
clp1/ <i>HindIII</i>	CCC <u>AAG CTT</u> GTC ATG CAG AAG GCT TAA CG	-1054	1045
clp2/ <i>BamHI</i>	CGG <u>GAT CCC</u> CTC CTT GTA ATA ACT GTT ACT C	-9	
clp3/ <i>PstI</i>	AAC <u>TGC AGG</u> TAG ACT AAG CTG TCT GCT C	+601	
clp4/ <i>EcoRI</i> *	GGA <u>ATT CGT</u> CAT CAA CTT AGC AGG TGC	+1552	
Komplementierung der ΔclpP-Mutante:			
clpK1/ <i>BamHI</i>	CGG <u>GAT CCC</u> CAT TAC ACC ACA AGG AGC A		824

Methoden

Primername/ Schnittstelle	Sequenz (5' → 3')	Lage ^a	Länge ^b
clpK2/ <i>EcoRI</i>	CGG <u>AAT TCG</u> AGC AGA CAG CTT AGT CTA C		
Primer zur Überprüfung der $\Delta clpP$ Mutante mittels PCR und/oder Southern Blot:			
clp5	CAG GTG GCT CAG TGA ATA AC		
clp7	GAT GCA GCC ATA CCG ATA CA		
clp8	GCT GCG ATG AAA CAA GTT GAG		
clp9	CAG GTA CCA TCA CTT CAT C		
clp10	GGT TCA CAA ATT GAT GAC AAC G		
$\Delta putP$ –Deletionsmutante:			
putP1/ <i>HindIII</i>	CCC <u>AAG CTT</u> CGT TCG ACA TTT ACC TTT GCG	-1033	1087
putP2/ <i>BamHI</i>	CGG <u>GAT CCG</u> CGT TTG CAA TAG GGG TAA C	+54	
putP3/ <i>PstI</i>	AAC <u>TGC AGT</u> TCC AGT ATC CAA TGG CGA C	+1116	1073
putP4/ <i>EcoRI</i>	CGG <u>AAT TCT</u> GGT AGT CGT ATG GTG ATG C	+2189	
Primer zur Überprüfung der $\Delta putP$ Mutante mittels PCR und/oder Southern Blot:			
putP5	CCC ACT TAC GTT CTT CAC CT	-1122	
putP6	GGA TAT GGC GTT ACG CAC TA	+2226	
putP7	GCG TTC CCA ACA ACT GCC AT	+1024	
putP8	GAG TGT TCC TAC TGA CGT AC	+137	
$\Delta purH$ –Deletionsmutante:			
purH1/ <i>EcoRI</i>	CGG <u>AAT TCG</u> TTA TAG GGC TTG CGT CAA G	-1072	1217
purH2/ <i>BamHI</i>	CGG <u>GAT CCC</u> GAA CTG GTA CAT TTG CTT C	+145	
purH3/ <i>PstI</i>	AAC <u>TGC AGG</u> TAG TCA CAG GCA CTC GAC AT	+1455	1213
purH4/ <i>HindIII</i>	CCC <u>AAG CTT</u> CGC TGT GCA TCT TGT ACA TTG	+2668	
Primer zur Überprüfung der $\Delta purH$ Mutante mittels PCR und/oder Southern Blot:			
purH5	GTT ATA GGG CTT GCG TCA AG	-1144	
purH6	CGC AAT GTC ATG ACG ATA G	+2732	
purH7	AGC AGC ACC GAC ACG ATT	+1268	
purH8	TAC ATC CGG CTG TTC ATG G	+202	
<i>smpB::ermB</i> -Insertionsmutante:			
smpB1	TGA ACG TCG TGC TTA TTG AGG	-577	1949
smpB2	CGT CTC GTC AAC TAT TGC TG	+1372	
<i>ssrA::ermB</i> -Insertionsmutante:			
ssrA1	GGT ATT GTC AGC TCA GTA GCT	-1044	2195
ssrA2	GGA GTA GTC TGT TCT GAC TC	+1151	
$\Delta ssrA$ -Deletionsmutante:			
ssrA11/ <i>EcoRI</i>	GGA <u>ATT CGG</u> TAT TGT CAG CTC AGT AGC	-1044	1034
ssrA12/ <i>BamHI</i>	CGG <u>GAT CCA</u> ATC AAA CAA ATC ATA C	-10	
ssrA13/ <i>PstI</i>	AAC <u>TGC AGG</u> TAG CCT ACA GCC TTT GTG G	+364	1038
ssrA14/ <i>HindIII</i>	CCC <u>AAG CTT</u> CTT GTT CCA ATT GGC TAC	+1402	
konditionales System für die kontrollierte Expression von <i>ssrA</i> und <i>smpB</i> :			
ssrA7/ <i>BamHI</i>	CGG <u>GAT CCG</u> TAT GAT TTG TTT GAT T	-26	352
ssrA8/ <i>KpnI</i>	GGT <u>ACC GGT</u> CCT GAT ACA CAT CT	+326	

Methoden

Primername/ Schnittstelle	Sequenz (5' → 3')	Lage ^a	Länge ^b
smpB7/ <i>Bam</i> HI	<u>CGG GAT CCA</u> GAA AGC ACG TCG TAA G	-47	430
smpB8/ <i>Kpn</i> I	<u>GGT ACC</u> CTT ACC TCG TGC AAC ACC	+382	
Primer für die Herstellung von Sonden für Northern- und Southern Blot-Hybridisierungen:			
ssrA3	GGG GAC GTT CAT GGA TTC G	0	+
ssrA4	AGA CGG CGG GAT TTG AAC CC	+357	-
smpB3	GGC TAA GAA GAA ATC ACC AGG	+3	+
smpB4	TAA CGG GCT TTC ATA TCG CG	+460	-
Antisense-RNA Strategie für die Inaktivierung von <i>ssrA</i> und <i>smpB</i> :			
ssrAA1/ <i>Eco</i> RI	<u>GGA ATT CGT</u> ATG ATT TGT TTG ATT TAT TAT TTC	-26	+
ssrAA2/ <i>Bam</i> HI	<u>CGG GAT CCT</u> GGA GAC GGC GGG ATT TGA A	+357	-
ssrAA3/ <i>Bam</i> HI	<u>CGG GAT CCT</u> CGC GTT AAC AGC ACA TAG G	+173	-
smpBA1/ <i>Eco</i> RI	<u>GGA ATT CGC</u> AGC AAT GAG GTG AGT ATG	-22	+
smpBA2/ <i>Bam</i> HI	<u>CGG GAT CCT</u> TAA CGG GCT TTC ATA TCG CG	+460	-
smpBA3/ <i>Eco</i> RI	<u>GGA ATT CGC</u> GAT TTA GTT GCT TAA TCG GGC	+465	+
smpBA4/ <i>Eco</i> RI	<u>GGA ATT CCA</u> CGA TCC TCC TCG TTC TCG	+228	+
<i>ermB</i> -spezifische Primer:			
erm3/ <i>Sac</i> I	<u>CGA GCT CCT</u> CTC TAT TGT GAG TTA TTA GTG G	99	+
erm4/ <i>Sac</i> I	<u>CGA GCT CAG</u> CTC CTT GGA AGC TGT CAG TAG	1464	-
erm5	CCA TAC CAC AGA TGT TCC	1161	+
erm10	CAC CTG CAA TAA CCG TTA CC	201	-
erm11	GAT AGA TGT CAG ACG CAT GG	1000	-
erm1	CCC AAG CTT GAG CTC GGT ACC CGG GGA TCC		pEC1
erm2	GCC AAG CTT GCA TGC CTG CAG G		pEC1
Universalprimer für die Sequenzierung:			
M13uni	TGT AAA ACG ACG GCC AGT		
M13rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC		
RT-PCR:			
hla1	TGG CAA AAT TTA TTC CCG A		+
hla2	TCA ACT TTG ACT AAC CCT CGA A		+
hla3	CTG TCG CTA ATG CCG CAG AT		+
hla4	GTT GAT TGC CAT ATA CCG GGT TC		-
1873-uni	ACA AGG GGG AGT CAG ACC TG		+
rsbU-uni	TGG CAC AAT GAG CTT TGC TG		+
rsbU-rev	CAG CAA AGC TCA TTG TGC CA		-
rsbV-uni	CCT ATG AGA CAA GAT GGA ACT CGT G		+
rsbV-rev	CAC GAG TTC CAT CTT GTC TCA TAG G		-
sigB-rev	CAC TGA TAG AAG GTG AAC GCT C		-
sigB-L	CAG CTA ATG AAG TTT CAC CTG AGC		+
sigB-R	GCG GTT AGT TCA TCG CTC AC		-
cfIA-L	TGT GGC GCA AAA TCC AGT AC		+
cfIA-R	GCA TCT GTA CTC TGT GGA GCT G		-
fnbB-L	ACA GTA GAG GAA AGT GGG AGT TC		+

Methoden

Primername/ Schnittstelle	Sequenz (5' → 3')	Lage ^a	Länge ^b
fnbB-R	TGA AAC TGC TGT AAC GTC AGC		-
fnb-L	GCT TGA CAT TGA TTA CCA CAC AGC		+
fnb-R	TCG CTC ACT GCG CCA GTT AC		-
16SrRNAup	TTG CTT CTC TGA TGT TAG CG		+
16SrRNAdown	TCT AAT CCT GTT TGA TCC C		-

a: Lage relativ zum Startcodon

b: Länge in Bp; +/- Sense- oder Antisenseorientierung des Primers

2.6. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften ^a	Herkunft/ Referenz
pGEM-T	Vektorsystem für die direkte Klonierung von PCR-Produkten, Ap ^R , blau/weiß-Selektion	Promega
pBT1	Shuttle-Vektor, Ap ^R in <i>E. coli</i> , Cm ^R in <i>S. aureus</i>	(Brückner, 1997a)
pBT2	Shuttle-Vektor, Ap ^R in <i>E. coli</i> , Cm ^R in <i>S. aureus</i>	(Brückner, 1997a)
pBT2 <i>xyIR</i>	pBT2-Derivat mit <i>xyIR</i> (1683 Bp)	(Ohlsen, 2001)
pHW2	pBT2 mit <i>ermB</i> -Kassette	(Ohlsen, 2001)
pRB473	Shuttle-Vektor, Ap ^R in <i>E. coli</i> , Cm ^R in <i>S. aureus</i>	(Brückner, 1992)
pRB473 <i>xyIR</i>	pRB473-Derivat mit <i>xyIR</i> (1683 Bp)	(Ohlsen, 2001)
pEC1	pUC18 mit <i>ermB</i> -Kassette, Ap ^R , Em ^R	(Brückner, 1992)
pHPS9	Shuttle-Vektor, Cm ^R in <i>E. coli</i> , Cm ^R und Em ^R in <i>S. aureus</i> , blau/weiß-Selektion	(Haima <i>et al.</i> , 1990)
pBCKS	Cm ^R , blau/weiß-Selektion	Stratagene
pGEM-T <i>smpB7/8</i>	pGEM-T; 5'-Fragment von <i>smpB</i>	diese Arbeit
pGEM-T <i>ssrA7/8</i>	pGEM-T; 5'-Fragment von <i>ssrA</i>	diese Arbeit
pBT2 <i>xyIR:smpB</i>	pBT2 <i>xyIR</i> ; 5'-Fragment von <i>smpB</i>	diese Arbeit
pBT2 <i>xyIR:ssrA</i>	pBT2 <i>xyIR</i> ; 5'-Fragment von <i>ssrA</i>	diese Arbeit
pGEM-T <i>arlR1/2</i>	pGEM-T; Upstreamfragment <i>arlR</i>	diese Arbeit
pGEM-T <i>arlR3/4</i>	pGEM-T; Downstreamfragment <i>arlR</i>	diese Arbeit
pGEM-T <i>arlS1/2</i>	pGEM-T; Upstreamfragment <i>arlS</i>	diese Arbeit
pGEM-T <i>arlR3/4</i>	pGEM-T; Downstreamfragment <i>arlS</i>	diese Arbeit
pMAΔ <i>arlR</i>	pBT2 zur Deletion von <i>arlR</i> ; <i>arlR1/2-ermB-arlR3/4</i>	diese Arbeit
pMAΔ <i>arlS</i>	pBT2 zur Deletion von <i>arlS</i> ; <i>arlS1/2-ermB-arlS3/4</i>	diese Arbeit
pHPS <i>arlRS</i>	pHPS9 mit <i>arlRS</i> -Fragment	diese Arbeit
pGEM-T <i>clpP1/2</i>	pGEM-T; Upstreamfragment <i>clpP</i>	diese Arbeit

Methoden

Plasmid	Eigenschaften^a	Herkunft/ Referenz
pGEM-T <i>clpP</i> 3/4	pGEM-T; Downstreamfragment <i>clpP</i>	diese Arbeit
pMAΔ <i>clpP</i>	pBT2 zur Deletion von <i>clpP</i> ; <i>clpP</i> 1/2-ermB- <i>clpP</i> 3/4	diese Arbeit
pHPS <i>clpP</i>	pHPS9 mit <i>clpP</i> -Fragment	diese Arbeit
pGEM-T <i>putP</i> 1/2	pGEM-T; Upstreamfragment <i>putP</i>	diese Arbeit
pGEM-T <i>putP</i> 3/4	pGEM-T; Downstreamfragment <i>putP</i>	diese Arbeit
pMAΔ <i>putP</i>	pBT2 zur Deletion von <i>putP</i> ; <i>putP</i> 1/2-ermB- <i>putP</i> 3/4	diese Arbeit
pGEM-T <i>purH</i> 1/2	pGEM-T; Upstreamfragment <i>purH</i>	diese Arbeit
pGEM-T <i>purH</i> 3/4	pGEM-T; Downstreamfragment <i>purH</i>	diese Arbeit
pMAΔ <i>purH</i>	pBT2 zur Deletion von <i>purH</i> ; <i>purH</i> 1/2-ermB- <i>purH</i> 3/4	diese Arbeit
pGEM-T <i>ssrA</i>	pGEM-T; <i>ssrA</i> -Fragment	diese Arbeit
pBT1 <i>ssrA</i>	pBT1, <i>ssrA</i> -Fragment	diese Arbeit
pAM <i>ssrA</i> I	pBT1 für Insertion von <i>ermB</i> in <i>ssrA</i> ; <i>ssrA</i> 1-ermB- <i>ssrA</i> 2	diese Arbeit
pMAΔ <i>ssrA</i>	pBT2 zur Deletion von <i>ssrA</i> ; <i>ssrA</i> 1/2-ermB- <i>ssrA</i> 3/4	diese Arbeit
pGEM-T <i>smp</i>	pGEM-T; <i>smpB</i> -Fragment	diese Arbeit
pGEM-T <i>smpI</i>	pGEM-T; <i>smpB</i> :: <i>ermB</i> -Fragment	diese Arbeit
pBCSK <i>smpBI</i>	pBCSK, <i>smpB</i> :: <i>ermB</i> -Fragment	diese Arbeit
pMA <i>smpBI</i>	pBT2 für Insertion von <i>ermB</i> in <i>smpB</i> ; <i>smpB</i> 1-ermB- <i>smpB</i> 2	diese Arbeit
pGEM-T <i>smpBssrA</i>	pGEM-T mit Antisense- <i>smpBssrA</i> -Fragment, <i>smpBA</i> 1- <i>ssrAA</i> 2	diese Arbeit
pRB <i>xylR</i> <i>smpBssrA</i>	pRB473 <i>xylR</i> mit Antisense- <i>smpBssrA</i> -Fragment, <i>smpBA</i> 1- <i>ssrAA</i> 2	diese Arbeit
pGEM-T <i>smpBA</i>	pGEM-T mit Antisense- <i>smpB</i> -Fragment, <i>smpBA</i> 1- <i>smpBA</i> 2	diese Arbeit
pRB <i>xylR</i> <i>smpB</i>	pRB473 <i>xylR</i> mit Antisense- <i>smpB</i> -Fragment, <i>smpBA</i> 1- <i>smpBA</i> 2	diese Arbeit
pGEM-T <i>ssrAA</i>	pGEM-T mit Antisense- <i>ssrA</i> -Fragment, <i>ssrAA</i> 1- <i>ssrAA</i> 2	diese Arbeit
pRB <i>xylR</i> <i>ssrA</i>	pRB473 <i>xylR</i> mit Antisense- <i>smpB</i> -Fragment, <i>ssrAA</i> 1- <i>ssrAA</i> 2	diese Arbeit
pGEM-T263	pGEM-T mit Antisense-263 Bp-Fragment innerhalb von <i>smpBssrA</i> , <i>smpBA</i> 3- <i>ssrAA</i> 3	diese Arbeit
pRB <i>xylR</i> 263	pRB473 <i>xylR</i> mit Antisense-263 Bp-Fragment innerhalb von <i>smpBssrA</i> , <i>smpBA</i> 3- <i>ssrAA</i> 3	diese Arbeit
pGEM-T505	pGEM-T mit Antisense-505 Bp-Fragment innerhalb von <i>smpBssrA</i> , <i>smpBA</i> 4- <i>ssrAA</i> 3	diese Arbeit
pRB <i>xylR</i> 505	pRB473 <i>xylR</i> mit Antisense-505 Bp-Fragment innerhalb von <i>smpBssrA</i> , <i>smpBA</i> 4- <i>ssrAA</i> 3	diese Arbeit
pGEM-T750	pGEM-T mit Antisense-750 Bp-Fragment innerhalb von <i>smpBssrA</i> , <i>smpBA</i> 1- <i>ssrAA</i> 3	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften ^a	Herkunft/ Referenz
pRBxyIR750	pRB473xyIR mit Antisense-750 Bp-Fragment innerhalb von <i>smpBssrA</i> , <i>smpBA1-ssrAA3</i>	diese Arbeit
pGEM-T567	pGEM-T mit Antisense-567 Bp-Fragment innerhalb von <i>smpBssrA</i> , <i>smpBA1-ssrA12</i>	diese Arbeit
pRBxyIR567	pRB473xyIR mit Antisense-567 Bp-Fragment innerhalb von <i>smpBssrA</i> , <i>smpBA1-ssrAA12</i>	diese Arbeit

a: Größen und angefügte Restriktionsschnittstellen der in dieser Arbeit klonierten Fragmente siehe Tabelle 3

3. METHODEN

3.1.Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.1.1. Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden zur Inaktivierung von Nukleasen 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Andere Gebrauchsgegenstände wurden kurz vor Gebrauch mit vergälltem Ethanol (70 % [v/v]) gespült, hitzelabile Lösungen wurden durch Einwegfilter (Porengröße 0,2 µm, Nalge Nunc) steril filtriert. Alle für den Umgang mit RNA benötigten Lösungen wurden doppelt autoklaviert und z.T. DEPC-H₂O_{dest.} behandelt. Dazu wurde H₂O_{dest.} mit 1 % DEPC versetzt, ÜN bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert. Geräte sowie der Arbeitsplatz wurden mit 70 %-igem [v/v] Ethanol abgewischt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden zudem bei allen Arbeiten mit RNA Einweghandschuhe getragen.

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

Die Bakterien wurden über Nacht unter dem Selektionsdruck des jeweiligen Antibiotikums in 5 ml LB-Medium angezogen. Davon wurden 1,5 ml abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 150 µl Lösung I aufgenommen und resuspendiert. Danach wurde es mit dem gleichen Volumen Lösung II versetzt, vorsichtig geschwenkt, bis die Suspension aufklart und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Daraufhin wurden 150 µl Lösung III zugegeben und das Reaktionsgefäß für 10 min auf Eis gestellt. Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden durch einen 10 minütigen Zentrifugationsschritt (14000 rpm, RT) pelletiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 900 µl L6-Puffer und 50 µl Diatomeenerde-Suspension vorgelegt wurden. Der Ansatz wurde gut gevortext und für 1 min bei RT inkubiert. Die Diatomeenerde wurde über einen Filter abgetrennt und mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Flüssigkeitsreste wurden

durch einen anschließenden kurzen Zentrifugationsschritt (14000 rpm, RT, 20 s) entfernt. Die Filter wurden daraufhin auf ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 50 µl H₂O_{dest.} und einem weiteren kurzen Zentrifugationsschritt von der Diatomeenerde eluiert. Die so isolierte Plasmid-DNA konnte nun direkt für eine PCR-Reaktion oder eine Restriktionsspaltung eingesetzt werden oder wurde bei -20°C gelagert.

Lösung I:

50 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM EDTA, pH 8,0
100 µg/ml RNase A

Lösung II:

200 mM NaOH
1 % SDS

Lösung III:

3 M NaAcetat, pH 4,8

L6-Puffer

100 ml 0,1 M Tris-HCl, pH7,5
8,8 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
13,2 ml H₂O_{dest.}
2,6 ml Triton X-100
120 g Guanidinthiocyanat

Waschpuffer

10 ml 5 M NaCl
5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5
2,5 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 250 ml H₂O_{dest.}
+ 250 ml EtOH

Diatomeenerde

10 g Diatomeenerde
50 ml H₂O_{dest.}
500 µl HCl konz.

3.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. aureus*

Für die Plasmid-DNA-Isolierung aus *S. aureus* wurde das Protokoll wie folgt modifiziert: Die ÜN-Kultur wurde in B-Medium mit 1 % Glycin angezogen. Das Bakterienpellet wurde in 150 µl Lösung I aufgenommen und vollständig resuspendiert. Danach wurden 5-10 µl Lysostaphin (2 mg/ml) dazugegeben, vorsichtig gemischt und bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit konnte 10-30 min betragen und richtete sich nach der erfolgreichen Lyse der Bakterien.

3.1.4. Isolierung chromosomaler DNA aus *S. aureus*

Die Bakterien wurden in einer Übernachtskultur in B-Medium mit 1 % Glycin angezogen. 2 ml der Kultur wurden abzentrifugiert (2 min, 14000 rpm, RT) und das Pellet in 1 ml TNE-Puffer resuspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (2 min, 14000 rpm, RT) wurde der Puffer verworfen und die Bakterien in 0,5 ml TNEX-Puffer aufgenommen und durch vortexen vollständig resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 10-20 µl Lysostaphin (2 mg/ml) und einem Inkubationsschritt bei 37°C. Die Länge der Inkubationszeit schwankte zwischen 10-60 min und war abhängig von der erfolgreichen Lysierung des Bakterienmaterials. Anschließend wurden 40 µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzugegeben und der Ansatz für 30-60 min bei 60°C inkubiert. Danach wurde $\frac{1}{3}$ Volumen 5 M NaCl-Lösung hinzupipettiert und mit einem Volumen Chloroform versetzt. Es folgte ein Inkubationsschritt bei RT im

Tischrüttler, dem sich eine 20-minütige Zentrifugation (14000 rpm, RT) anschloss. Der wässrige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in bereits vorbereitete 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die chromosomale DNA wurde in diesem Ansatz durch die Zugabe von 1 Volumen Ethanol (96 % [v/v]) gefällt, indem das Reaktionsgefäß vorsichtig geschwenkt wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT) wurde der Ethanol dekantiert und das Pellet vorsichtig mit 70 %-igen Ethanol [v/v] gewaschen und wiederum zentrifugiert. Nach Trocknung des DNA-Pellets wurde es in 20 - 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ aufgenommen und durch vorsichtiges Schwenken gelöst. Die chromosomale DNA konnte nach einer Konzentrationsbestimmung (3.1.7) für PCR- oder Southern Blot-Analysen eingesetzt werden. Gelagert wurde sie bei 4°C, um eine Schädigung durch das Einfrieren zu vermeiden.

TNE

0,5 M Tris-HCl, pH8	10 ml
5 M NaCl	1 ml
0,5 M EDTA, pH8	10 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 500 ml

TNEX

TNE + 1 % Triton X-100

3.1.5. Isolierung der Gesamt-RNA aus *S. aureus* (Qiagen RNeasy-Kit)

Für die Extraktion bakterieller RNA wurden die Bakterien in Flüssigkultur bis zu der gewünschten optischen Dichte angezogen. Ein bestimmtes Volumen in Abhängigkeit zur optischen Dichte wurde abgenommen und mit 2 Volumen RNA-Protect (Qiagen) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Die zu präparierende Gesamtzellzahl der abgenommenen Kultur sollte 4×10^9 Bakterien/ml nicht überschreiten. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (5 min, 6000 rpm), konnten die gewonnenen Zellpellets entweder gleich weiterverarbeitet oder bei -80°C bis zu zwei Wochen gelagert werden.

Der Zellaufschluss erfolgte mechanisch in Reaktionsgefäßen mit RNase-freien Glaskugeln (Lysing Matrix E, Bio 101) unter Zuhilfenahme des Geräts „Fast Prep FP120“ (Bio 101). Die RNA-Extraktion wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) nach einem angepassten Protokoll durchgeführt. Hierzu wurden ca. 4×10^9 (ca. 4 ml $\text{OD}_{600}=1$) Bakterien in 850 μl RTL+ β -ME-Puffer resuspendiert, und in den Zellaufschluss-Reaktionsgefäßen aufgeschlossen (45 s; Stufe 6,5). Nach anschließender Zentrifugation für zwei Minuten bei 14000 rpm wurde der Überstand (ca. 700 μl) mit 500 μl Ethanol (96 % [v/v]) versetzt. Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (Qiagen) mit einer finalen Elution der RNA in 2 x

40 µl RNase-freiem Wasser. Die RNA konnte für Northern Blot-Analysen (3.1.14) ohne eine weitere Behandlung eingesetzt werden. Für die Herstellung von cDNA für RT-PCR und für die Sonden-Herstellung für die Microarray-Hybridisierung, wurde die RNA aufgereinigt, damit die noch in den Ansätzen vorhandene DNA vollständig entfernt wurde. Dazu wurde eine DNaseI-Behandlung (1 h, 37°C) unter Zugabe von 10 µl 10 x DNaseI-Puffer sowie 2 µl DNaseI (RNase frei, 10 U/µl, Roche) durchgeführt. Anschließend wurde ein Aliquot mittels PCR auf vorhandene DNA-Kontaminationen überprüft. Bei einer positiven PCR-Reaktion wurde die DNaseI-Behandlung durch erneute Zugabe von DNaseI und Inkubation bei 37°C wiederholt bis die Überprüfungs-PCR ein negatives Resultat ergab. Anschließend wurde die RNA nach Herstellerangaben mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 2 x 40 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die RNA-Qualität mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese beurteilt. Die isolierte und gereinigte RNA wurde bei -80°C gelagert.

10 x DNaseI-Puffer: 1 M Na-Acetat
 50 mM MgSO₄
 pH 5 (Acetat)

3.1.6. Aufreinigung von Nukleinsäuren

Zur Entfernung von einzelnen Nukleotiden, Oligonukleotiden, Enzymen und Puffer aus Restriktions- und PCR-Ansätzen wurde der „PCR-Purification-Kit“ (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Für die Isolierung einzelner DNA-Fragmente für Ligationen wurde aufgrund des geringeren Elutionsvolumens und der damit verbundenen höheren DNA-Konzentration, der „GeneClean-Kit“ (Q-BIO gene) verwendet.

3.1.7. Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle

Die Nukleinsäure-Konzentrationen in Lösungen wurden photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten ermittelt. Für eine OD₂₆₀ von 1 wurde für doppelsträngige DNA die Konzentration von 50 µg/ml, für RNA von 40 µg/ml zugrunde gelegt (Sambrook, 1989). Die Reinheit der Nukleinsäuren ließ sich aus dem Verhältnis der OD₂₆₀ zur OD₂₈₀ abschätzen. Bei reinen DNA- bzw. RNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 1,8 (Sambrook, 1989). Werte zwischen 1,8 und 2,1 können toleriert werden.

3.1.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.1.8.1. Standard-PCR

Diese Methode ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Durch den Einsatz modifizierter Primer, lassen sich u. a. bestimmte Restriktionsstellen an das PCR-Produkt anfügen, so dass Klonierungsschritte erleichtert werden können. Bei der Wahl der Oligonukleotid-Primer wurde darauf geachtet, dass sie möglichst einen GC-Gehalt von 50 % aufwiesen und nicht aufgrund von komplementären Bereichen zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigten. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die für Klonierungen eingesetzt werden sollten, wurde eine Polymerase mit „proof reading“ Aktivität gewählt.

Die Reaktionsbedingungen für verschiedene PCRs wurden entsprechend der Herstellervorgaben für die verwendete Polymerase, den eingesetzten Primern und der zu amplifizierenden DNA-Matrize (Template) angepasst. Die Primer wurden in der Regel in einer Konzentration von 1-2 pmol/µl eingesetzt. Die Templatekonzentration lag für chromosomale DNA in der Größenordnung von 10 ng pro 100 µl Reaktionsvolumen, konnte aber stark variieren. Die passende Hybridisierungstemperatur wurde nach der folgenden Formel berechnet: $T_m = 69,3 + 0,4 (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650 / \text{Länge des Oligos}$. Sie wurde 1 - 2°C unterhalb des angegebenen Schmelzpunktes des weniger affinen Primers gewählt. Für die Länge der Polymerisationsphase wurde eine Minute pro 1 kb des angestrebten Produktes angesetzt. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden auf Eis die folgenden Komponenten zusammengefügt:

PCR-Ansatz:

10 x Taq-Polymerase-Puffer	5 µl
50 mM MgCl ₂	0,5 µl
20 mM dNTP-Mix	1 µl
Primer 1 (10 µM)	0,5 µl
Primer 2 (10 µM)	0,5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
100 ng/µl Template-DNA	1 µl
H ₂ O _{dest.}	ad 50 µl

Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung:	2 min	95°C	} 30 Zyklen
Denaturierung:	45 s	95°C	
Primer-Annealing:	1 min	45-60°C	
Primer-Elongation:	1 min	72°C	
Elongation:	3 min	72°C	

Die Stringenz der PCR konnte durch Erhöhung der Annealing-Temperatur bzw. Verkürzung der Annealing-Zeit erhöht werden. Zur Überprüfung wurden 10 µl des Ansatzes wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Bei Bedarf wurden die PCR-Produkte mit dem „PCR-Purification-Kit“ (Qiagen) oder mit dem „GeneClean-Kit“ (Q-BIO gene) gereinigt und zur Klonierung oder als Sonde eingesetzt.

3.1.8.2. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR, semiquantitativ)

Um die Transkriptmengen einzelner Gene in der Bakterienzelle beurteilen zu können, wurde u. a. die reverse Transkriptase-PCR eingesetzt. Diese Methode unterteilt sich in zwei Reaktionen, die reverse Transkription von RNA in cDNA und die Amplifikation der cDNA mittels einer PCR. Im Gegensatz zu quantitativen Varianten wie der kompetitiven RT-PCR, ermöglicht die semiquantitative Methode die Ermittlung von Veränderungen der Transkriptmenge eines spezifischen Gens im Vergleich zu einer Kontrolle. Die cDNA-Synthese wurde mit einem Hexamer-Primer-Mix durchgeführt, die nachfolgende PCR mit Gen-spezifischen Primern. Für jede RNA-Präparation verbunden mit einer DNaseI-Behandlung (3.1.5) wurde zusätzlich eine cDNA-Negativkontrolle ohne Enzym durchgeführt, um in der nachfolgenden PCR mögliche DNA-Kontaminationen zu detektieren.

cDNA-Synthese:

Random Primer (100 ng/µl, Invitrogen)	3 µl
Gesamt-RNA	2 µg
H ₂ O _{dest.}	ad 11 µl

10 min, 65°C (Denaturieren)

10 min, RT (Primer Anlagerung)

5 x RT-Puffer (Invitrogen)	4 µl
0,1 M DTT (Invitrogen)	2 µl
dNTP-Mix (10mM)	1 µl
RNaseOut (Invitrogen)	1 µl
SuperScript III (200 U, Invitrogen)	1 µl
2 h, 50°C (reverse Transkription)	
15 min, 70°C (Inaktivierung)	
H ₂ O _{dest.}	ad 50 µl

Von der cDNA wurden jeweils 2,5 µl in einer 25 µl Standard-PCR eingesetzt, wobei die Anzahl der Zyklen in Abhängigkeit von der Transkript-Abundanz empirisch bestimmt wurde.

3.1.9. Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte entweder am LiCor-Sequenzierer (MWG) oder am ABI-Sequenzierer (Perkin Elmer) und beruht auf der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierungsreaktionen wurden gemäß den Angaben der Hersteller durchgeführt.

3.1.10. Klonierung

3.1.10.1. Restriktion von DNA

Je nach Verwendungszweck wurde eine bestimmte Menge gereinigter DNA mit den gewünschten Restriktionsenzymen und dem vom jeweiligen Hersteller vorgesehenen Puffer bei der vorgegebenen Temperatur inkubiert. Die Menge an Enzymlösung, die dem Ansatz zugegeben wurde, sollte 10 % [v/v] der Ansatzgröße nicht überschreiten, da sonst die Sequenzspezifität der Restriktionsendonuklease stark herabgesetzt werden konnte (sog. Sternaktivität). Bei Mehrfachspaltungen mit Enzymen verschiedener Hersteller wurde der ‚One-Phor-All-Buffer Plus‘ (Amersham Pharmacia) als Reaktionspuffer verwendet.

3.1.10.2. Dephosphorylierung von Plasmiden

Wenn ein Vektor für eine Klonierung mit nur einer Restriktionsendonuklease geschnitten wurde, folgte ein Dephosphorylierungsschritt zur Vermeidung der Selbstligation der freien Enden. Zu einem 20 µl Restriktionsansatz wurden 1 µl (1 U/µl) Alkalische Phosphatase (AP) (Roche) und 2 µl 10 x AP-Puffer gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem „PCR-Purification-Kit“ (Qiagen) aufgereinigt.

3.1.10.3. Ligation von Restriktionsfragmenten

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden Vektor- und Insert-DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen behandelt, aufgereinigt und nach einer Konzentrationsbestimmung in einem molaren Verhältnis von ca. 1 : 3 für die Ligation eingesetzt. Der Ansatz (10 µl Endvolumen) wurde mit 1 µl T4-DNA-Ligase (New England Biolabs), 1 µl 10 x Ligationspuffer und mit H₂O_{dest.} aufgefüllt und bei 4°C ÜN inkubiert. Der Ligationsansatz wurde danach in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert oder bei -20°C gelagert.

3.1.10.4. Ligation von PCR-Produkten mit dem pGEM-T Vektor-System

Das pGEM-T Vektor-System (Promega) ist ein effizientes System für die Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor mit hoher Kopienzahl. Eine Religation des bereits linearisierten Vektors wird durch 3'-Thymidin-Überhänge verhindert, die außerdem eine einfache Ligation der PCR-Produkte mit 5'-Adenin-überhängenden Enden ermöglicht. Ein Standardansatz für die Ligation eines PCR-Produktes in den Vektor setzte sich folgendermaßen zusammen:

2 x T4 DNA Ligationspuffer	5 µl
pGEM-T Easy Vektor (50 ng)	1 µl
PCR-Produkt	1-3 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
H ₂ O _{dest.}	ad 10 µl

Der Ansatz wurde gemischt und bei 4°C ÜN oder 1 h bei RT inkubiert. Anschließend konnte der Ligationsansatz entweder für die Transformation kompetenter *E. coli* eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

3.1.11. Transformation von DNA

3.1.11.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (CaCl₂-Methode)

50 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 - 0,7 bei 37°C geschüttelt und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Bakterien 5 min bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 25 ml eiskalter, steriler CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert und wiederum abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 1 h auf Eis gestellt. Danach wurden 520 µl Glycerin (87 % [v/v]) zugegeben und in Aliquots von 150 µl bei -80°C gelagert.

3.1.11.2. Herstellung elektrokompetenter *S. aureus*-Zellen

Eine 100 ml LB-Hauptkultur wurde mit 1 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde daraufhin geteilt und zweimal 50 ml Suspension wurden 5 min bei 6000 rpm und RT abzentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien zweimal mit einem Volumen sterilem H₂O_{dest.} gewaschen. Nach Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, RT) erfolgten zwei weitere Waschschrte mit 1/5 und mit 1/10 Vol. 10 %-iger, steriler Glycerinlösung. Nach dem Resuspendieren der Bakterien in 1/10 Vol. 10 %-iger Glycerinlösung wurden die Zellen 15 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Pellets vereinigt und in 1 ml 10 %-igem Glycerin resuspendiert. Aliquots zu 70 µl

wurden bei -80°C gelagert. Die Endkonzentration an Bakterien sollte zwischen $1 - 3 \times 10^{10}$ Zellen/ml liegen.

3.1.11.3. Transformation von *E. coli* mit der CaCl_2 -Methode

Zu $150 \mu\text{l}$ angetauten kompetenten *E. coli*-Zellen wurden $1-2 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA bzw. $10 \mu\text{l}$ Ligationsansatz (vgl. 3.1.10.3) gegeben. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis gestellt und danach für 2 min bei 42°C inkubiert (Hitzeschock). Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gestellt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und für die phänotypische Expression der transformierten Resistenzgene, 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden $100 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsantibiotika ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.1.11.4. Elektroporation von *S. aureus*

Ein Aliquot ($70 \mu\text{l}$) elektrokompetenter *S. aureus*-Zellen wurde bei RT aufgetaut. Eine geeignete Menge Plasmid-DNA ($1 \mu\text{g}$) wurde hinzupipettiert und gemischt. Der Ansatz wurde $10-30 \text{ min}$ bei RT inkubiert. Anschließend wurden $60 \mu\text{l}$ in eine Elektroporationsküvette mit 1 mm Spalt überführt. Die Elektroporation erfolgte dann bei $1,8 - 2 \text{ kV}$, 100Ω , $25 \mu\text{F}$. Eine optimale Zeitkonstante sollte zwischen $2 - 2,5 \text{ ms}$ betragen. Danach wurden sofort $390 \mu\text{l}$ LB-Medium zu den Bakterien gegeben und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden $1 - 2 \text{ h}$ bei 37°C geschüttelt und anschließend auf antibiotikahaltigen Selektions-LB-Agarplatten ausplattiert.

3.1.11.5. Phagentransduktion

Die Transduktion von genetischem Material mit Hilfe von Phagen stellt eine effiziente Methode dar, Plasmide und Mutationen von einem *S. aureus*-Stamm in einen anderen Stamm zu transformieren. Der entsprechende Donor-Stamm wurde in einer 20 ml ÜN-Kultur unter dem entsprechendem Selektionsdruck und Temperatur angezogen. Zu der Kultur wurden am nächsten Morgen $100 \mu\text{l}$ einer sterilen 1 M CaCl_2 -Lösung gegeben (Endkonzentration von 5 mM CaCl_2). Eine Verdünnungsreihe des Phagenlysats von 10^{-1} - 10^{-4} in Phagenpuffer wurde vorbereitet. $0,3 \text{ ml}$ der ÜN-Kultur wird in Kulturröhrchen zusammen mit $0,1 \text{ ml}$ der verschiedenen Verdünnungen des Lysats pipettiert. Der Ansatz wurde für $0,5 - 1,5 \text{ h}$ bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit ca. 4 ml zuvor aufgekochten und auf $50-55^{\circ}\text{C}$ abgekühlten Softy-Agar (5 mM CaCl_2) gemischt und auf eine LB-Platte gegossen. Als Kontrolle wurden Bakterien ohne Phagenlysats gleichermaßen behandelt. Die Platten wurden

über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag ließ sich die Lyse der Bakterien anhand von Plaques und im besten Fall durch vollständige Transparenz des Softy-Agars im Vergleich zur Kontrolle beurteilen. Der Softy-Agar wurde in ein 15 ml-Greiner-Röhrchen überführt und mit 2 ml Phagenpuffer mittels Vortexen gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt (6000 rpm, 10 min, RT) wurde der Überstand abgenommen und zur Entfernung der Bakterien steril filtriert (0,2 µm). Das so gewonnene Phagenlysate war bei 4°C für Jahre haltbar.

Bei der eigentlichen Transduktion wiederholten sich die oben beschriebenen Schritte. Der Rezipientenstamm wurde ÜN bei 37°C inkubiert und am nächsten Morgen CaCl₂-Lösung hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 5 mM zu erreichen. 0,1 ml der verschiedenen Verdünnungsstufen des Phagenlysats wurden mit 0,3 ml der ÜN-Kultur gemischt und 0,5 -1,5 h bei RT inkubiert. Dabei sollte wieder ein Kontrollansatz (Bakterien ohne Phagenlysate) mitgeführt werden. Handelte es sich bei Donor und Rezipient nicht um isogene Stämme, war ein Hitzeschock (2 min, 52°C) vor der Zugabe des Phagenlysats wichtig, um das Restriktionssystem zu inaktivieren. Der Ansatz wurde ebenfalls mit Softy-Agar gemischt und auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotika gegossen. In diesem Fall sollte der Softy-Agar Na₃-Citrat enthalten (Endkonzentration 20 mM), um Ca²⁺-Ionen zu chelatieren und eine erneute Adsorption der freien Phagen an die Bakterien zu verhindern. Die Platten wurden bei 30°C 1-4 Tage inkubiert.

3.1.12. Standard-Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle können ihrem Molekulargewicht entsprechend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden (Sambrook et al., 1989). Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 0,8 - 1,5 % [w/v] Agarose mit 1 x TAE-Puffer versetzt und durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 54°C wurde die Lösung in einen horizontalen Gel-Schlitten gegossen. Zur Ausbildung von Geltaschen wurde zuvor ein Kamm in den Schlitten platziert. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm wieder entfernt, der Schlitten in eine Gel-Kammer gegeben und mit 1 x TAE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 10 x DNA-Probenpuffer versetzt. Ein DNA-Längenstandard wurde aufgetragen und die Elektrophorese bei 80 - 120 Volt gestartet. Nach 1 bis 1,5 h wurden die Agarosegele in einem 1 %-igem Ethidiumbromid-Bad für ca. 20 min inkubiert. Die durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid gefärbten Nukleinsäuren konnten anschließend durch Fluoreszenzanregung mit UV-Licht der

Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden. Für die Isolierung linearisierter DNA-Fragmente und PCR-Produkte für Klonierungsarbeiten wurden die betreffenden Banden unter UV-Licht (70 %) mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und gemäß der Herstelleranleitung mit dem „GeneClean-Kit“ (Q-BIO gene) oder dem „PCR-Purification-Kit“ (Qiagen) (3.1.6) aufgereinigt.

1 x TAE-Puffer:

Tris-Acetat 40 mM
EDTA, pH 8,0 1 mM

10 x DNA-Probenpuffer:

Bromphenolblau 0,4 % [w/v]
EDTA, pH 8,0 0,5 M
SDS 0,1 % [w/v]
Glycerol 67,75 % [v/v]

3.1.13. Southern Blot-Analyse

10 µg chromosomale DNA wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und in einem 0,8 %-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und zusammen mit einem angelegten fluoreszierenden Lineal fotografiert. Das Gel wurde danach 10 min in eine Depurinierungslösung (0,25 N HCl) gelegt und vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde das Gel für 20 min in der Denaturierungslösung (1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH) und zuletzt für 20-30 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 und 1,5 M NaCl) geschwenkt. Zum Blotten wurde eine Nylonmembran zugeschnitten, die 2 bis 4 mm größer als das Gel war. Die Membran wurde kurz in 10 x SSC geschwenkt. Währenddessen wird die poröse Trägerplatte der Blotkammer mit H₂O_{dest.} befeuchtet und mit der glatten Seite nach oben in die Kammer gelegt. Danach wurden die Membran, die Maske und zuletzt das Gel auf die Trägerplatte gelegt. Der Rahmen wurde geschlossen und für ca. 60 min ein Vakuum angelegt (50 mbar). Das Gel wurde während dieser Zeit mehrmals mit 20 x SSC (600 ml 5 M NaCl; 200 ml 1,5 M Na-Citrat, pH 7,0; 200 ml H₂O_{dest.}) überschichtet. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in 2 x SSC geschwenkt und auf Whatman-Papier getrocknet. Die DNA wurde anschließend im UV-Cross-Linker (Stratagen) kovalent an die Membran gebunden.

3.1.13.1. Markierung der Sonde, Hybridisierung und Entwicklung des Blots

Die DNA-Sonden-Markierung und die anschließende Hybridisierung wurden unter Verwendung des ECL-Kits (Amersham) durchgeführt. Bei dieser Methode bilden positiv geladene Komplexe des Enzyms Meerrettich-Peroxidase (Labelling-Reagenz) mit der negativ geladenen DNA elektrostatische Bindungen aus. Durch die Zugabe von Glutaraldehyd werden diese schwachen Bindungen in kovalente Enzym-DNA-

Bindungen umgewandelt. Nach der Hybridisierungsreaktion werden die Detektionslösungen auf die Nylonmembran gegeben. Detektionslösung I enthält Wasserstoffperoxid, dessen Reduktion durch die Peroxidase mit einer Lichtreaktion gekoppelt ist, bei der durch Oxidation von Luminol (Detektionslösung II) Blaulicht freigesetzt wird.

Die Nylonmembran wurde in einem Hybridisierungsröhrchen mit auf 42°C angewärmten Hybridisierungsmix bedeckt und bei 42°C im Hybridisierungsofen für eine Stunde vorhybridisiert. Für die Sondenherstellung wurden ca. 300 ng DNA in 10 µl H₂O_{dest.} eingesetzt. Die Probe wurde 5 min bei 95°C denaturiert und sofort für 5 min auf Eis gestellt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (20 s, 14000 rpm) wurden jeweils 10 µl Labelling-Reagenz und Glutaraldehyd zugegeben und durch Vortexen gemischt. Danach wurde der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend zum Hybridisierungsmix pipettiert. Nach einer Inkubation ÜN wurde der Blot für 10 min mit 0,5 x SSC und anschließend zweimal mit vorgewärmter Waschlösung (0,5 x SSC und 0,4 % SDS) bei 50-55°C gewaschen. Danach wurde die Membran 10 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Daraufhin wurde die Membran mit einem 1:1 Gemisch der beiden Detektionslösungen bedeckt, für 1 min geschwenkt, vorsichtig zur Entfernung überschüssiger Detektionslösung auf Whatman-Papier gelegt und dann in Folie eingeschlagen. Der Blot wurde in eine Exponierkassette gelegt und ein Autoradiografiefilm in der Dunkelkammer aufgelegt. Nach geeigneter Exponierzeit wurde der Film entwickelt.

3.1.14. Denaturierende Agarosegelelektrophorese

RNA-Proben, mit denen eine Hybridisierung in Form eines Northern Blots (3.1.15) durchgeführt werden sollte, wurden unter denaturierenden Bedingungen in Agarosegelen aufgetrennt. Hierbei sollte die Anwesenheit von Formaldehyd in den Proben, dem Agarosegel und in dem Laufpuffer das Auftreten von Sekundärstrukturen verhindern und so einen denaturierten Zustand der RNA während der Elektrophorese aufrechterhalten.

Für ein 1,2 %-iges Gel wurden 4,2 g Agarose in 304,5 ml DEPC-H₂O_{dest.} in der Mikrowelle aufgekocht und in einem Wasserbad auf 60°C abgekühlt. Nun wurden 16,2 ml Formaldehyd (37 %, [v/v]) und 35 ml 10 x MOPS dazugegeben und das Gel in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Die RNA-Proben (5-20 µg, in Abhängigkeit der zu erwartenden Signalstärke) und der RNA-Längenstandard wurden mit 1/5 Vol. 5 x Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 65°C denaturiert, auf Eis gestellt und

anschließend aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x MOPS bei 120 mV, bis zum Erreichen des unteren Drittels des Gels durch die Lauffront. Nach Abbruch der Elektrophorese wurde das Gel nach Inkubation im Ethidiumbromidbad (1 % Ethidiumbromid in DEPC-H₂O) mit einem fluoreszierenden Lineal dokumentiert. Das Gel wurde anschließend zur partiellen Hydrolyse der RNA für 5 min in NaOH-Lösung (50 mM) inkubiert und zur Neutralisation 5 min in Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) gegeben. Nun konnte das Gel einem Vakuumblot (vgl. 3.1.15) unterzogen werden.

10 x MOPS:	MOPS	41,8 g
	Na-Acetat	4,1 g
	Na ₂ EDTA	3,7 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Anschließend wurde die Lösung auf pH 7 mit NaOH eingestellt, autoklaviert und lichtgeschützt gelagert.

5 x RNA-Auftragspuffer:	gesättigte Bromphenolblau-Lösung	16 µl
	0,5 M EDTA	80 µl
	Formaldehyd (37 %, [v/v])	720 µl
	Glycerin (86 %, [v/v])	2,3 ml
	Formamid (deionisiert)	3,1 ml
	10 x MOPS	4 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 10 ml

3.1.15. Northern Blot-Hybridisierung

Gesamt-RNA-Präparationen wurden zunächst einer denaturierenden Agarosegelelektrophorese und partieller Hydrolyse unterzogen (vgl. 3.1.14). Der Nukleinsäuretransfer von dem Agarosegel auf die positiv geladene Nylonmembran wurde mit einer Vakuumblot-Apparatur wie unter 3.1.13 beschrieben durchgeführt. Die Hybridisierungs-, Wasch- und Detektionsschritte wurden unter stringenten Bedingungen nach Herstellerangaben des ECL-Kits unter Verwendung von Peroxidase-gekoppelten DNA-Sonden hergestellt (vgl. 3.1.13.1).

3.2. Herstellung von Deletionsmutanten

3.2.1. Konstruktion von Vektoren für die Herstellung von Deletionsmutanten

Zunächst wurden die Sequenzen der Targetgene und ihrer Umgebung aus dem Genom von *S. aureus* 8325 (www.tigr.org) ausgewählt und flankierende Up- und Downstreamfragmente von ca: 1000 Bp Länge mittels PCR amplifiziert. Während der PCR wurden mit Hilfe modifizierter Primer die für die folgenden Klonierungsschritte nötigen Restriktionsstellen angehängt (Abb. 5). Die so generierten PCR-Produkte wurden in einer anschließenden Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel

eluiert, in den Vektor pGEM-T (Promega) ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Klone wurden auf X-Gal/IPTG/Amp-Platten mit Hilfe der Blau/Weiß-Selektion ausgewählt. Da der pGEM-T Vektor über keine der eingesetzten Schnittstellen in der „Multi Cloning Site“ (MCS) verfügt, konnten die mittels PCR angefügten Schnittstellen in einem Restriktionsansatz und anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft werden. Die Sequenz der klonierten PCR-Produkte wurde mittels Sequenzierung unter Verwendung der Primer „M13-universal“ und „M13-reverse“ kontrolliert. Für die Konstruktion des für die homologe Rekombination in *S. aureus* benötigten Vektors, wurde der Shuttle-Vektor pBT2 verwendet (Brückner, 1997b), der sich durch Anwesenheit von zwei Replikationsstartpunkten auszeichnet, die eine temperaturabhängige Replikation in *E. coli* und in *S. aureus* ermöglicht. Diese Eigenschaft führt zu einem Replikationsstopp in *S. aureus* bei Temperaturen, die mehr als 37°C betragen und stellt eine wichtige Voraussetzung für die Selektion rekombinanter Klone dar. Als Selektionsmarker wurde eine Erythromycin-Resistenzkassette (*ermB*) eingesetzt, die bereits in dem Vektor pEC1 kloniert vorlag. Der Vektor pBT2 wurde mit den Enzymen *Hind*III und *Eco*RI linearisiert. Die *ermB*-Kassette wurde mit *Bam*HI und *Pst*I aus dem Vektor pEC1 gespalten und die jeweiligen Up- und Downstreamfragmente mit den entsprechenden Enzymkombinationen geschnitten. Nach anschließender Agarosegelelektrophorese, Elution und Aufreinigung, wurden die drei Fragmente und der linearisierte Vektor in einem Ligationsansatz inkubiert und in *E. coli* transformiert. Klone wurden auf LB-Platten mit 100 μ g/ml Erythromycin (Em) und 100 μ g/ml Ampicillin (Amp) selektioniert. Durch Restriktionsspaltung wurden die isolierten Plasmide auf die erfolgreiche Ligation der drei Fragmente kontrolliert.

3.2.2. Integration in das Genom

Die erfolgreich in *E. coli* klonierten „Shuttle-Vektoren“ wurden in einem Zwischenschritt in den restriktionsnegativen *S. aureus*-Stamm RN4220 mittels Elektroporation transformiert. Um die Replikation des Vektors in *S. aureus* zu gewährleisten, wurden Klone bei 30°C auf LB-Platten mit 10 μ g/ml Em und 10 μ g/ml Cm selektioniert. Danach wurden überprüfte Klone für die Transduktion der Plasmide in den Stamm 8325 mit Hilfe des Phagen Φ 85 eingesetzt (3.1.11.5). Nach erfolgreicher Transformation des Integrationskonstruktes wurden Klone über mehrere Tage in Flüssigkultur in LB-Medium mit 2,5 - 5 μ g/ml Em bei 42°C passagiert. Die Inkubation bei 42°C sollte zu einem Replikationsstopp des Vektors führen und die

Zugabe von Erythromycin das Wachstum rekombinanter Klone begünstigen, in denen durch homologe Rekombination der Up- und Downstreamfragmente eine Integration der *ermB*-Kassette in das Genom stattgefunden hat. Nach 1-3 Tagen wurden jeweils Aliquots der Kultur auf Em-haltigen LB-Platten ausplattiert. Anschließend wurden Em-resistente Klone als ein Zeichen für den Verlust des Plasmids auf ihre Cm-Sensitivität überprüft.

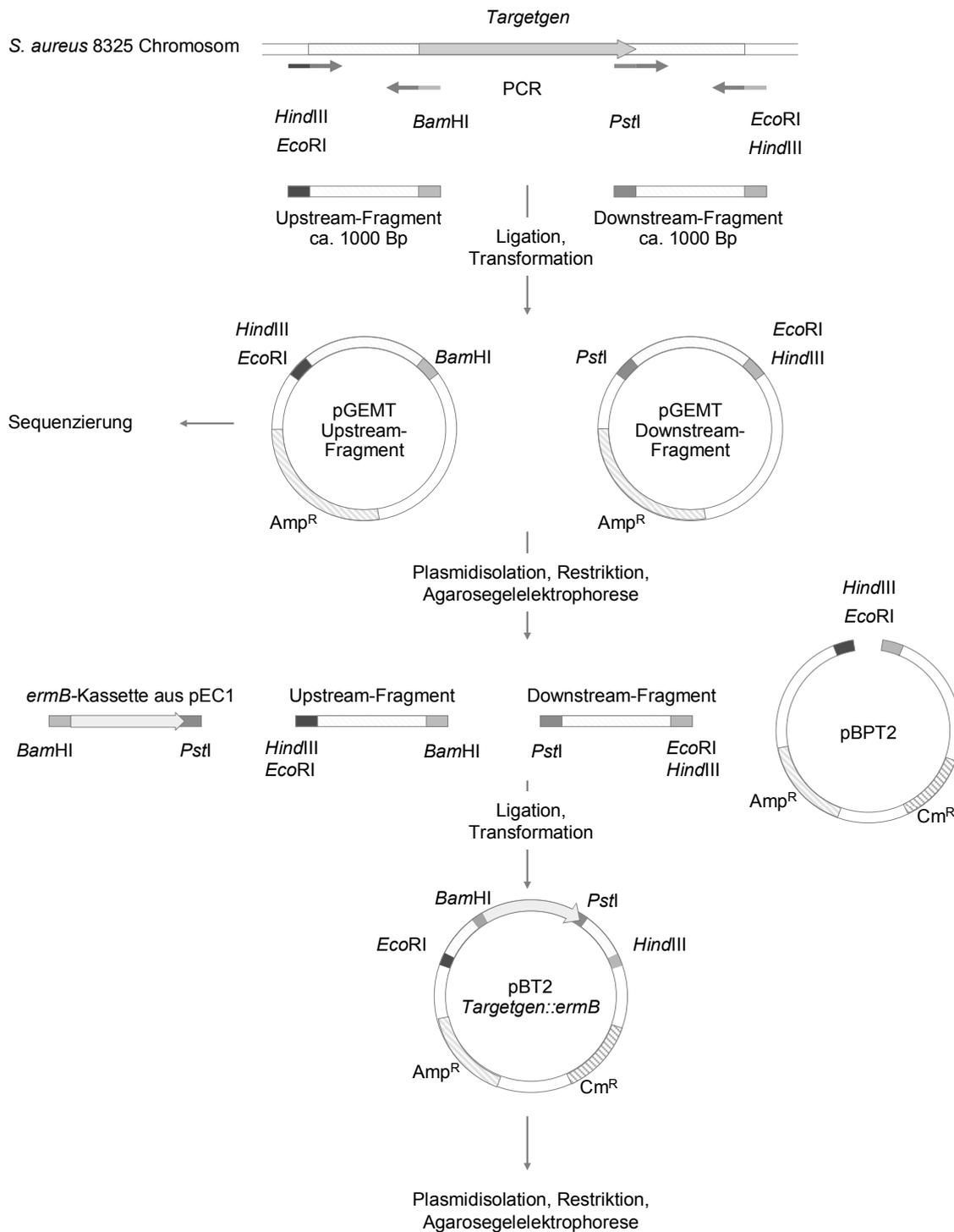


Abb. 5 Schematischer Überblick der Klonierungsstrategie der Vektoren, die für die Herstellung von Deletionsmutanten eingesetzt wurden.

3.3.Arbeiten mit DNA-Microarrays

Alle Arbeiten mit DNA-Microarrays wurden nach Möglichkeit staubfrei und mit Einweghandschuhen durchgeführt. Alle Puffer und Lösungen wurden mit Lichrosolv-H₂O (Merck) hergestellt. Nach Applikation der Fluoreszenzproben wurden die Inkubationsgefäße nach Möglichkeit mit Aluminiumfolie vor Lichteinstrahlung geschützt.

3.3.1. Markierung von cDNA mit Fluoreszenzfarbstoffen

Um eine kompetitive Microarray-Hybridisierung zum Vergleich von zwei Gesamt-RNA-Präparationen aus Wildtyp und isogener Mutante durchzuführen, wurde die RNA in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Dabei erfolgte für jede Probe der direkte Einbau eines an dCTP gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes (Cy5-dCTP oder Cy3-dCTP, Amersham Pharmacia). Als Ausgangsmaterial diente 10-20 µg Gesamt-RNA (3.1.5). Die Markierung erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

cDNA-Synthese und Fluoreszenzmarkierung:

RNA (10-20 µg)	17,5 µl
Random Primer Mix (3 µg/µl, Invitrogen)	2,5 µl
10 min, 65°C (Denaturieren)	
10 min, RT (Primer-Anlagerung)	
5 x SuperScript buffer (Invitrogen)	8 µl
0,1 M DTT	4 µl
dNTPs (8 mM dATP, dTTP, dGTP; 2 mM dCTP)	4 µl
Cy5- or Cy3-dCTP (0.5 mM, Amersham Pharmacia)	2 µl
RNaseOut (RNase Inhibitor, Invitrogen)	1 µl
Superscript III (200 U, Invitrogen)	1 µl
2 h, 50°C (cDNA Synthese)	

alkalische Lyse:

1 M NaOH	10 µl	10 min, 65°C
1 N HCl (Neutralisation)	10 µl	

Danach folgte die Aufreinigung der Ansätze mit dem „PCR-Purification-Kit“ und der zweifachen Elution der Sonde mit je 35 µl H₂O_{dest.}. Die erfolgreiche Markierung der cDNA wurde anhand einer intensiven Färbung der Proben nach der Aufreinigung beurteilt. Die Färbung beruht auf den inkorporierten Cy3- (rote Färbung) oder Cy5-dCTPs (blaue Färbung). Zur genaueren Beurteilung der Qualität und Quantität der Sonden wurde jeweils ein 1 µl Aliquot in einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt.

Dabei wurde 1 µl Glycerin als Beschwerelösung eingesetzt, da Bromphenolblauhaltiger Beschwerelösung die spätere Detektion stören würde. Die Elektrophoresekammer wurde mit Alufolie abgedeckt und eine Spannung von 80 mV angelegt. Nach 1,5-2 h wurde das Gel mit dem Phosphorimager Typhoon 4600 (Amersham Bioscience) eingescannt. Das Bandenmuster der cDNA sollte mehrere klare Banden unterschiedlicher Größen aufweisen. Außerdem sollten die Stärke der Fluoreszenz der Cy3- und der Cy5-markierten cDNA vergleichbar sein. Bei einer zu hohen Konzentration an freien Nukleotiden („Wolke“ am unteren Rand des Agarosegels) wurde die Aufreinigung mit dem „PCR-Purification-Kit“ wiederholt. Anschließend wurden die Proben in der SpeedVac eingeeengt und bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

3.3.2. Hybridisierung von DNA-Microarrays

Vor der Hybridisierung wurden die fluoreszenzmarkierten Proben (vgl. 3.3.1) in 45 µl Hybridisierungspuffer (Scienion) resuspendiert und vereinigt, für 3 min bei 94°C denaturiert und kurz auf Eis gestellt. Die Applikation auf den Microarray sollte luftblasenfrei erfolgen. Der Bereich wurde mit einem staubfreien Objektträger abgedeckt und der Microarray in einer Hybridisierungskammer (Scienion) über 2 Nächte bei 48°C einer feuchten Hybridisierung im Wasserbad unterzogen. Die abschließenden Waschschriffe wurden nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Waschpuffer wurden jeweils in einem Volumen von 250 ml mit Lichrosolv-H₂O (Merck) angesetzt und zur Entfernung von Partikeln steril filtriert. Die Microarrays wurden jeweils 10 min in den Waschpuffern (I bis IV) mit abnehmender Salzkonzentration in einem lichtgeschützten Container (Scienion) gewaschen. Anschließend wurden die Arrays zur Entfernung von überschüssigem Puffer 5 min bei 1600 rpm zentrifugiert.

Waschpuffer I

2 x SSC

0,2 % SDS

Waschpuffer II

0,1 x SSC

Waschpuffer III

0,2 x SSC

Waschpuffer IV

0,05 x SSC

3.3.3. Einscannen und bioinformatische Analyse der Microarray-Daten

Die hybridisierten und gewaschenen Microarrays wurden mit einem GenePix 4000b Microarray-Scanner (Molecular Dynamics) und der dazugehörigen GenePix Pro 4.0 Software eingelesen. Der Scanner hat eine Auflösung von 10 µm und verfügt über einen 532 nm (Cy3) und einen 635 nm (Cy5) Laser. Um sowohl schwache als auch starke Hybridisierungssignale zu detektieren, wurden beide Kanäle in drei unterschiedlichen Laserintensitäten eingescannt.

Die Analyse der Bilder und die Normalisierung der Intensitäten der beiden Kanäle zueinander erfolgten mit dem Programm GenePix Pro 4.0 (Molecular Dynamics). Die somit bestimmten Signalintensitäten wurden in Microsoft Excel XP weiter analysiert. Zur Bestimmung des Quotienten (Ratio) der Hybridisierungssignale zwischen den unterschiedlich markierten cDNA-Präparationen aus Wildtyp und Mutante wurden die Mittelwerte der normalisierten Signalintensitäten über den linearen Fluoreszenzbereich zugrunde gelegt. Dabei wurden die Gene von der Auswertung ausgeschlossen, deren Fluoreszenzsignale bei Wildtyp und bei Mutante jeweils unterhalb der doppelten mittleren Hintergrundintensität lagen. Somit ließen sich Gene identifizieren, die einerseits unter den gewählten Bedingungen nicht oder sehr schwach exprimiert wurden. Außerdem wurden Gene ausgeschlossen, die aufgrund von Homologie-Unterschieden zwischen dem zu testenden Stamm 8325 und dem auf dem Microarray eingesetzten Stamm N315 zu nicht reproduzierbaren Signalintensitäten führten.

3.4. Computerunterstützte Suche nach konservierten Operatorsequenzen

In einem computerunterstützten Ansatz wurde in den Genomen von *S. aureus* 8325 und N315 nach konservierten DNA-Sequenzen von regulatorischen Motiven mit Hilfe des Programms Artemis (www.tigr.org) gesucht. Hierdurch sollten mögliche funktionelle Zusammenhänge von Gengruppen mit ähnlichem Regulationsmuster in der *clpP*-Mutante untersucht werden. Für die Suche nach konservierten DNA-Sequenzen wurde auf bereits verfügbare Daten von *S. aureus* sowie weiterer grampositiver Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt zurückgegriffen. In Abhängigkeit vom Konservierungsgrad eines regulatorischen Motivs wurden Variationen der Basen zugelassen, die sich jedoch nicht in den hochkonservierten Bereichen befinden und eine bestimmte Anzahl der variablen Basen nicht überschreiten sollten. Außerdem

wurde berücksichtigt, dass sich die regulatorischen DNA-Elemente im Upstreambereich eines ORFs befinden sollten und soweit der Transkriptionsstartpunkt nicht bekannt ist, eine bestimmte Entfernung zum Translationsstartpunkt nicht überschritten wird.

3.5.Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C in TSB-Medium auf PE-Deckgläßchen in einer „24-well“-Gewebekulturplatte kultiviert. Zur Vorbereitung der Proben wurde das Medium vorsichtig dekantiert und die Deckgläßchen dreimal mit 1 x PBS (siehe 3.6) gewaschen. und anschließend in einer wässrigen Lösung aus 6.25 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS für 1 h fixiert. Die Dehydrierung der Proben erfolgte durch die Inkubation in Ethanol mit zunehmender Konzentration (50-80-100-100 %). Die Proben wurden mit Hexamethyldisilazan (Sigma-Aldrich) getrocknet, auf Aluminium-Sockel montiert und nach der kritischen Punkt-Trocknung mit Gold bemantelt. Die elektronenmikroskopische-Untersuchung erfolgte in der Abteilung für Elektronenmikroskopie von Prof. Dr. G. Krohne im Biozentrum, Würzburg.

3.6.Adhärenzassay

Diese Methode diente dazu, die Fähigkeit der Biofilmbildung der verschiedenen *S. aureus*-Mutanten zu beurteilen. Um die Biofilmbildung zu begünstigen, wurden die Bakterien in LB-Medium mit 1 % Glukose oder 1 M NaCl angezogen. Jeweils 100 µl verschiedener Verdünnungsstufen (in LB-Medium) der ÜN-Kulturen wurden in Parallelansätzen in eine „96-well“-Platte (Greiner) pipettiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium dekantiert und die Platte mit 1 x PBS drei- bis viermal vorsichtig gespült. Anschließend wurde die Platte bei 60 - 70°C auf einem Heizblock getrocknet. Die adhärennten Bakterien wurden mit 0,1 % Kristallviolett 10 min gefärbt. Schließlich wurde die überschüssige Färbelösung durch mehrfaches Spülen mit H₂O entfernt. Die Platten wurden getrocknet und durch Fotografieren dokumentiert.

10 x PBS	NaCl	40 g
	2 H ₂ O x Na ₂ HPO ₄	6,25 g
	KCl	1 g
	KH ₂ PO ₄	1 g

3.7. Autolyseassay (Mani, 1993)

Eine 50 ml-Hauptkultur in TSB-Medium mit NaCl (1 M) wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 37°C geschüttelt. Die gesamte Kultur wurde zentrifugiert (5 min, 6000 rpm, 4°C) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Bakterienpellet mit 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Puffers wurden die Bakterien in 1 Vol. 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 mit 0,1 % Triton X-100 aufgenommen. Nach vollständiger Resuspendierung wurde die optische Dichte zum Zeitpunkt 0 bestimmt. Die Proben wurden bei 30°C in einem Schüttler inkubiert. Jede halbe Stunde wurde ein Aliquot zur Messung der OD₆₀₀ genommen. Die relative Zunahme der Lyse der Bakterien wurde nach folgender Formel berechnet: $t = [(OD_0 - OD \text{ zum Zeitpunkt } t) / OD_0] \times 100$

3.8. Infektionsexperimente mit 293T-Epithelzellen

Für die Ermittlung der Invasivität der verschiedenen *S. aureus*-Stämme wurden Infektionsexperimente mit der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T durchgeführt. Dazu wurden verschiedene *S. aureus*-Mutanten und die entsprechenden isogenen Wildtypstämme eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde die nicht-invasive Spezies *S. carnosus* gewählt.

Die Zellkulturarbeiten wurden freundlicherweise von Franziska Agerer (AG Hauck, Zentrum für Infektionsforschung) übernommen. Die 293T wurde in DMEM (Gibco-BRL) mit 10 % Kälberserum bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 – 3 Tage subkultiviert. Einen Tag vor der Infektion wurden 2×10^5 Zellen pro „well“ in DMEM mit 10 % Kälberserum in eine „24-well“-Platte eingesät. Die Zellkulturplatten wurden vorher mit Poly-L-Lysin (20 µg/ml in PBS) ÜN bei 4°C beschichtet.

Am Tag des Experiments wurden die Bakterien in jeweils 20 ml Hauptkulturen (TSB) mit 0,5 – 1 ml der mit dem entsprechendem Selektionsdruck in TSB-Medium angezogenen ÜN-Kulturen angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1 bei 37°C geschüttelt. Für jeden zu testenden Stamm wurden 2 ml abzentrifugiert (5 min, 6000 rpm, 4°C) und einmal mit 1 x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes, wurden die Pellets in 1 ml 1 x PBS aufgenommen und resuspendiert. Zu den bereits in einer „24-well“-Platte vorbereiteten 293T-Zellen (2×10^5 Zellen pro well), wurde ein entsprechendes Volumen der in 1 x PBS verdünnten Bakterien pipettiert, um eine MOI („Multiplicity of Infection“: Bakterien pro

Zelle) von 20 zu erreichen. Jeder Ansatz wurde in drei Parallelen durchgeführt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C, wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium (DMEM mit 10 % Kälberserum) mit 50 µg/ml Gentamicin und 20 µg/ml Lysostaphin ersetzt, um extrazelluläre Bakterien abzutöten. Nach 45 minütiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium vorsichtig abpipettiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe einer Saponin-Lösung (1 % [w/v] in 1 x PBS) und 20-minütiger Inkubation bei 37°C lysiert. Zur Bestimmung der intrazellulären Bakterien wurden entsprechende Verdünnungsreihen der Lysate angefertigt und auf TSB-Agarplatten ausplattiert. Nach der Inkubation der Platten ÜN bei 37°C wurden jeweils die CFU ermittelt und durch Errechnung des Mittelwertes der drei Parallelen die Invasionsraten bestimmt.

3.9. Infektionsversuche in einem Katheter-assoziierten Modell in der Ratte

Die Haltung, Vorbereitung, Operation sowie die Infektion der Ratten wurde freundlicherweise von Dr. Knut Ohlsen und Dr. Christian Hüttlinger durchgeführt. Für die Infektionsversuche wurden männliche "Sprague Dawley"-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 300 - 450 g eingesetzt. Die Operation der Ratten wurde nach dem modifizierten Protokoll von (Rupp *et al.*, 1999) durchgeführt. Dazu wurde ein Polyethylen-Katheter (FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach, Germany) mit einer Länge von 10 cm und einem innerem Durchmesser von 0,5 mm und einem äusserem Durchmesser von 1,0 mm verwendet. Dieser wurde operativ in die Halsvene der Ratte eingesetzt. Um die Immunabwehr der Ratten zu schwächen, wurde vor den Infektionsversuchen Cyclophosphamid in zwei Dosen verabreicht (Cross *et al.*, 2001). Dazu wurden die Tiere 96 und 72 h vor der Operation mit jeweils 150 mg/kg und 50 mg/kg Cyclophosphamid behandelt.

Der *S. aureus*-Stamm 8325 und die isogene $\Delta arlR$ -Mutante wurden in einer ÜN-Kultur in TSB-Medium bei 37°C angezogen. Die ÜN-Kulturen wurden jeweils in PBS gewaschen und anschließend in PBS auf 10^4 CFU/ml verdünnt und zur Überprüfung der CFU auf TSB-Platten ausplattiert. Um den Katheter zu befüllen, wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf 300 µl mit PBS aufgefüllt. Die Infektion wurde 24 h nach der Katheteroperation durchgeführt, indem in den Katheter 200 µl der *S. aureus*-Suspension gefüllt wurde (ca. $10^3 - 10^4$ CFU Wildtyp und Mutante im Verhältnis 1:1).

Die Bakteriensuspension verblieb für 15 min im Katheterlumen. Der Inhalt des Katheters wurde daraufhin mit 0,5 ml 0.9 % Saline gespült. 72 h nach der Infektion wurden die Ratten durch CO₂-Inhalation euthanasiert. Der intravasculäre Bereich des Katheters mit der umgebenden Vene wurde aseptisch entfernt. Herz, Lunge, Leber, Milz und Nieren jeder Ratte wurden entnommen und mit einem Gewebe-Homogenisierer in 3 oder 20 ml (Leber) PBS bearbeitet. Ein Milliliter des peripheralen Blutes wurde ebenfalls für die Quantifizierung der CFU entnommen. Aliquots der Suspensionen wurden auf MKP-Platten ausplattiert und die Anzahl der CFU von Wildtyp und Mutante bestimmt. Die Anzahl der CFU der Mutante wurde auf EM-haltigen Platten bestimmt (10 µg/ml).

3.10. Verwendete Websites und Computerprogramme

Websites:

www.ncbi.nlm.nih.gov

Pubmed

NCBI BLAST (Altschul *et al.*, 1997)

ORF finder

Blast 2 sequences

genomische Sequenz *S. aureus* N315

www.tigr.org

genomische Sequenz *S. aureus* COL

genomische Sequenz *B. subtilis*

www.genome.ou.edu

genomische Sequenz *S. aureus* 8325

www.genome.ad.jp

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

www.bork.embl-heidelberg.de/STRING/

STRING

COG (Cluster of Orthologous Groups)

www.firstmarket.com/cutter/cut2.html

Webcutter 2.0

www.ebi.ac.uk/clustalw/

CLUSTAL W (EMBL)

(Thompson *et al.*, 1994)

www.gene-quantification.de/

relative quantitative RT-PCR

(Pfaffl, 2001)

Programme:

Vector NTI Suite 5.5 (Infor Max)

GenePix Pro 4.0 (Molecular Dynamics)

ARTEMIS Genome-Visualization-Tool (www.sanger.ac.uk)

4. ERGEBNISSE

4.1. Herstellung und Überprüfung einer *clpP*-Deletionsmutante

Für die Herstellung der *clpP*-Deletionsmutante wurde ein Shuttle-Vektor-System konstruiert, mit dem durch homologe Rekombination in Form eines doppelten Crossovers der Austausch des gesamten Gens durch eine *ermB*-Resistenzkassette erzielt werden sollte (vgl. 3.2). Mit den Primerpaaren *clpP1/HindIII*-*clpP2/BamHI* und *clpP3/PstI*-*clpP4/EcoRI* wurden die Up- und Downstreambereiche mit einer jeweiligen Länge von ca. 1 kb mittels PCR amplifiziert und zusammen mit der *ermB*-Kassette in den Vektor pBT2 kloniert. Nach Transformation des fertiggestellten Vektors pMA Δ *clpP* in den *S. aureus*-Stamm RN4220 und anschließender Phagentransduktion in den endgültigen Zielstamm 8325 wurde durch Inkubation bei 42°C die Selektion von Klonen begünstigt, in denen die Integration in das Genom stattgefunden hat. Nach Überprüfung von zahlreichen Klonen auf ihre veränderte Antibiotika-Resistenz, konnten keine Mutanten isoliert werden. Alternativ wurden Klone direkt überprüft, die bei 30°C auf Em-haltigen Platten wuchsen. In diesem Ansatz ließ sich eine Mutante isolieren, die im Southern Blot bestätigt werden konnte. Hierzu wurde die chromosomale DNA *BamHI* geschnitten und mit einer *ermB*- und einer *clpP*-spezifischen Sonde hybridisiert. Abb. 6 A zeigt, dass die wildtypische *clpP*-Bande bei 17,8 kb in der Mutante nicht mehr nachweisen ist. Dagegen konnte nach Hybridisierung mit einer *ermB*-spezifischen Sonde (B) ein Fragment bei 4,4 kb detektiert werden.

Um polare Effekte der *clpP*-Deletion auf die Genexpression auszuschließen, wurde zusätzlich eine mit *clpP* komplementierte Δ *clpP*-Mutante (Δ *clpP*⁺) hergestellt. Dazu wurde mittels einer PCR ein 0,84 kb-Fragment mit den Primern *clpK1/BamHI*-*clpK2/EcoRI* amplifiziert und in den Vektor pHPS9 kloniert. Nach Transformation des fertiggestellten Plasmids pHPS9*clpP*⁺ in die Δ *clpP*-Mutante, wurden Klone mit Em und Cm (jeweils 10µg/ml) selektioniert und mittels Plasmid-Präparation, Restriktionsspaltung und Agarosegelelektrophorese überprüft. Im Northern Blot konnte das *clpP*-Transkript von 0,6 kb im *S. aureus*-Stamm 8325 detektiert werden (Abb. 6 B). Die Expression des Gens findet in der Δ *clpP*-Mutante erwartungsgemäß nicht statt. In der Komplementante fehlt ebenso das wildtypische *clpP*-Transkript, dafür ergibt sich ein um ~ 500 Bp vergrößertes vektorabhängiges Transkript.

Ergebnisse

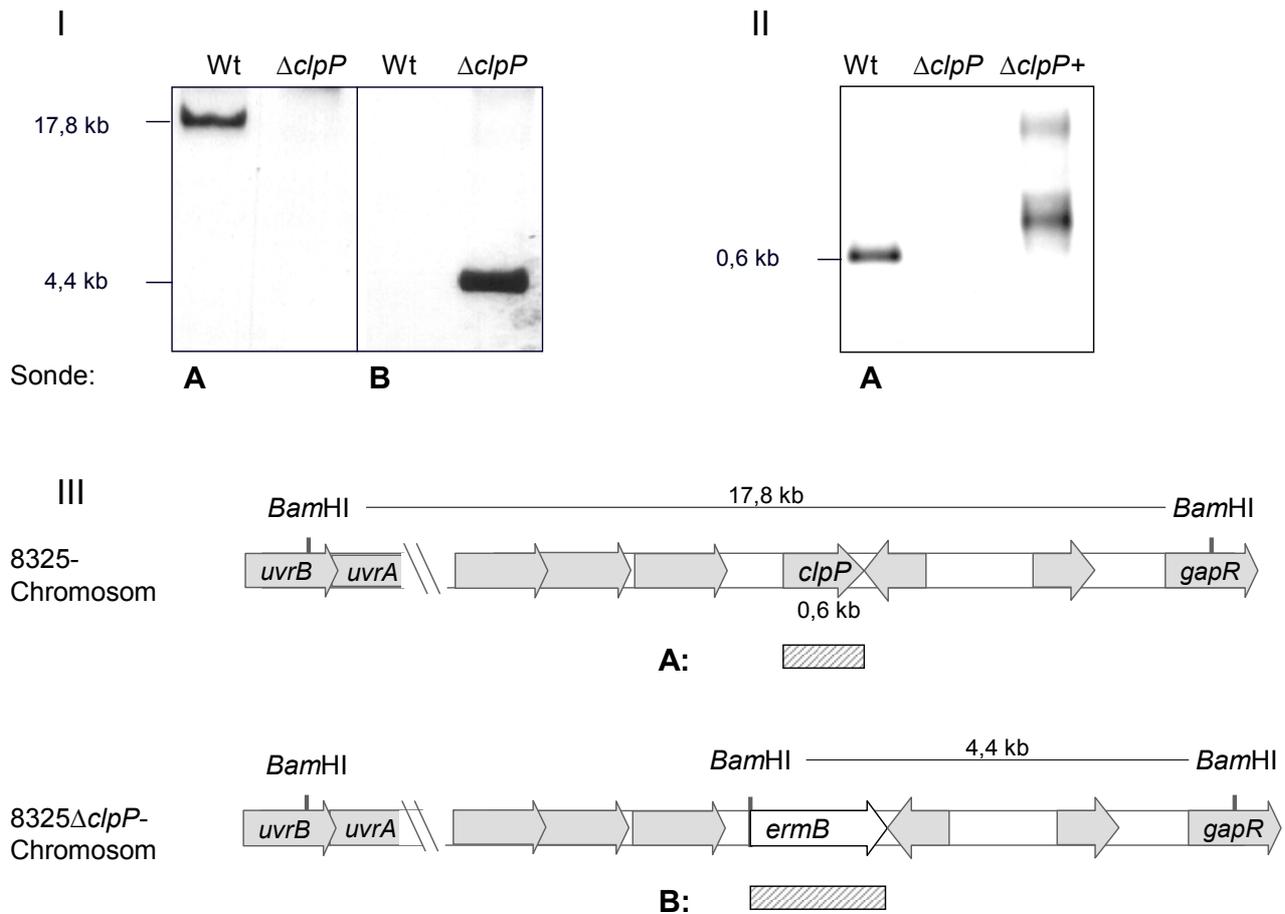


Abb. 6 I: Southern-Blot-Analyse des *S. aureus* 8325-Wildtypstammes und der 8325 $\Delta clpP$ -Mutante. Die chromosomale DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten. A: Hybridisierung mit *clpP*-spezifischer Sonde. B: Hybridisierung mit *ermB*-spezifischer Sonde (Lage der Sonden siehe III). II: Northern Blot Analyse des *clpP*-Transkriptes im Wt-Stamm, $\Delta clpP$ -Mutante und mit pHPS9*clpP+* komplementierter $\Delta clpP$ -Mutante (Sonde A). III: Übersicht der Lage des *clpP*-Gens und Umgebung im Wt und der Integration der *ermB*-Kassette in der $\Delta clpP$ -Mutante. Dargestellt sind die Lage der *Bam*HI-Schnittstellen und die Größe der in der Southern Blot-Analyse erwarteten Fragmente.

4.1.1. Phänotypische Charakterisierung der *clpP*-Deletionsmutante

4.1.1.1. Wachstum des Stamme 8325 $\Delta clpP$ in Flüssigkultur bei verschiedenen Temperaturen

Die Clp-Proteasen sind verantwortlich für die Degradation missgefalteter Proteine unter Stressbedingungen (Gottesman, 1992; Maurizi, 1992; Gottesman, 1996). Bei vielen Grampositiven, wie z.B. *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *S. pneumoniae*, *L. lactis* und *L. monocytogenes*, führt die Inaktivierung von *clpP* zu einem temperatursensitiven Phänotyp (Gerth *et al.*, 1998; Msadek *et al.*, 1998; Frees & Ingmer, 1999; Gaillot *et al.*, 2000; Chastanet *et al.*, 2001; Fedhila *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2002; Frees *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2003). Im *S. aureus*-Stamm 8325-4 führte die *clpP*-Deletion ebenfalls zu einem Wachstumsdefekt, der durch Überprüfung der Wachstumsfähigkeit

bei verschiedenen Temperaturen auf Agar-Platten nachgewiesen wurde (Frees *et al.*, 2003).

Aus diesem Grund sollten Wachstumsexperimente in Flüssigkultur bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt werden. Dazu wurden ÜN-Kulturen der isogenen Stämme 8325 (Wt), 8325 $\Delta clpP$, und der komplementierten $\Delta clpP$ -Mutante ($\Delta clpP+$) in LB-Medium unter Selektionsdruck durch die Zugabe der entsprechenden Antibiotika angezogen und ihre optische Dichte photometrisch bestimmt. Nach Verdünnung der Bakteriensuspension wurden die LB-Hauptkulturen ohne Zugabe von Antibiotika zu Anfang eines Experiments auf die optische Dichte von 0,01 eingestellt. Die drei Stämme wurden bei den entsprechenden Temperaturen in Schüttelinkubatoren kultiviert und ihr Wachstum mittels photometrischer Bestimmung der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Die $\Delta clpP$ -Mutante wies bei allen getesteten Temperaturen (37°, 30°, 20°, 42° und 45°C) einen deutlichen Wachstumsnachteil in Form einer zeitlich verlangsamten Zunahme der optischen Dichte im Vergleich zum Wildtyp und der komplementierten Mutante ($\Delta clpP+$) auf (Abb. 7 A-E). Bei 37°C erreichte die Mutante eine OD₆₀₀ von 1 erst nach 8 Stunden, während der Wt und $\Delta clpP+$ nach 3 - 3,5 Stunden bereits die gleiche optische Dichte aufwiesen. In der exponentiellen Phase betrug die Verdopplungszeit (t_d) der $\Delta clpP$ -Mutante 55 min im Vergleich zu 35 min und 40 min bei Wt und Komplementante. Nach 10 Stunden wurde der Wachstumsnachteil der Mutante kompensiert und alle drei Stämme erreichten eine OD₆₀₀ von 4. Der Wachstumsdefekt der Mutante wurde bei Inkubation der Kulturen bei erhöhten (42° und 45°C) und bei erniedrigten Temperaturen (30° und 20°C) nachgewiesen. Die Mutante erreichte bei 42°C und 45°C die stationäre Phase bereits bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,6, während Wildtyp und Komplementante optische Dichten von 2,5 – 3,3 aufwiesen. Die Verdopplungszeiten während der exponentiellen Phase unterschieden sich wenig und betrugen 55 min für die Mutante im Vergleich zu 52 min und 60 min für Wildtyp und Komplementante. Nach Inkubation über Nacht erreichte die Mutante gleiche Zelldichten wie der Wildtyp und die Komplementante (OD₆₀₀ = 2,5 - 3,3). Bei 45°C wiesen alle Stämme ähnliche Verdopplungszeiten in der exponentiellen Phase wie bei 37°C auf, mit den ermittelten Werten von 36 min, 52 min und 47 min für Wt, Mutante und Komplementante (s.o.). Es wurden jedoch nicht die gleichen Zelldichten erreicht. Die maximalen optischen Dichten von Wildtyp und Komplementante betrugen 2,8 – 3,3, wobei die Mutante bereits nach 4,5 h bei einer

Ergebnisse

OD₆₀₀ von 0,3 in die stationäre Phase eintrat und einen maximalen Wert von 0,8 nach 24 h nicht überschritt.

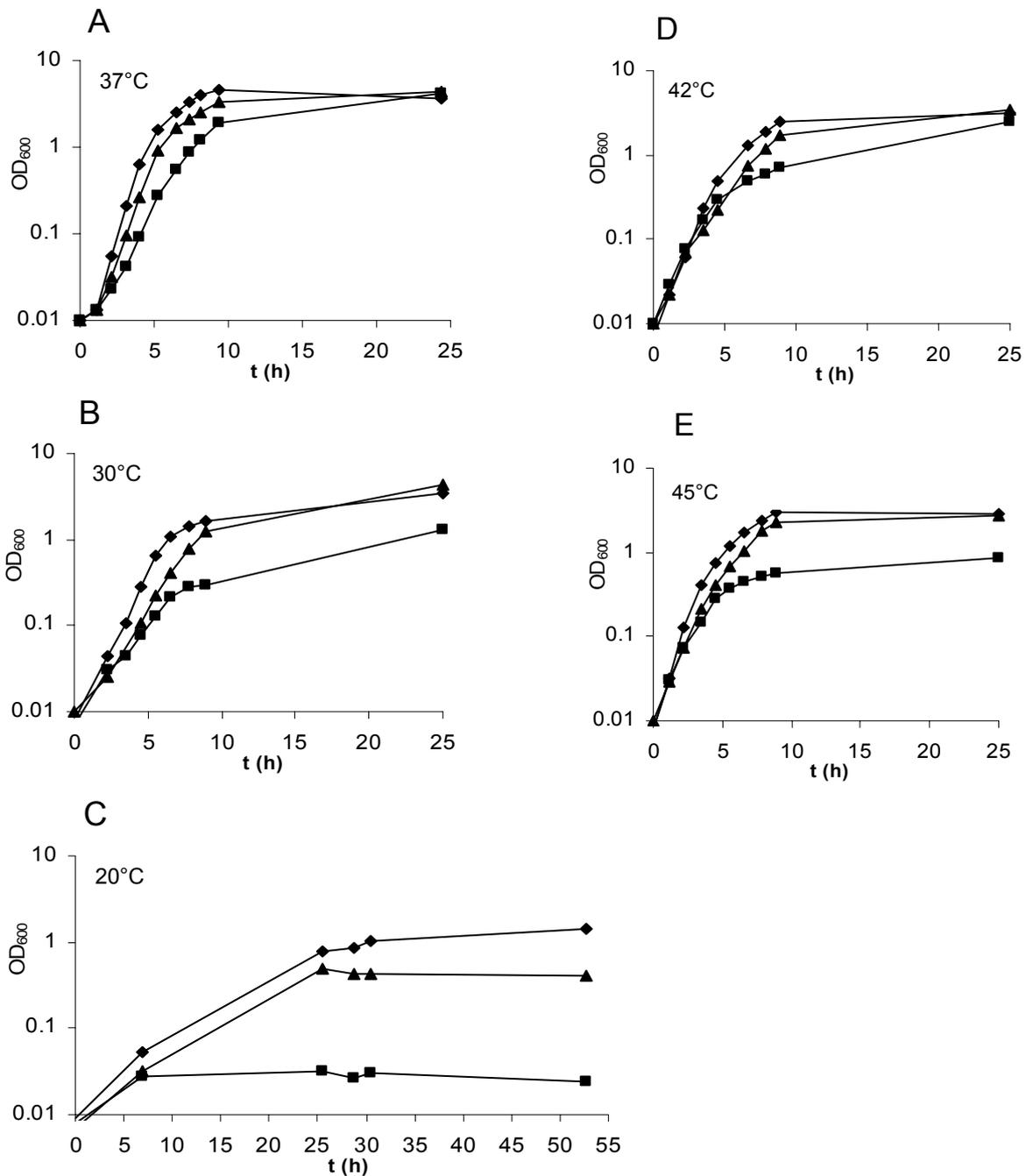


Abb. 7 Wachstumskinetiken der Stämme 8325(Wt)(◆), $\Delta clpP$ -Mutante (■) und komplementierter $\Delta clpP$ -Mutante($\Delta clpP(clpP^+)$) (▲) in LB-Medium bei verschiedenen Temperaturen. A: 37°C; B: 30°C; C: 20°C; D: 42°C; E: 45°C.

Nach Inkubation der Kulturen bei geringeren Temperaturen als 37°C verstärkte sich der Wachstumsnachteil der $\Delta clpP$ -Mutante. Bei 30°C betrug die Verdopplungszeit in der exponentiellen Phase bei der Mutante 79 min im Vergleich zu 52 und 63 min bei Wildtyp und Komplementante. Die Mutante erreichte eine optische Dichte von 0,3 bevor sie in die stationäre Phase übergang, während Wildtyp und Komplementante eine OD₆₀₀ von 1,6 und 1,2 erreichten. Nach 24 Stunden betrug die optische Dichte

der Wildtyp- und Komplementanten-Kultur 3,5 und 4,3, während die maximale optische Dichte der Mutante 1,3 betrug. Eine starke Beeinträchtigung des Wachstums aller Stämme konnte bei 20°C beobachtet werden. Die Verdopplungszeit des Wildtyps der Mutante und der Komplementante betrug in den ersten sieben Stunden 160, 227 und 187 min. Danach war kein Wachstum in Form einer Zunahme der optischen Dichte in der Mutanten-Kultur mehr nachweisbar. Der Wildtyp und die komplementierte Mutante erreichten nach 26 Stunden die stationäre Phase bei einer OD₆₀₀ von 0,8 und 0,5 (vgl. Abb. 7 A-E).

4.1.1.2. Temperaturabhängige *clpP*-Transkription in *S. aureus* 8325

Aufgrund des beobachteten Wachstumsdefekts der $\Delta clpP$ -Mutante bei verschiedenen Temperaturen wurde RNA aus Proben des Wildtyps in der exponentiellen Phase (OD₆₀₀=1) bei 37°, 30° und 20°C extrahiert, mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend in einem Northern Blot mit einer *clpP*-spezifischen Sonde hybridisiert. Im Gegensatz zu der bereits beschriebenen schwachen Expression des *clpP*-Transkripts bei 37°C (Frees *et al.*, 2003), konnte in diesem Versuch unter den gleichen Bedingungen ein deutliches *clpP*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 8). Bei erniedrigten Temperaturen (30°C u. 20°C) nahm die *clpP*-Transkriptmenge zu. Bezogen auf die Transkriptmenge bei 37°C, ergab sich bei 30°C eine 2,6-fache und bei 20°C eine 3,6-fache relative Zunahme des *clpP*-Transkriptes.

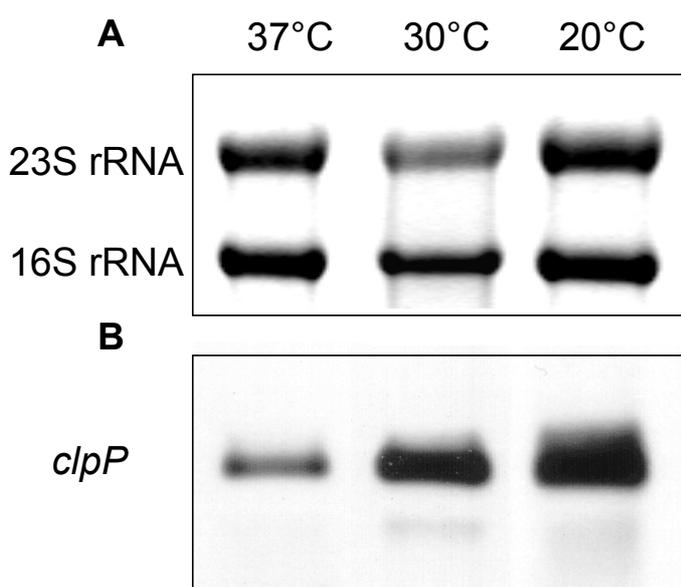


Abb. 8 Untersuchungen zur Bestimmung der *clpP*-Transkriptmengen im Stamm 8325 in Abhängigkeit von der Temperatur. Gesamt-RNA wurde aus Proben des Stammes 8325 bei einer OD₆₀₀ von 1 extrahiert und mittels Northern Blot-Analyse mit einer *clpP*-spezifischen Sonde hybridisiert. **A:** Als Kontrolle Ethidiumbromid-gefärbte 16S und 23S rRNA-Banden. **B:** *clpP*-Transkripte nach Hybridisierung mit einer *clpP*-spezifischen Sonde.

4.1.1.3. Kolonie- und Zellmorphologie von 8325 $\Delta clpP$

Beim Wachstum des 8325-Wildtyps und der $\Delta clpP$ -Mutante auf LB-Platten wurden Veränderungen des Phänotyps in Form von Unterschieden in der Koloniemorphologie beobachtet. Daher wurden Aliquots von Kulturen des Wildtyps und der Mutante bei der gleichen optischen Dichte von 1 verdünnt und ausplattiert. Die Mutante unterschied sich vom Wildtyp nach gleicher Inkubationszeit der Platten bei 37°C durch eine leicht erhöhte Anzahl von Kolonien mit einem verringertem Umfang (Abb. 9). Nach verlängerter Inkubationszeit (2 Tage) entwickelte der wildtypische Stamm 8325 eine leichte Gelbfärbung, wobei die Kolonien der $\Delta clpP$ -Mutante weiß blieben.

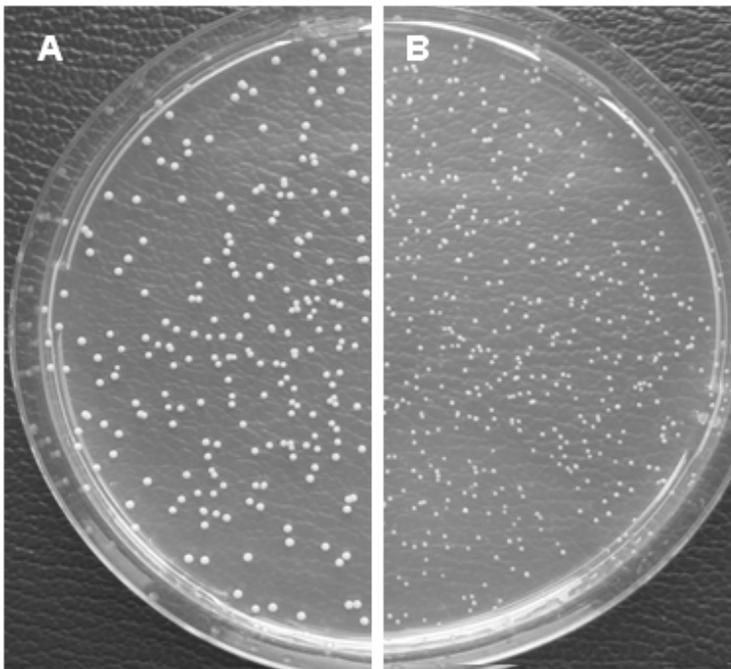


Abb. 9 Wachstum der Stämme 8325 und 8325 $\Delta clpP$ auf LB-Agar-Platten nach Inkubation bei 37°C. A: 8325, B: 8325 $\Delta clpP$. Aliquots exponentiell wachsender Bakterien ($OD_{600} = 1$) wurden verdünnt und ausplattiert. Die Platten wurde ÜN bei 37°C inkubiert.

Um den Einfluss der *clpP*-Inaktivierung auf die Zellmorphologie zu untersuchen wurden die Stämme 8325 und 8325 $\Delta clpP$ mit freundlicher Unterstützung von Dr. Christian Hüttinger (Biozentrum, IMI) rasterelektronenmikroskopisch untersucht (3.5.). Dazu wurden Bakterien aus exponentiell wachsenden Kulturen auf eine OD_{600} von 0,1 mit LB-Medium verdünnt. Jeweils 1 ml der jeweiligen Bakteriensuspension wurde in je einen Napf einer 24-Well-Platte pipettiert, in die zuvor Deckgläschen aus Polyethylen gelegt wurden. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die an den Deckgläschen adhärierenden Bakterien mehrfach vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben präpariert und rasterelektronenmikroskopisch betrachtet (Abb. 10). Insgesamt betrachtet erschien die Adhärenz des Stammes 8325 $\Delta clpP$ an den Untergrund verringert zu sein (Abb. 10 C). Jedoch ist die

Interpretation der Aufnahmen aufgrund von präparativen Einflüssen schwierig. Die $\Delta clpP$ -Zellen wiesen eine unregelmäßige Oberfläche im Vergleich zum Wildtyp auf. Weiterhin fiel auf, dass die $\Delta clpP$ -Zellen im Vergleich zum Wildtyp etwas verkleinert erschienen. Die Bestimmung der Zellgröße von jeweils 50 Bakterien von Wildtyp und Mutante durch die Messung der Längen in zwei Ebenen ergab eine durchschnittliche Zelllänge von $0,75 \pm 0,01 \mu\text{m}$ für den Wildtyp und $0,61 \pm 0,03 \mu\text{m}$ für die Mutante. Die durchschnittlichen Zellbreiten betragen $0,69 \pm 0,02 \mu\text{m}$ für den Wildtyp und $0,54 \pm 0,03 \mu\text{m}$ für die Mutante. Daraus ergab sich eine um den Faktor 0,8 verkleinerte Zellgröße der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp.

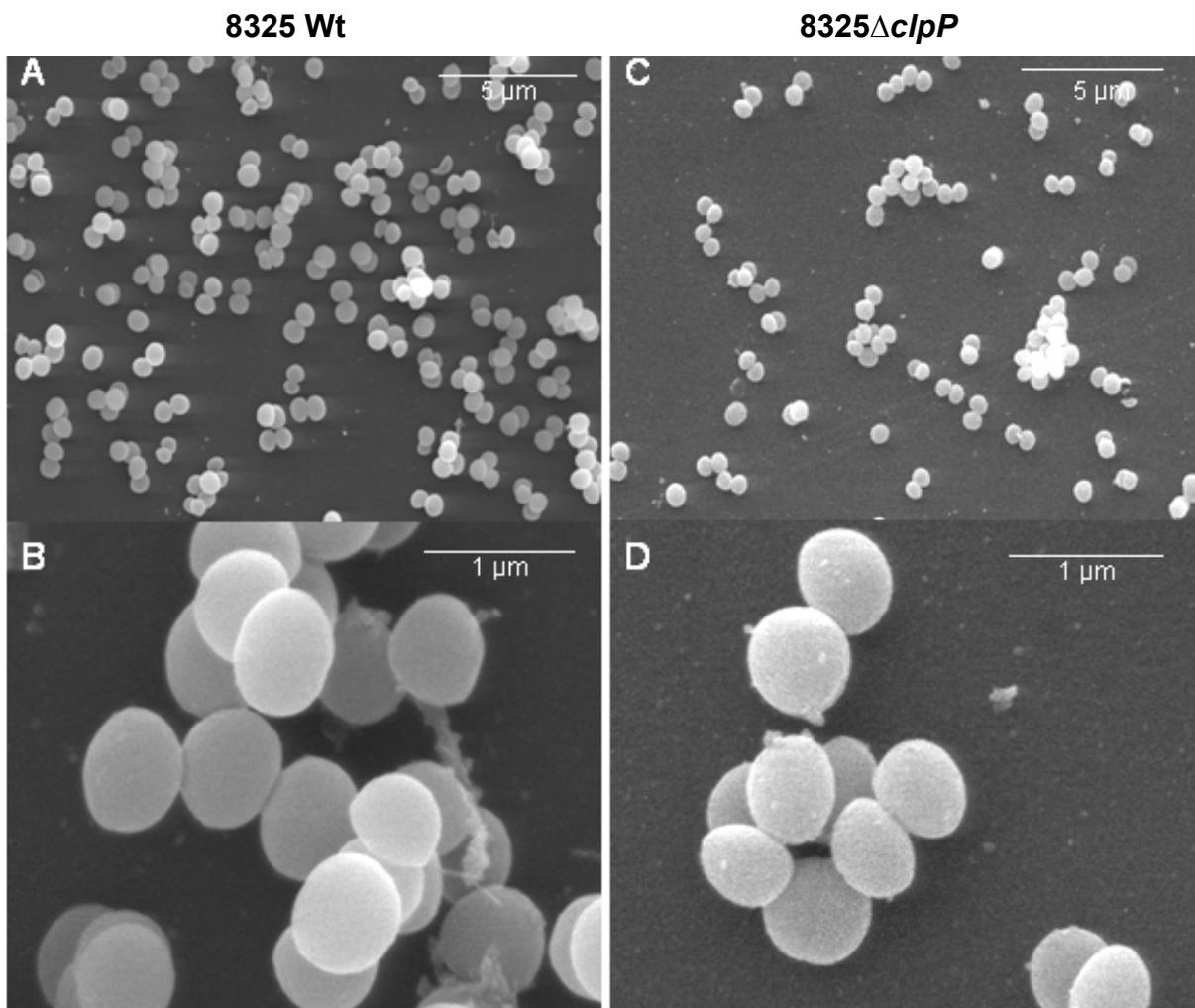


Abb. 10 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Stämme 8325 und 8325 $\Delta clpP$. Gezeigt sind verschiedene Ausschnitte und Vergrößerungen (siehe Balken). Abbildungen A und B: *S. aureus* 8325 Wt. Abbildungen C und D: *S. aureus* 8325 $\Delta clpP$.

4.1.1.4. Wachstum von 8325 $\Delta clpP$ unter anaeroben Bedingungen

Die Inaktivierung von *clpP* führt in *B. thuringiensis* und *L. lactis* zu einem Wachstumsdefekt unter anaeroben Bedingungen (Frees *et al.*, 2001; Fedhila *et al.*, 2002). In *B. subtilis* ist die Expression des ResDE-kontrollierter Gene, die in

Ergebnisse

Abhängigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit für das anaerobe Wachstum benötigt werden, ClpXP-abhängig (Nakano *et al.*, 2000). Daher sollte die Auswirkung der *clpP*-Inaktivierung in *S. aureus* auf das anaerobe Wachstum untersucht werden (Abb. 11). Dazu wurden Vereinzlungsaustriche der Stämme 8325, $\Delta clpP$ und $\Delta clpP+$ auf LB-Agar-Platten angefertigt und jeweils unter aeroben und anaeroben Bedingungen durch Einsatz eines Anaeroben-Topfes (Anaerokult, Merck) zur Erzeugung einer sauerstofffreien Atmosphäre bei 37°C inkubiert. Nach 3-tägiger Inkubationszeit unter aeroben Bedingungen wiesen alle drei Stämme gleiche Kolonie-Größen und -morphologien auf. Unter anaeroben Bedingungen hatten alle drei Stämme im Vergleich zum aeroben Ansatz einen Wachstumsnachteil, der sich durch ein schwächeres Wachstum und verkleinerter Kolonien auszeichnete. Der Vergleich der drei Stämme untereinander ergab, dass die $\Delta clpP$ -Mutante den stärkeren Wachstumsnachteil im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Dieser konnte durch Komplementation mit dem Vektorkonstrukt pHPS9*clpP+* kompensiert werden.

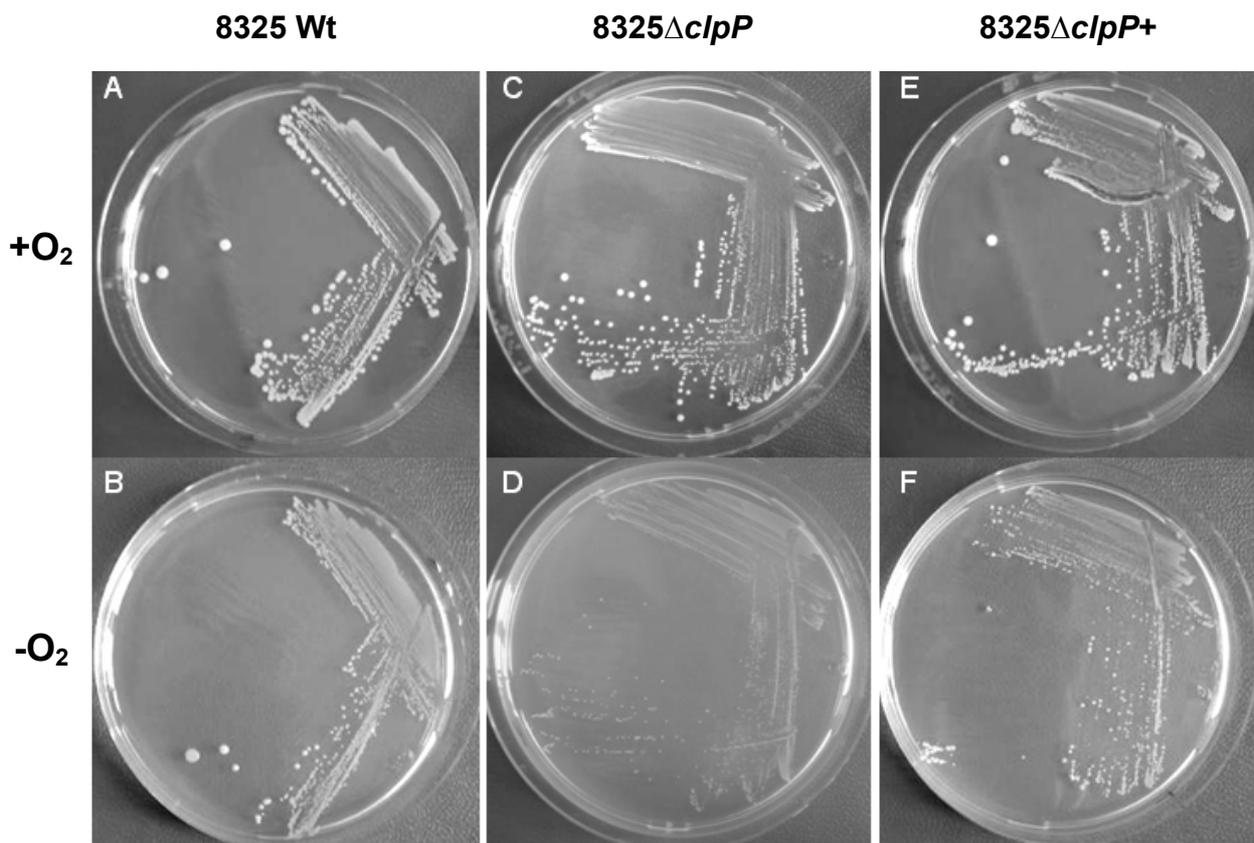


Abb. 11 Untersuchung zum anaeroben Wachstum der $\Delta clpP$ -Mutante. Vereinzlungsaustriche auf LB-Agar wurden parallel unter aeroben (A, C, E) und anaeroben Bedingungen (B, D, F) bei 37°C für 3 Tage inkubiert. A, B: 8325; C, D: $\Delta clpP$; E, F: $\Delta clpP+$.

4.1.1.5. Triton X-100 induzierte Autolyse von 8325 $\Delta clpP$

Die Elektronenmikroskopische Untersuchung der $\Delta clpP$ -Mutante deutet auf eine Veränderung der Zellwand hin, deren Zusammensetzung u. a. von der Aktivität von Peptidoglykan-Hydrolasen abhängt. Mit Triton X-100 kann eine veränderte Hydrolase-Aktivität durch die Induzierung der Autolyse festgestellt werden. Die Stämme 8325, 8325 $\Delta clpP$ und 8325 $\Delta clpP^+$ wurden gemäß der unter 3.7 beschriebenen Anleitung vorbereitet. Um einen möglichen indirekten *agr*-abhängigen Effekt der *clpP*-Deletion auf die Autolyse zu erfassen wurde der Vergleichsstamm 8325 $\Delta agrC$ eingesetzt. Die Abnahme der optischen Dichte der mit Triton X-100 behandelten Kulturen wurde als Maß der induzierten Lyse der Bakterien angenommen (Abb. 12). Bereits nach 60 min konnte eine verstärkte Lyse der $\Delta clpP$ -Mutante um 33 % beobachtet werden. Dagegen lysierten im gleichen Zeitraum nur 0-3 % des wildtypischen Stammes 8325, der komplementierten $\Delta clpP$ -Mutante und der 8325 $\Delta agrC$ -Mutante. Nach ~300 min lysierten 46 % der $\Delta clpP$ -Kultur im Vergleich zu 17-18 % der Vergleichsstämme. Die Deletion von *clpP* führt somit zu einer *agr*-unabhängigen Veränderung der Peptidoglykan-Hydrolasen-Aktivität.

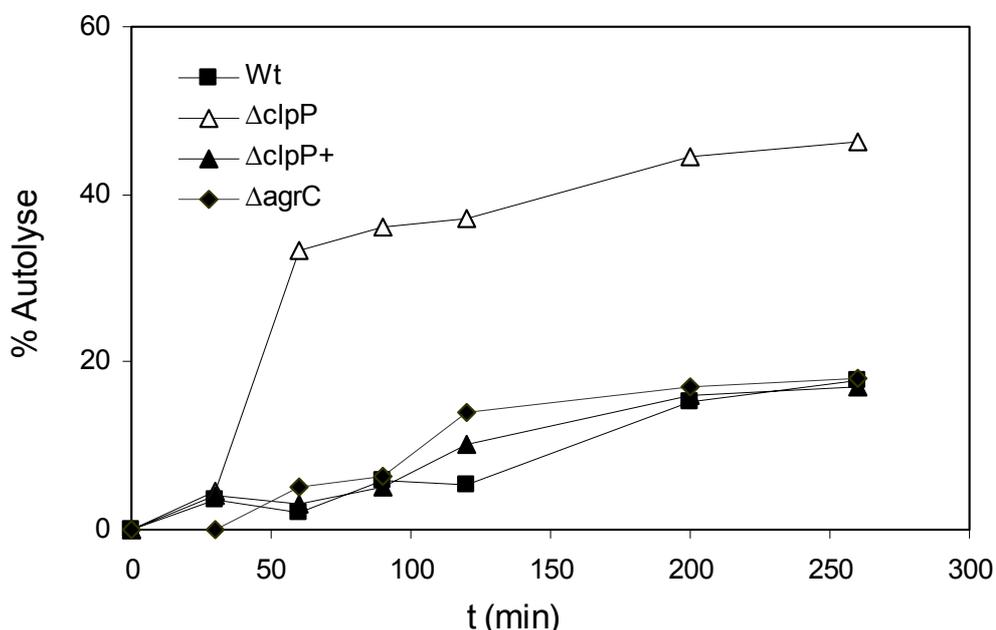


Abb. 12 Triton X-100 induzierte Autolyse der Stämme 8325 Wt (\blacklozenge), 8325 $\Delta clpP$ (\blacksquare) und komplementierter $\Delta clpP$ -Mutante (8325 $\Delta clpP^+$) (\blacktriangle). Bakterien wurden mit 0,1 % Triton X-100 bei 30°C in einem Schüttelinkubator kultiviert und Veränderungen in der optischen Dichte protokolliert (vgl 3.7).

4.1.1.6. Veränderte physiologische Eigenschaften der 8325 $\Delta clpP$ -Mutante

Mit den *S. aureus*-Stämmen 8325, $\Delta clpP$ und $\Delta clpP^+$ wurde ein API-Staph-Test (BioMerieux) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Testsystem, das die Identifikation verschiedener Staphylokokken-Spezies aufgrund ihrer unterschiedlichen

Ergebnisse

Stoffwechselleistungen ermöglicht. Es setzt sich aus 20 biochemischen Reaktionen zusammen, die aufgrund der Verfärbung von Indikatorfarbstoffen eine Beurteilung der jeweiligen getesteten Reaktionen ermöglicht. Die Beurteilung wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser Test wurde eingesetzt, um physiologische Veränderungen im Stamm 8325 aufgrund der *clpP*-Inaktivierung zu identifizieren. Im Vergleich zum Wildtyp und $\Delta clpP^+$ wies die $\Delta clpP$ -Mutante Unterschiede in der Urease-Aktivität, der Arginin Deiminase-Aktivität und in der Laktose-Verwertung auf (Abb. 13). Nach nur dreistündiger Inkubationszeit bei 37°C fiel die deutlich verstärkte Urease-Aktivität der $\Delta clpP$ -Mutante in Form eines Farbumschlags des Indikatorfarbstoffs auf, während noch keine Aktivität im Wildtyp nachweisbar war. Nach Inkubation über Nacht waren in den drei Ansätzen die Reaktionen vollständig abgelaufen, sodass keine Unterschiede mehr feststellbar waren. Nach 16 h wurde der Test ausgewertet. Die Mutante zeigte einen Defekt in der Arginin Deiminase-Aktivität sowie eine leichte Verminderung in der Laktose-Verwertung.

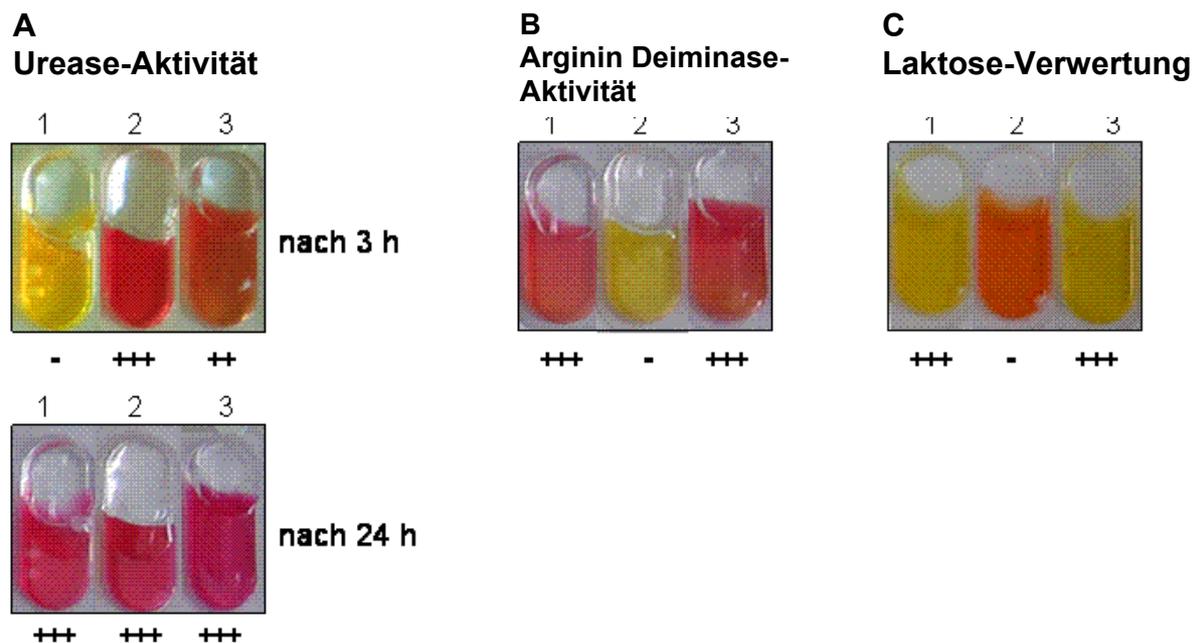


Abb. 13 Veränderungen in den physiologischen Eigenschaften aufgrund der *clpP*-Inaktivierung. 1: 8325, 2: $\Delta clpP$, 3: $\Delta clpP^+$. **A:** Urease-Aktivitäts-Test: Farbumschlag von gelb nach rot weist auf eine positive Reaktion hin. **B:** Arginin Deiminase-Aktivitäts-Test: Farbumschlag siehe A. **C:** Laktose-Verwertung. Farbumschlag von rot nach gelb weist auf positive Reaktion hin. Bewertung der Reaktion mit + und - dargestellt.

4.1.1.7. Hämolytische Aktivität der 8325 $\Delta clpP$ -Mutante

Für die Inaktivierung des *clpP*-Gens in *S. aureus* 8325-4 wurde eine verminderte Expression extrazellulärer Virulenzfaktoren beobachtet (Frees *et al.*, 2003). Daher sollte die hämolytische Aktivität der in dieser Arbeit generierten 8325 $\Delta clpP$ -Mutante getestet werden. Dazu wurden die Stämme 8325, $\Delta clpP$ und $\Delta clpP^+$ auf

Kaninchenblut-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die hämolytische Aktivität durch die Beurteilung des Durchmessers der die Kolonien umgebenden lysierten Zonen festgestellt. Im Gegensatz zum Wildtyp konnte keine hämolytische Aktivität in der $\Delta clpP$ -Mutante beobachtet werden. Die komplementierte Mutante zeigte dagegen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Aktivität. Nach verlängerter Inkubation bei 37°C (2 Tage) konnte für die $\Delta clpP$ -Mutante eine schwache hämolytische Aktivität nachgewiesen werden.

4.1.1.8. Adhärenz-Assay der 8325 $\Delta clpP$ -Mutante an Polystyren

Die Fähigkeit an Oberflächen zu adhären stellt einen wichtigen Faktor in der Pathogenese von *S. aureus* dar. Dabei spielen insbesondere die Besiedlung von Implantaten und Kathetern eine Rolle. Aus diesem Grund wurde ein Adhärenz-Assay mit den Stämmen 8325 und 8325 $\Delta clpP$ durchgeführt (siehe 3.6). Die Stämme wurden in TSB-Medium mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (1 %, 2 %, 3 %) in einer 24-well-Gewebekulturplatte über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Auswertung der Ansätze zeigte, dass die $\Delta clpP$ -Mutante in deutlich geringerem Maße an Polystyren adhärert als der Wildtyp. Auch durch erhöhte NaCl-Konzentrationen, die im Wildtyp die Biofilmbildung begünstigten, konnte keine Adhärenz der Mutante festgestellt werden.

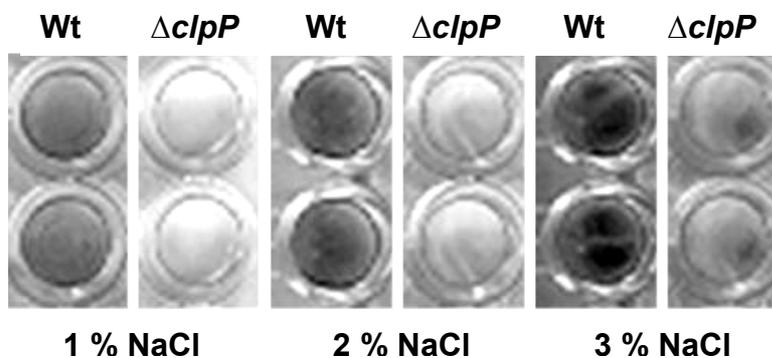


Abb. 14 Adhärenz an Polystyren der Stämme 8325 Wt und 8325 $\Delta clpP$. Bakterien wurden in TSB-Medium mit 1%, 2% und 3% NaCl ÜN bei 37°C inkubiert (vgl. 3.6).

4.1.1.9. Internalisierung der 8325 $\Delta clpP$ -Mutante durch 293T-Epithelzellen

Die Inaktivierung der Gene *clpP*, *clpX*, *clpB* und *clpC* in dem *S. aureus*-Stamm 8325-4 führt zu dem Verlust der Vermehrungsfähigkeit in Mac-T-Zellen (Frees *et al.*, 2004). Der Einfluss der *clpP*-Inaktivierung auf die Internalisierungsrate ist dagegen unbekannt. Daher war es von Interesse, ob die Deletion des *clpP*-Gens eine Auswirkung auf die Internalisierungsrate in einem Zellkulturassay mit Epithelzellen bewirkt. Für diesen Versuch wurde die humane Nierenepithelzelllinie 293T eingesetzt. Die Versuche zur Ermittlung der Invasivität der Stämme 8325, 8325 $\Delta clpP$ und $\Delta clpP$ + wurden wie unter 3.8 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass

der Selektionsdruck auf die Mutanten in der ÜN-Kultur aufrechterhalten wurde ($\Delta clpP$, $\Delta clpP^+$: 10 $\mu\text{g/ml}$ Em und 10 $\mu\text{g/ml}$ Cm). Die Hauptkultur wurde dagegen zur besseren Vergleichbarkeit ohne Zugabe von Antibiotika kultiviert. Die Internalisierungsrate der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp war um das ~ 10 -fache erhöht (Abb. 15 A). Dieser Effekt konnte durch die Komplementierung der Mutante ($\Delta clpP^+$) nicht vollständig auf das wildtypische Niveau gesenkt werden. Um den indirekten Einfluss über eine erniedrigte *agr*-Expression auszuschließen, wurden zu Vergleichszwecken zwei *agr*-Deletionsmutanten ($\Delta agrC$, $\Delta agrA$) eingesetzt. Die Internalisierungsrate der *agr*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp war nur schwach erhöht, sodass die stärkere Internalisierung der $\Delta clpP$ -Mutante auf einen *agr*-unabhängigen Effekt zurückzuführen ist.

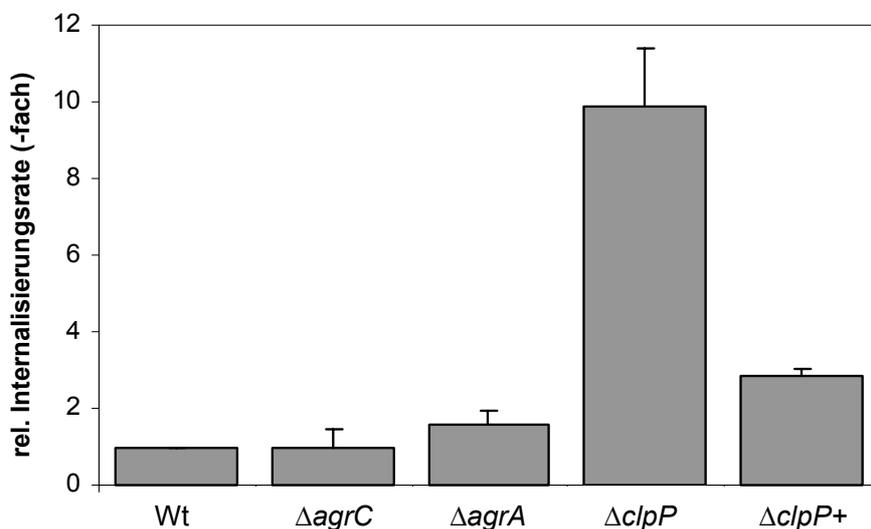


Abb. 15 Ermittlung der relativen Internalisierungsraten der *S. aureus*-Stämme 8325 $\Delta clpP$ und 8325 $\Delta clpP^+$ im Vergleich zu 8325Wt, in einem Zellkulturassay mit 293T-Zellen. Die Infektion wurde mit einer MOI von 20 durchgeführt. Als Kontrollen wurden die Stämme 8325 $\Delta agrC$ und 8324 $\Delta agrA$ eingesetzt.

4.1.1.10. Überprüfung der Fibronectin-Bindungskapazität von 8325 $\Delta clpP$

Aufgrund der deutlich erhöhten Internalisierungsrate der 8325 $\Delta clpP$ -Mutante durch 293T-Zellen (4.1.1.9) sollte die Fibronectin-Bindungskapazität der Mutante überprüft werden. Die Analyse wurde freundlicherweise von Karin Hilgert unter der Leitung von Prof. Dr. Mathias Herrmann (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universitätsklinikum Saarland) durchgeführt (Vaudaux *et al.*, 1984; Hussain *et al.*, 2001). Die $\Delta clpP$ -Mutante wies eine um 2,2-fach erhöhte Kapazität auf Fibronectin zu binden gegenüber dem Wildtyp auf, die durch die Komplementierung mit *clpP* nicht vollständig reduziert werden konnte (1,6-fach). Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der beobachteten erhöhten Internalisierungsrate, die ebenfalls durch die Einführung des *clpP*-Expressionsvektors in die Mutante nicht vollständig reduziert werden konnte.

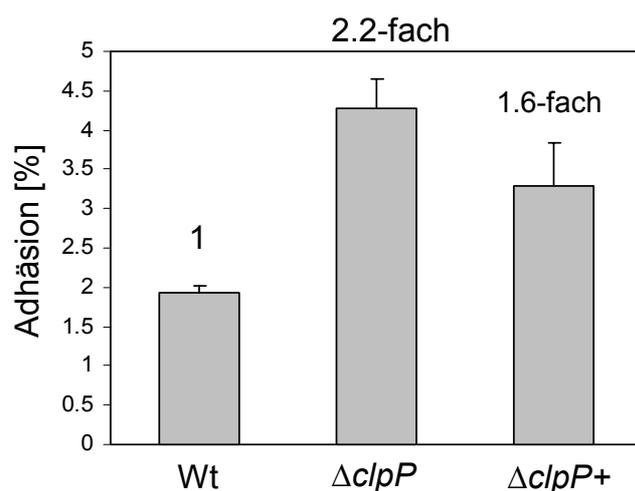


Abb. 16 Fibronectin-Bindungskapazität des Stammes 8325 und der isogenen Mutanten $\Delta clpP$ und $\Delta clpP+$.

4.1.2. Differenzielle Transkriptomanalyse der 8325 $\Delta clpP$ -Mutante mittels Microarray-Hybridisierung

Ein Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der *clpP*-Deletion auf das Transkriptom von *S. aureus* mit Hilfe der Methode der differentiellen Microarray-Hybridisierung zu untersuchen (vgl. 3.2.). Dazu wurden Gesamt-RNA-Präparationen des Wildtyps 8325 und der isogenen $\Delta clpP$ -Mutante für die Synthese von cDNA-Sonden eingesetzt (vgl. 3.3.1.). Für die Microarray-Analyse wurden fünf verschiedene Hybridisierungen durchgeführt. Diese setzten sich aus jeweils fünf unabhängigen Gesamt-RNA-Präparationen von Wildtyp und Mutante zusammen. Um eventuelle Hybridisierungsunterschiede aufgrund eines unterschiedlichen Einbaus der beiden Fluoreszenzfarbstoffe durch die reverse Transkriptase zu kompensieren, wurde die Markierung der cDNA beider Stämme in einem „Dye Switch“ jeweils mit den zwei Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 durchgeführt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden für jedes Hybridisierungsexperiment Wildtyp und die Mutante jeweils parallel unter den gleichen Wachstumsbedingungen angezogen. Die Stämme wurden bei 37°C in LB-Medium kultiviert und das Zellmaterial für die Gesamt-RNA-Präparation bei einer OD₆₀₀ von 1,0 gewonnen. Die Hybridisierungsexperimente und die anschließende Auswertung wurden wie unter 3.2 beschrieben durchgeführt. Nach Berechnung des Quotienten der Fluoreszenzsignale von Wildtyp gegen Mutante wurden Werte ≥ 2 als in der Transkription in der $\Delta clpP$ -Mutante erhöht und Werte $\leq 0,5$ als erniedrigt angesehen. Gene, die in mindestens vier unabhängigen Hybridisierungsexperimenten die gleiche Tendenz in den Signalintensitäten aufwiesen, wurden in die Auswertung aufgenommen. Signale benachbarter, in gleicher Orientierung und im geringen Abstand voneinander ausgerichteten Genen, wurden als

putative Transkriptionseinheiten angesehen. Für die Gene, die sich in diesen Einheiten befinden, wurde bei gleicher Tendenz der Transkriptionsrate der „Cut off“ auf $>1,7$ und $<0,6$ gesenkt.

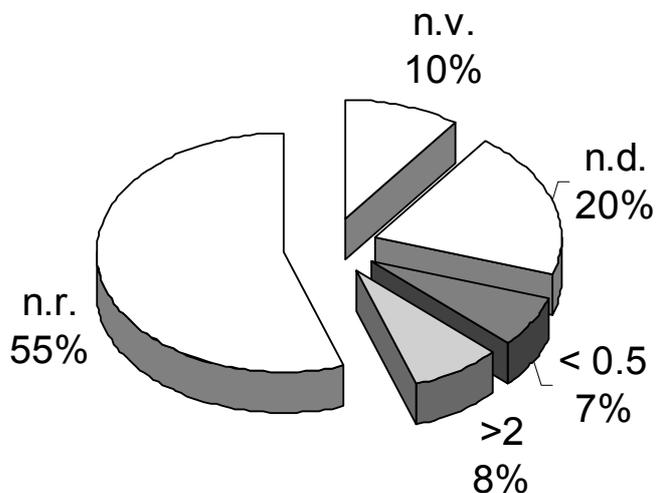


Abb. 17 Übersicht der differentiellen Genexpressionsanalyse der $\Delta clpP$ -Mutante. Im Kreisdiagramm sind die prozentualen Anteile der in die Auswertung eingegangenen ORFs auf dem N315-Full Genome Chip dargestellt. n.r.: nicht reguliert (Signalquotient = 1), n.d.: nicht auswertbar, n.v.: nicht auf dem N315-Full-Genom-Chip repräsentiert.

Bei dem eingesetzten *S. aureus* N315 Full Genome Chip handelt es sich um einen PCR-Produkt-Microarray, der 2334 von 2593 der für den Stamm N315 annotierten ORFs umfasst (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes). 521 ORFs wurden aufgrund von nicht reproduzierbaren Signalen von der Auswertung ausgeschlossen. Insgesamt wurden 1813 ORFs in die Auswertung aufgenommen. Davon wurden 1434 als in der Transkription nicht reguliert, 204 als in der Mutante vermindert und 175 als erhöht transkribiert eingeordnet (Abb. 17). Die Einteilung der ORFs in bestimmte Kategorien wurde nach der ebenfalls unter www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes verfügbaren Liste des N315-Gesamt-Genoms vorgenommen. Um einen genaueren Überblick über die Verteilung der in ihrer Transkription von der *clpP*-Deletion betroffenen Gene zu erhalten, wurden die absolute Anzahl der ORFs der einzelnen Kategorien in Abb. 18 dargestellt.

Ergebnisse

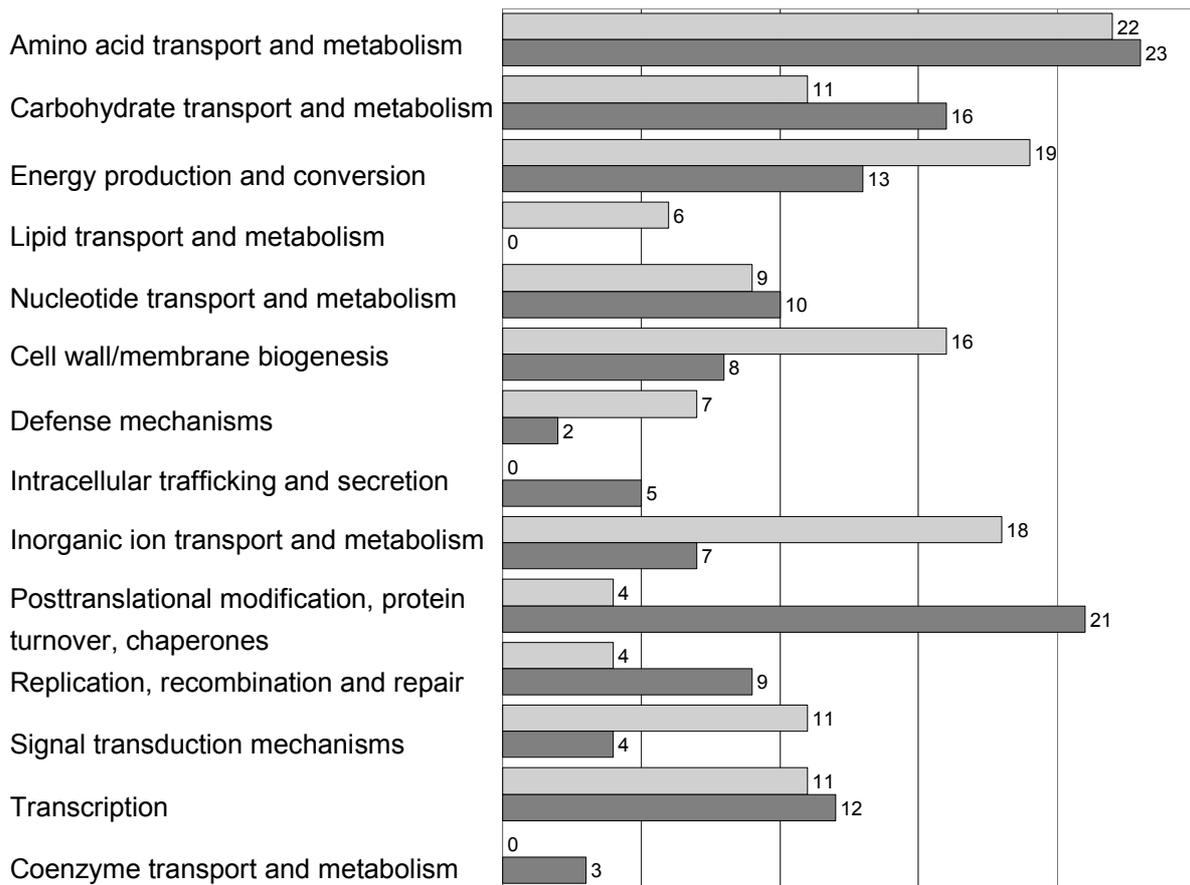


Abb. 18 Übersicht der Verteilung der in die Auswertung eingegangenen ORFs bezüglich ihrer funktionellen Einordnung. Die Einteilung in Kategorien wurde nach www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes durchgeführt. Die hellgraue Balken repräsentieren die in der $\Delta clpP$ -Mutante ermittelten ORFs mit verminderter Transkription (Signalquotient > 2). Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die in $\Delta clpP$ ermittelten ORFs mit erhöhter Transkription (Signalquotient $< 0,5$). Die Gesamtanzahl der deregulierten ORFs in jeder Kategorie steht am Ende jedes Balkens.

Dabei zeigte sich, dass die *clpP*-Deletion Einfluss auf die Transkription von Genen aus allen Bereichen der zellulären Physiologie hat (vgl. Anhang 7.1). Besonders Gene, deren Produkte in die posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz und Chaperonfunktion involviert sind, werden in $\Delta clpP$ erhöht exprimiert. Eine weitere Gruppe, in der starke Expressionsunterschiede in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp auftraten, umfasst Gene, deren Produkte für Transkriptions- und Signaltransduktions-Mechanismen verantwortlich sind (Tabelle 7). Eine erhöhte Transkription weisen die Gene der Transkriptionsregulatoren der Hitzeschockantwort (*ctsR*, *hrcA*), der Kontrolle von DNA-Reparaturmechanismen (*lexA*) sowie das essenzielle Zwei-Komponenten-System *yycFG* (auch: *vickR*) und ein hypothetisches Zwei-Komponenten-System mit unbekannter Funktion (SA2417-SA2418) auf. Weitere Regulatoren der Virulenzfaktorexpression und Autolyse (*agrCA*, *arlRS*, *lytSR* *sarA*,

Ergebnisse

sarT, *sarR*, *rat/mgr/norR*), der anaeroben Atmung (*nreBC* =SA2180-SA2179) sowie den alternativen Sigma-Faktor B sind durch die *clpP*-Deletion betroffen.

Tabelle 5 Übersicht der mittels Transkriptomanalyse der $\Delta clpP$ -Mutante identifizierten deregulierten Transkriptionsregulatoren

S. aureus N315			putative Transkriptionseinheit	Wt/ $\Delta clpP^2$
ORF	Gen	Beschreibung	(5'-3')¹	
erhöhte Transkriptionsrate in $\Delta clpP$:				
SA0017	<i>vicR</i>	two-component RR	<i>vicR</i> (0.5)- <i>vicK</i> (0.4)	0.5
SA2418	-	HP, similar to two-component RR	SA2418(0.5)-SA2417(0.4)	0.4
SA0480	<i>ctsR</i>	repressor of class III stress genes	<i>ctsR</i> (0.3)-SA0481(0.1)-SA0482(0.1)- <i>clpC</i> (0.1)	0.3
SA1411	<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcriptional repressor	<i>hrcA</i> (0.4)- <i>grpE</i> (0.4)- <i>dnaK</i> (0.3)- <i>dnaJ</i> (0.3)	0.4
SA1174	<i>lexA</i>	SOS regulatory LexA protein		0.4
SA0573	<i>sarA</i>	staphylococcal accessory regulator A		0.4
SA2286	<i>sarT</i>	SarA homologue		0.5
SA1041	<i>pyrR</i>	pyrimidine operon repressor chainA	<i>pyrR</i> (0.5)- <i>pyrP</i> (0.4)- <i>pyrB</i> (0.4)- <i>pyrC</i> (0.4)- <i>pyrAA</i> (0.4)- <i>pyrAB</i> (0.5)- <i>pyrF</i> (0.5)- <i>pyrE</i> (0.4)	0.5
SA1098	<i>codY</i>	transcription pleiotropic repressor CodY		0.5
SA1139	<i>glpP</i>	glycerol uptake operon antiterminator		0.5
SA1897	-	HP, similar to transcriptional activator TenA	SA1897(0.3)- <i>thiD</i> (0.4)- <i>thiM</i> (0.5)- <i>thiE</i> (0.4)	0.3
SA2320	-	HP, similar to regulatory protein PfoR	SA2320(0.3)-SA2319(0.4)-SA2318(0.2)	0.3
SA0298	-	HP, similar to regulatory protein PfoR		0.5
verminderte Transkriptionsrate in $\Delta clpP$:				
SA0250	<i>lytS</i>	two-component sensor HK	<i>lytS</i> (2.1)- <i>lytR</i> (2.1)	2.1
SA1248	<i>arlR</i>	two-component RR	<i>arlR</i> (3.6)- <i>arlS</i> (2.1)	3.6
SA1843	<i>agrC</i>	accessory gene regulator C	<i>agrB</i> (n.d.)- <i>agrD</i> (n.d.*)- <i>agrC</i> (2.4)- <i>agrA</i> (1.8)	2.4
SA2180	<i>nreB</i>	HP, similar to two-component HK	<i>nreA</i> (3.1)- <i>nreB</i> (3.2)- <i>nreC</i> (2..4)	3.2
SA1869	<i>sigB</i>	sigma factor B	<i>rsbU</i> (4.2)- <i>rsbV</i> (n.d.*)- <i>rsbW</i> (4.5)- <i>sigB</i> (4.1)	4.1
SA2089	<i>sarR</i>	SarA homologue		2.3
SA0454	<i>purR</i>	pur operon repressor homologue		2.1
SA1509	-	COG1327: Predicted transcriptional regulator, Zn-ribbon, ATP-cone domains		2.4
SA0322	-	HP, similar to transcription regulator, MarA family	SA0322 (3.5)- <i>svrA</i> (2.8)	3.5
SA1748	-	HP, similar to transcription regulator, GntR family	SA1748(2.6)-SA1747(n.d.*)-SA1746(2.1)-SA1745(2.3)-SA1744(2.2)	2.6
SA2108	-	HP, similar to transcription regulator, RpiR family		2.0
SA1801	-	anti repressor		4.3

1: Die Werte in den Klammern stehen für die Signalquotienten weiterer Gene in einer putativen Transkriptionseinheit (siehe auch Anhang 7.2). **2:** CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **3:** Der Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante >2 bedeutet in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 in der Mutante erhöht exprimiert.

4.1.2.1. Einfluss der *clpP*-Deletion auf die Transkription Virulenzfaktor-kodierender Gene

Die Transkriptomanalyse der $\Delta clpP$ -Mutante ergab, dass Gene die für Virulenz- oder virulenzassoziierte Faktoren kodieren in der exponentiellen Phase stark durch das Fehlen von ClpP beeinflusst wurden (Tabelle 6). Insgesamt sind 56 Gene im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich transkribiert. Dabei sind vor allem Gene, die der Gruppe der Adhäsine zugeordnet werden, erhöht exprimiert. Dagegen ist unter anderem die Transkription Exoenzym-kodierender Gene vermindert.

Tabelle 6 Überblick der veränderten Transkription Virulenzfaktor-kodierender Gene in 8325 $\Delta clpP$

S. aureus-N315		Beschreibung²	Wt/ $\Delta clpP$³
ORF¹	Gen		
erhöhte Transkription in $\Delta clpP$:			
Adhäsine			
SA2097 ^Y	-	HP, similar to secretory antigen precursor SsaA	0.4
SA2161	-	HP, attachment to host cells and virulence	0.4
SA2356 ^Y	<i>isaA</i>	immunodominant antigen A	0.5
SA2431	<i>isaB</i>	immunodominant antigen B	0.4
SA0742 ^B	<i>clfA</i>	fibrinogen-binding protein A, clumping factor (LPXTG)	0.3
SA1267	<i>ebhA</i>	HP, similar to streptococcal adhesin emb	n.d.
SA1268 ^{P,Y}	<i>ebhB</i>	HP, similar to streptococcal adhesin emb	0.5
SA1312	<i>ebpS</i>	elastin binding protein	0.4
SA2290 ^{Y,L}	<i>fnbB</i>	fibronectin-binding protein homolog (LPXTG)	up
SA2291 ^L	<i>fnb</i>	fibronectin-binding protein homolog (LPXTG)	up
SA2423	<i>clfB</i>	Clumping factor B (LPXTG)	0.4
SA1282	<i>ssaA</i>	secretory antigen precursor SsaA homolog	0.5
SA2353 ^{Y,F}	-	HP, similar to secretory antigen precursor SsaA	0.4
Toxine			
SA1811	<i>hly</i>	truncated beta-hemolysin	0.4
Andere			
SA0891 ^{P,L}	-	HP, similar to ferrichrome ABC transporter	0.5
SA1964	<i>fntB</i>	FntB protein (mrp) (LPXTG)	0.4
SA1979 ^F	-	HP, similar to ferrichrome ABC transporter	0.5
SA2337 ^F	<i>feoB</i>	ferrous iron transport protein B homolog	0.3
SA2447 ^{S,C,Y}	<i>hsa</i>	HP, similar to streptococcal hemagglutinin protein (LPXTG)	0.3
verminderte Transkription in $\Delta clpP$:			
Adhäsine			
SA0587M	<i>mntC</i>	lipoprotein, Streptococcal adhesin PsaA homologue	2.5
SA2459	<i>icaA</i>	intercellular adhesion protein A	4.3
SA2460	<i>icaD</i>	intercellular adhesion protein D	9.0
SA2461	<i>icaB</i>	intercellular adhesion protein B	2.0
SA2462	<i>icaC</i>	intercellular adhesion protein C	2.9
Toxine			
SA1007 ^{S,C}	<i>hly</i>	Alpha-Hemolysin precursor	3.8
SA1813 ^{Fn}	-	HP, similar to leukocidin chain lukM precursor	4.3

Ergebnisse

S. aureus-N315			Wt/ $\Delta clpP^3$
ORF¹	Gen	Beschreibung²	
Exoenzyme			
SA0022	-	HP, similar to 5'-nucleotidase (LPXTG)	3.2
SA0309	<i>geh</i>	glycerol ester hydrolase	3.9
SA0746	<i>nuc</i>	staphylococcal nuclease	5.0
SA0901	<i>sspA</i>	serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase	4.1
SA1628	<i>spID</i>	serine protease SpID	3.6
SA1629	<i>spIC</i>	serine protease SpIC	7.7
SA1630 ^C	<i>spIB</i>	serine protease SpIB	3.6
SA1725	-	Staphopain, Cysteine Proteinase	3.4
SA2430 ^{S,Fn}	<i>aur</i>	zinc metalloproteinase aureolysin	18.8
SA2463 ^{S,C}	<i>lip</i>	triacylglycerol lipase precursor	3.7
Andere			
SA0144	<i>capA</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5A	5.6
SA0145	<i>capB</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5B	4.6
SA0146	<i>capC</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C	4.1
SA0147	<i>capD</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5D	4.4
SA0148	<i>capE</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E	3.3
SA0149	<i>capF</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5F	3.2
SA0150	<i>capG</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5G	2.6
SA0151	<i>capH</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5H	2.6
SA0152	<i>capI</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5I	2.5
SA0153	<i>capJ</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5J	2.1
SA0154	<i>capK</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5K	2.6
SA0155	<i>capL</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5L	2.5
SA0156	<i>capM</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5M	2.7
SA0157	<i>capN</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5N	2.1
SA0158	<i>capO</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O	3.0
SA0159	<i>capP</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5P	2.1
SA0566	-	HP, similar to iron-binding protein	2.5
SA0841	-	HP, similar to cell surface protein Map-w	2.3
SA1709 ^P	-	HP, similar to ferritin	3.1
SA2206	<i>sbi</i>	IgG-binding protein SBI	4.3

1: Zusätzliche Regulatoren aufgrund von konservierten DNA-Motiven: **Y:** YycFG (vgl. 4.1.2.10, Tabelle 15); **B:** σ^B (vgl. 4.1.2.5, Tabelle 14); **P:** PerR (vgl. 4.1.2.6, Tabelle 11); **L:** LexA (vgl. 4.1.2.8, Tabelle 13); **F:** Fur (vgl. 4.1.2.5, Tabelle 10); **M:** MntR (vgl. 4.1.2.6, Tabelle 12); **C:** *cre*-Element (vgl. 4.1.2.13, Tabelle 18); **Fn:** Fnr/ArcR (vgl. 4.1.2.11, Tabelle 16). **2:** CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **3:** Der Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante >2 bedeutet in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert, <0.5 in der Mutante erhöht exprimiert; „up“ steht für nicht auswertbar im Microarray-Experiment, erhöhte Transkription wurde mittels RT-PCR bestätigt (4.1.2.14).

4.1.2.2. Zuordnung der in der $\Delta clpP$ -Mutante deregulierten Gene in regulatorische Transkriptionseinheiten

Die deutliche Veränderung des Transkriptionsprofils in der $\Delta clpP$ -Mutante ist auf multiple direkte und indirekte Effekte zurückzuführen. Das Fehlen der proteolytischen Untereinheit der ATP-abhängigen Proteasen führt zu der Akkumulation fehlerhafter

Proteine. Dieser Zustand ist mit bestimmten Stressbedingungen vergleichbar und bewirkt die Induktion der bakteriellen Stressantwort. Die Kontrolle der Umsatzraten von Proteinen mit regulatorischer Funktion durch die gezielte Degradation, dient der Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen. Verschiedene Regulatoren der Stressantwort, der Zellzykluskontrolle und der Differenzierung werden durch die ClpP-vermittelte Proteolyse kontrolliert (zur Übersicht: Hengge & Bukau, 2003; Jenal & Hengge-Aronis, 2003; Ehrman & Clausen, 2004). In *B. subtilis* wird die Kompetenzentwicklung und Sporulation durch gezielte Degradation von ComK und SpoIIAB reguliert. Ein weiteres Beispiel für ein ClpP-Substrat mit regulatorischer Aktivität stellt der alternative Sigma-Faktor RpoS in *E. coli* dar, der die Expression von Genen kontrolliert, deren Produkte für die Anpassung an Mangelbedingungen in der stationären Wachstumsphase benötigt werden (Hengge-Aronis, 2002). In *C. crescentus* wird die Halbwertszeit des Zellzyklus-Regulators CtrA durch ClpP bestimmt (Jenal & Fuchs, 1998). Auch verschiedene Regulatoren der Stressantwort, wie CtsR und Spx in *B. subtilis* (Krüger *et al.*, 2001; Nakano *et al.*, 2002b), LexA in *E. coli* (Neher *et al.*, 2003) und das LexA-homologe Protein HdiR in *L. lactis* (Savijoki *et al.*, 2003) unterliegen der Regulation durch die ClpP-vermittelte Degradation. Die gezielte Proteolyse von Proteinen und der damit verbundene Einfluss auf die Genexpression sind dennoch nicht vollständig geklärt.

Die in ihrer Expression von der *clpP*-Deletion betroffenen Gene in *S. aureus* 8325 sollten übergeordneten Transkriptionsregulatoren zugeordnet werden. Dazu wurde auf bekannte und konservierte Operatorsequenzen verschiedener Regulatoren zurückgegriffen. In einem computerunterstützten Ansatz wurden die Upstreambereiche der betroffenen Gene auf das Vorhandensein konservierter DNA-Motive analysiert (3.4). Da für *S. aureus* nur wenige Erkenntnisse über die Regulation der Genexpression vorliegen, ist die Einschätzung der Regulons auf der Basis von Sequenzvergleichen nur ein Mittel für die Identifizierung potenzieller Mitglieder eines Regulons, deren Zugehörigkeit im Einzelnen erst noch experimentell bewiesen werden muss.

Ergebnisse

Tabelle 7 Übersicht der mittels Transkriptomanalyse der $\Delta clpP$ -Mutante identifizierten deregulierten Transkriptionsregulatoren

S. aureus N315			putative Transkriptionseinheit (5'-3')¹	Wt/ $\Delta clpP$²
ORF	Gen	Beschreibung		
erhöhte Transkriptionsrate in $\Delta clpP$:				
SA0017	<i>vicR</i>	two-component RR	<i>vicR</i> (0.5)- <i>vicK</i> (0.4)	0.5
SA2418 -	HP,	similar to two-component RR	SA2418(0.5)-SA2417(0.4)	0.4
SA0480	<i>ctsR</i>	repressor of class III stress genes	<i>ctsR</i> (0.3)-SA0481(0.1)-SA0482(0.1)- <i>clpC</i> (0.1)	0.3
SA1411	<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcriptional repressor	<i>hrcA</i> (0.4)- <i>grpE</i> (0.4)- <i>dnaK</i> (0.3)- <i>dnaJ</i> (0.3)	0.4
SA1174	<i>lexA</i>	SOS regulatory LexA protein		0.4
SA0573	<i>sarA</i>	staphylococcal accessory regulator A		0.4
SA2286	<i>sarT</i>	SarA homologue		0.5
SA1041	<i>pyrR</i>	pyrimidine operon repressor chainA	<i>pyrR</i> (0.5)- <i>pyrP</i> (0.4)- <i>pyrB</i> (0.4)- <i>pyrC</i> (0.4)- <i>pyrAA</i> (0.4)- <i>pyrAB</i> (0.5)- <i>pyrF</i> (0.5)- <i>pyrE</i> (0.4)	0.5
SA1098	<i>codY</i>	transcription pleiotropic repressor CodY		0.5
SA1139	<i>glpP</i>	glycerol uptake operon antiterminator		0.5
SA1897 -	HP,	similar to transcriptional activator TenA	SA1897(0.3)- <i>thiD</i> (0.4)- <i>thiM</i> (0.5)- <i>thiE</i> (0.4)	0.3
SA2320 -	HP,	similar to regulatory protein PfoR	SA2320(0.3)-SA2319(0.4)-SA2318(0.2)	0.3
SA0298 -	HP,	similar to regulatory protein PfoR		0.5
verminderte Transkriptionsrate in $\Delta clpP$:				
SA0250	<i>lytS</i>	two-component sensor HK	<i>lytS</i> (2.1)- <i>lytR</i> (2.1)	2.1
SA0641	<i>rat</i>	HP, similar to transcriptional regulator		3.8
SA1248	<i>arlR</i>	two-component RR	<i>arlR</i> (3.6)- <i>arlS</i> (2.1)	3.6
SA1843	<i>agrC</i>	accessory gene regulator C	<i>agrB</i> (n.d.)- <i>agrD</i> (n.d.*)- <i>agrC</i> (2.4)- <i>agrA</i> (1.8)	2.4
SA2180	<i>nreB</i>	HP, similar to two-component HK	<i>nreA</i> (3.1)- <i>nreB</i> (3.2)- <i>nreC</i> (2..4)	3.2
SA1869	<i>sigB</i>	sigma factor B	<i>rsbU</i> (4.2)- <i>rsbV</i> (n.d.*)- <i>rsbW</i> (4.5)- <i>sigB</i> (4.1)	4.1
SA2089	<i>sarR</i>	SarA homologue		2.3
SA0454	<i>purR</i>	pur operon repressor homologue		2.1
SA1509 -	COG1327: Predicted transcriptional regulator, Zn-ribbon, ATP-cone domains			2.4
SA0322 -	HP, similar to transcription regulator, MarA family		SA0322 (3.5)- <i>svrA</i> (2.8)	3.5
SA1748 -	HP, similar to transcription regulator, GntR family		SA1748(2.6)-SA1747(n.d.*)-SA1746(2.1)-SA1745(2.3)-SA1744(2.2)	2.6
SA2108 -	HP, similar to transcription regulator, RpiR family			2.0
SA1801 -	anti repressor			4.3

1: Die Werte in den Klammern stehen für die Signalquotienten weiterer Gene in einer putativen Transkriptionseinheit (siehe auch Anhang 7.2). **2:** CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **3:** Der Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante >2 bedeutet in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 in der Mutante erhöht exprimiert.

4.1.2.3. Einfluss der *clpP*-Deletion auf die Hitzeschock-Genexpression

In der $\Delta clpP$ -Mutante ist eine Reihe von Genen, die der Kategorie „postranslationale Modifikation, Protein-Umsatz und Chaperonfunktion“ zugeordnet werden, deutlich in ihrer Expression erhöht. Das Fehlen von ClpP führt zur Akkumulation fehlerhafter Proteine und somit zu einer Erhöhung der Expression von Genen, die in die Hitzeschockantwort involviert sind. Dabei handelt es sich um Gene für Proteasen und

Ergebnisse

Chaperone, die unter der Kontrolle der Repressoren HrcA und CtsR stehen (Tabelle 8). Unter Normalbedingungen ist CtsR der Repressor der Transkription des *ctsR*-SA0481-SA0482-*clpC*-Operons, von *clpP*, *clpB* und des HrcA-Regulons (*hrcA*-*grpE*-*dnaK*-*dnaJ*- und *groES*-*groEL*). In der $\Delta clpP$ -Mutante ist die Transkription dieser Gene, mit Ausnahme von *clpP* dereprimiert. Die Sequenz von *groES* ist nicht auf dem Microarray repräsentiert, für *groEL* lässt sich aber eine Erhöhung der Transkriptionsrate nachweisen. Es wurden keine weiteren diesen Regulons zuzuordnenden Gene durch die Suche der bekannten CtsR- und HrcA-Operatorsequenzen identifiziert.

Tabelle 8 Überblick der in der $\Delta clpP$ -Mutante durch CtsR und HrcA kontrollierten Gene.

<i>S. aureus</i> N315-Operon ¹	Lage ²	CtsR-Motiv	Lage ²	HrcA-Motiv
<i>ctsR</i> ^a (0.3)- <i>mcsA</i> (0.1)- <i>mcsB</i> (0.1)- <i>clpC</i> (0.1)	-15(+)	AGTCAAAGAAGGTCAAA		
<i>clpP</i> ^a	-48(-)	AGTCAAATTTGGTCAAA		
<i>clpB</i> ^a (0.04)	-48(+)	GGTCAAAGAAAAGTCAAA		
<i>hrcA</i> ^b (0.4)- <i>grpE</i> (0.4)- <i>dnaK</i> (0.3)- <i>dnaJ</i> (0.3) <i>groES</i> ^{a,b} - <i>groEL</i> (0.4)	-57(-)	GGTCAAAGTAAGTCAAT	-12(-)	TTAGCACTCACTTATCTCAAGTGCTAA
	-70(-)	AAATCAAATTTGGTCAAA	-28(-)	TTAGCACTTAACATTAAGAGTGCTAA
		gTCAAA GTCAaa		TTAGCACT A T AGTGCTAA
Konsensus <i>B. subtilis</i> ^c		RGTCAANWNRGTCAAA		TTAGCACTC -N ₉ - GAGTGCTAA

1: Der Signalquotient $Wt/\Delta clpP$ ist hinter dem jeweiligen Gen einer Transkriptionseinheit in Klammern angegeben: >2 steht für verminderte und <0.5 für erhöhte Transkription in der $\Delta clpP$ -Mutante; Signal von *clpP* aufgrund von Deletion nicht auswertbar, *groES* ist nicht auf dem N315-Full-Genom-Chip repräsentiert. Beschriebene CtsR- und HrcA-DNA-Motive nach: a: (Frees *et al.*, 2004), b: (Chastanet *et al.*, 2003), c: (Derre *et al.*, 1999). 2: Entfernung zum Translationsstartpunkt in Bp, in Klammern ist die relative Orientierung (+/-) des DNA-Motivs zu der Leserichtung des Gens angegeben.

Die Expression weiterer Gene der Hitzeschockantwort ist überwiegend erhöht. Dabei handelt es sich um Gene der Proteasen und Chaperone *clpX*, *ftsH*, SA0470 (kodiert für ein HSP33-homologes Protein), *htrA2* (SA1549). Ebenfalls eine erhöhte Transkriptmenge zeigen die Gene des Thioredoxin-Systems (*trxA*, *trxB*) und drei weitere hypothetische ORFs, die für Thioredoxin-Reduktase-homologe Proteine kodieren: SA1311, SA2162 und SA2370. Auch die Transkription der Reduktasegene *ahpCF* und *nfrA* (*ywcG*) ist erhöht. Demgegenüber weisen SA0755 (*gsp170*-homolog, σ^B -abhängig) und SA2197 (putative Protein-Disulfid Isomerase) eine erniedrigte Transkriptmenge auf.

4.1.2.4. Vergleich der in *B. subtilis* Spx-regulierten Gene mit differenziell transkribierten Genen in *S. aureus* 8325 Δ *clpP*

In *B. subtilis* wurde das Protein Spx als ClpXP-Substrat identifiziert (Nakano *et al.*, 2003b). Eine Mutation in dem Gen *spx* (*yjbD*) führte zu der Untedrückung des Defekts in der Kompetenzentwicklung von *clpX*- und *clpP*-Mutanten (Nakano *et al.*, 2002b). Spx ist ein Transkriptionsregulator, der mit der α -Untereinheit des RNA Polymerase-Komplexes (RNAP) interagiert und die Expression verschiedener Zielgene beeinflusst. Spx wird unter Normalbedingungen von ClpXP degradiert und akkumuliert unter Stressbedingungen (Nakano *et al.*, 2003b). Spx zeichnet sich durch Besitz einer gegenüber Oxidation sensitiven Zinkfinger-Domäne (CXXC-Motiv) aus (Nakano *et al.*, 2003b). Die Oxidation der Thiol-Gruppen führt zu der Bildung von Disulfidbrücken, wodurch die Affinität von Spx zu der α -Untereinheit der RNAP erhöht wird und aktiviert die Transkription bestimmter Zielgene. Spx selbst geht dabei keine direkte Bindung mit der DNA ein, und konservierte Erkennungssequenzen sind nicht bekannt. In *L. lactis* führte die Inaktivierung eines *yjbD*-orthologen Gens zu der Vermittlung der Hitze-Resistenz in *recA*-Mutanten zu der Unterdrückung der Effekte der *clpP*-Mutation, indem es zu einem allgemeinen Anstieg der proteolytischen Aktivität führte (Duwat *et al.*, 1999; Frees *et al.*, 2001). *spx*-orthologe Gene sind in grampositiven Bakterien weit verbreitet und auch in *S. aureus* wurde ein entsprechendes Gen identifiziert (SA0856) (Zuber, 2004). Möglicherweise können die deutlichen Veränderungen im Transkriptionsprofil der *S. aureus* Δ *clpP*-Deletionsmutante zum Teil auf eine veränderte Spx-Aktivität zurückzuführen sein. Durch den Vergleich der Microarray-Daten zum Einfluss von Spx auf die Genexpression in *B. subtilis* und der in dieser Arbeit erhaltenen Δ *clpP*-Transkriptomdaten, sollten mögliche Schlüsse auf den Einfluss von Spx in *S. aureus* ermöglicht werden (Nakano *et al.*, 2003a). Für einen Vergleich der deregulierten Gene zwischen den beiden Bakterienarten wurde auf die Einordnung der Gene in COG-Kategorien zurückgegriffen (siehe Tabelle 9). Hierdurch konnten einige deutliche Übereinstimmungen der Daten ermittelt werden. Insgesamt zeigen 26 der ClpP-abhängigen Gene eine übereinstimmende Regulation mit den in *B. subtilis* Spx-kontrollierten Genen, davon 20 potenziell Spx-induziert sowie sechs Spx-inhibiert. Zu den in ihrer Transkription erhöhten Genen gehören das Thioredoxin-System (*trxA*, *trxB*) sowie drei weitere *trxB*-homologe Gene (SA1311, SA2162, SA2370).

Ergebnisse

Tabelle 9 Vergleich der COG-Kategorien der von Spx-regulierten Gene in *B. subtilis* (Nakano *et al.*, 2003a) mit differenziell regulierten Genen der gleichen Gruppierung in *S. aureus* $\Delta clpP$.

COG	<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i> N315		putative Transkriptionseinheit (5'-3') ³	Wt/ $\Delta clpP$ ⁴
	Gen	ORF ¹	Gen	Beschreibung ²		
in <i>B. subtilis</i> Spx-aktiviert:						
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones						
COG0526	<i>ydbP/ ytpP/ trxA</i>	SA0992	<i>trxA</i>	thioredoxin		0.5
COG0492	<i>ycgT</i>	SA0719 ^P SA1311 SA2162 ^F SA2370	<i>trxB</i> -	thioredoxine reductase HP, similar to thioredoxin reductase		0.4 0.3 0.4 0.3
COG4862	<i>mecA</i>	SA0857	-	HP, similar to negative regulator of genetic competence MecA		0.5
Energy production and conversion						
COG1012	<i>gabD</i>	SA0162	<i>aldA</i>	aldehyde dehydrogenase homologue		0.3
COG0778	<i>ycnD</i>	SA0367	<i>ywcG/ nfrA</i>	HP, similar to nitro/flavin reductase		0.3
		SA2311	-	HP, similar to NAD(P)H-flavin oxidoreductase		0.5
COG2141	<i>ywcH</i>	SA1451	-	CHP (Coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase and related flavin-dependent oxidoreductases)		0.4
		SA0312	-	HP, similar to alkanal monooxygenase α chain		0.4
COG0372	<i>citZ</i>	SA1518	<i>citZ</i>	citrate synthase II		0.3
Carbohydrate transport and metabolism						
COG0364	<i>zwf</i>	SA1336	-	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase		0.5
Cell wall/membrane biogenesis						
COG0702	<i>yhfK</i>	SA0381	-	CHP	SA0381(0.5)- SA0380(0.5)	0.5
Amino acid transport and metabolism						
COG1164	<i>yjbG/ yusX</i>	SA0859	-	thimet oligopeptidase homologue		0.4
Coenzyme transport and metabolism						
COG0095	<i>yhfJ</i>	SA0316	-	HP, similar to lipoate-protein ligase	SA0315(0.5)- SA0316(0.4)	0.5
Lipid transport and metabolism						
COG0365	<i>ytcl</i>	SA1554	<i>acsA</i>	acetyl-CoA synthetase		0.5
Transcription						
COG0789	<i>yhdQ</i>	SA2370	-	HP, similar to transcriptional regulator, MerR family		0.5
COG0454	<i>yhcX</i>	SA2161	-	HP, attachment to host cells and virulence		0.4
COG0388						
Intracellular trafficking and secretion						
COG4473	<i>ecsB</i>	SA1654	-	HP, similar to ABC transporter <i>ecsB</i>	SA1655(0.4)- SA1654(0.5)	0.5
in <i>B. subtilis</i> Spx-inhibiert:						
Transport						
COG0436	<i>ykr</i>	SA2347	-	HP, similar to aspartate aminotransferase	SA2347(2.5)- SA2346(2.4)	2.5
COG0601	<i>oppB/ dppB</i>	SA0845	<i>oppB</i>	oligopeptide transport system permease protein	<i>oppB</i> (8.8)- <i>oppC</i> (10.7)- <i>oppD</i> (9.8)- <i>oppF</i> (10.9)- <i>oppA</i> (6.0)	8.8
COG0686	<i>ald</i>	SA1272 ^{Fn}	<i>ald</i>	alanine dehydrogenase		3.8
COG0477	<i>yoaB/ ybfB</i>	SA0531 ^B	<i>proP</i>	proline/betaine transporter homologue		2.4

Ergebnisse

COG	<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i> N315		putative Transkriptions-einheit (5'-3') ³	Wt/ $\Delta clpP$ ⁴
	Gen	ORF ¹	Gen	Beschreibung ²		
		SA2142	-	HP, similar to multidrug resistance protein	SA2143(5.9)-SA2142(5.8)	5.8
COG0577	<i>yknZ</i>	SA0617	<i>vraG</i>	ABC transporter permease	<i>vraF</i> (2.1)- <i>vraG</i> (2.4)	2.1
	unknown function					
COG0454	<i>ybf/ yxbD</i>	SA0754 ^C	-	HP, similar to lactococcal prophage ps3 protein 05		2.1
in <i>B. subtilis</i> Spx-inhibiert und in <i>S. aureus</i> 8325 $\Delta clpP$ erhöht exprimiert:						
Nucleotide transport and metabolism						
COG0540	<i>pyrB</i>	SA1043	<i>pyrB</i>	aspartate transcarbamoylase chain A	<i>pyrR</i> (0.5)-	0.4
COG0044	<i>pyrC</i>	SA1044	<i>pyrC</i>	dihydroorotase	<i>pyrP</i> (0.4)-	0.4
COG0505	<i>carA</i>	SA1045	<i>pyrAA</i>	carbamoyl-phosphate synthase small chain	<i>pyrB</i> (0.4)- <i>pyrC</i> (0.4)-	0.4
COG0284	<i>pyrF</i>	SA1047	<i>pyrF</i>	orotidine-5-phosphate decarboxylase	<i>pyrAA</i> (0.4)-	0.5
COG0461	<i>pyrE</i>	SA1048	<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	<i>pyrAB</i> (0.5)- <i>pyrF</i> (0.5)- <i>pyrE</i> (0.4)	0.4
COG0167	<i>pyrD</i>	SA2375	<i>pyrD</i>	HP, similar to dihydroorotate dehydrogenase		0.4
Amino acid transport and metabolism						
COG1732	<i>opuCC</i>	SA2235	<i>opuCC</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter	<i>opuCA</i> (0.4)- <i>opuCB</i> (0.3)-	0.2
COG1174	<i>opuCB</i>	SA2236	<i>opuCB</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter	<i>opuCC</i> (0.2)- <i>opuCD</i> (0.3)	0.3
COG0477	<i>yoaB/ ybfB</i>	SA0263	-	HP, similar to proton antiporter efflux pump		0.5
		SA1982 ^F	<i>feoB2</i>	HP, similar to transporter	SA1982(0.4)-SA1981(0.3)-SA1980(0.3)	0.4
others						
COG0656	<i>ytbE</i>	SA2001 ^F	-	HP, similar to oxidoreductase		0.5
in <i>B. subtilis</i> Spx-aktiviert und in <i>S. aureus</i> 8325 $\Delta clpP$ vermindert exprimiert:						
Energy production and conversion						
COG1012	<i>gabD</i>	SA0143 ^{Fn}	<i>adhE</i>	alcohol-acetaldehyde dehydrogenase		6.0
COG2190	<i>ypqE</i>	SA0255	-	HP, similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme II, ABC component	SA0255(3.2)- <i>bgIA</i> (2.1)	3.2
Amino acid transport and metabolism						
COG3104	<i>yclF</i>	SA0682 ^Y	-	HP, similar to di-tripeptide ABC transporter		3.1
others						
COG0628	<i>yubA</i>	SA0870	-	CHP (predicted permease)		2.3
COG0693	<i>yraA</i>	SA1692 ^B	-	CHP (putative intracellular protease/amidase) (Csb3)		2.7
COG0702	<i>yhfK</i>	SA1946 ^B	-	CHP (Csb9)		2.9
COG1028	<i>yvrD/ yoxD/SA2119^B</i>		-	HP, similar to dehydrogenase (Csb28)		2.3
	<i>ytkK</i>					

1: Zusätzliche putative Regulatoren basierend auf identifizierten konservierten DNA-Motivenn: **Y**: YycFG (vgl. 4.1.2.10, Tabelle 15); **B**: σ^B (vgl. 4.1.2.5, Tabelle 14); **C**: *cre*-Element (vgl. 4.1.2.13, Tabelle 18); **Fn**: Fnr/ArcR (vgl. 4.1.2.11, Tabelle 16), **F**: Fur-reguliert (vgl. 4.1.2.5, Tabelle 10), **P**: PerR (vgl. 4.1.2.6, Tabelle 11). **2**: CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **3**: Die Werte in den Klammern stehen für die Signalquotienten weiterer Gene in einer putativen Transkriptionseinheit (siehe auch Anhang 7.2). **4**: Der Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante >2 bedeutet in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 erhöht exprimiert.

4.1.2.5. Identifizierung potenziell Fur-regulierter Gene in $\Delta clpP$

In *B. subtilis* und *S. aureus* wird die Expression der Gene der Metallionen-Aufnahme und -Einlagerungssysteme durch die drei Fur-homologen Repressoren, Fur, PerR und Zur sowie den DtxR-homologen Regulator MntR kontrolliert. In *S. aureus* reprimiert Fur mit Fe^{2+} als Kofaktor die Expression der Gene *sirABC*, *fhuD*, *sstABCD* und *orf4* in Anwesenheit hoher Eisenkonzentrationen sowie unter oxidativen Stressbedingungen (Xiong *et al.*, 2000; Horsburgh *et al.*, 2001b). Fur-regulierte Gene verfügen über eine konservierte Fur-Erkennungssequenz im Upstreambereich (Fur-Box). Für die Suche von potenziell Fur-kontrollierten Genen in *S. aureus* 8325 $\Delta clpP$ wurde die für *S. aureus* und *B. subtilis* postulierte Fur-Box (GATAATGATWATCATTATC) eingesetzt (Horsburgh *et al.*, 2001b; Baichoo *et al.*, 2002). Es wurden insgesamt zwölf Gene mit erhöhter Expression mit putativer Fur-Box in der $\Delta clpP$ -Mutante identifiziert. Darunter befinden sich die von Horsburgh *et al.* postulierten potenziell Fur-abhängigen Gene der homologen Eisen-Transporter FeoB und FeoB2 sowie des Thioredoxin Reduktase-homologen Proteins (SA2162)(Horsburgh *et al.*, 2001b). Die erhöhte Transkription der identifizierten Gene weist auf eine zumindest teilweise Inaktivierung der Fur-Repressor-Aktivität in der $\Delta clpP$ -Mutante hin.

Tabelle 10 Überblick der potenziell Fur-regulierten Gene in 8325 $\Delta clpP$

<i>S. aureus</i> N315		putative Transkriptionseinheit (5'-3') ³	Wt/ $\Delta clpP$ ⁴	Lage ⁵	putative Fur-Box
ORF ¹	Gen Beschreibung ²				
SA0162 ^C	<i>aldA</i> aldehyde dehydrogenase homologue		0.3	-234(-)	CTTCGAGAAATAATTCATTAA
SA0263	- HP, similar to proton antiporter efflux pump		0.5	-118(-)	ATTGAGAAATGAAATCAATTAA
SA0312	HP, similar to alkanal monooxygenase alpha chain		0.4	-89(+)	ATTGAAAACGTTATCATATAC
SA0605	HP, similar to dihydroxyacetone kinase	SA0605(0.5)-SA0606(0.4)-SA0607(0.4)		1(+)	GATGAAAAGTAAATCAATAAA
SA1173	- CHP		0.4	29(-)	AATGATAAATAATTCGATAAAAAC
SA1979	- HP, similar to ferrichrome ABC transporter		0.4	-41(-)	ATTGATAACAATTAATCATTGTC
SA1982 ^F	<i>feoB2</i> HP, similar to transporter	SA1982(0.4)-SA1981(0.3)-SA1980(0.3)	0.4	-24(+)	AATGATAATGATTCATTATTATC
SA2001	- HP, similar to oxidoreductase, aldo/keto reductase family		0.5	-135(+)	ATTGATAAATTAATGATAATCATA
SA2162 ^F	- HP, similar to thioredoxin reductase		0.4	-92(+)	ATTGATAAATTAATTAATCATTAA
SA2337 ^F	<i>feoB</i> ferrous iron transport protein		0.3	-20(+)	AGTGAATAATGATTAATTAATTCT
SA2353 ^Y	- HP, similar to secretory antigen precursor SsaA		0.4	-307(-)	TTTGAATAATAAATCAAGAAGT

Ergebnisse

<i>S. aureus</i> N315			putative	Wt/	Lage ⁵	putative Fur-Box
ORF ¹	Gen	Beschreibung ²	Transkriptions- einheit (5'-3') ³	$\Delta clpP^4$		
SA2399	<i>fda</i>	fructose-bisphosphate aldolase homolog I		0.5	-45(-)	AAATGAGAACATTTCTCAAGTCA
Fur-Konsensus: <i>B. subtilis</i> (Baichoo <i>et al.</i> , 2002)						TGA AA tt t A GATAATGATWATCATTATC
<i>S. aureus</i> (Horsburgh <i>et al.</i> , 2001b)						GATAATgATTaTcATTatc

1: Weitere potenzielle Regulatoren aufgrund von konservierten DNA-Motiv: **Y:** YycFG (vgl. 4.1.2.10, Tabelle 15); **F:** Fur-reguliert nach (Horsburgh *et al.*, 2001b); **C:** *cre*-Element (vgl. 4.1.2.13, Tabelle 18)
2: CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **3:** Die Werte in den Klammern stehen für die Signalquotienten weiterer Gene in einer putativen Transkriptionseinheit (siehe auch Anhang 7.2). **4:** Der Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante >2 bedeutet in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 erhöht exprimiert; „up“ bedeutet im Microarray-Experiment nicht auswertbar, erhöhte Transkription mittels RT-PCR bestätigt (4.1.2.14). **5:** Die Entfernung zum putativen Translationsstartpunkt in Basen; +/- in Klammern gibt die Orientierung der Bindungssequenz relativ zur Leserichtung des Gens an.

4.1.2.6. Identifizierung potenziell PerR-regulierter Gene in $\Delta clpP$

In *S. aureus* reguliert PerR als ein Mn-abhängiger Repressor Gene, die für antioxidante Proteine kodieren (KatA, AhpCF, Bcp, TrxB, Ftn), das Ferritin-ähnliche Dps-Homolog MrgA sowie die Regulatoren Fur und PerR selbst (Horsburgh *et al.*, 2001b). Um den Einfluss der *clpP*-Deletion auf die Expression der Gene des PerR-Regulons zu analysieren wurde die von Horsburgh *et al.* postulierte PerR-Konsensussequenz in den Upstreambereichen der deregulierten Gene eingesetzt (Horsburgh *et al.*, 2001a). Es konnten zwölf Gene mit veränderter Transkriptionsrate in der $\Delta clpP$ -Mutante identifiziert werden. Davon weisen zehn Gene eine erhöhte und zwei eine verminderte Transkriptmenge auf. Die bereits beschriebene PerR-kontrollierte Genexpression von *ahpCF*, *nfrA* und *trxB* (Horsburgh *et al.*, 2001a; Streker *et al.*, 2005) weist auf eine Inaktivierung der PerR-Repressorfunktion hin. Die Transkription des Gens *ftnA* ist jedoch vermindert, sodass eine unvollständige Derepression des PerR-Regulons oder zusätzliche Regulationsmechanismen nicht ausgeschlossen werden können.

Tabelle 11 Überblick der potenziell PerR-regulierten Gene in der $\Delta clpP$ -Mutante

<i>S. aureus</i> N315			putative	Wt/	Lage ⁵	putative PerR-Box
ORF ¹	Gen	Beschreibung ²	Transkriptions- einheit (5'-3') ³	$\Delta clpP^4$		
SA0230	-	CHP	SA0230(n.d.)- SA0229(0.4)	0.4	-238(-)	AAATTAAATTATTATTTT
SA0298	-	HP, similar to regulatory protein PfoR		0.5	-118(-)	ATAATAATTATTATTA
SA0366 ^{L,P}	<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxide reductase subunit F	<i>ahpC</i> (0.3)- <i>ahpF</i> (0.4)	0.3	-59(+)	ATTAGAATTATTATAAT
SA0367 ^P	<i>nfrA</i> / <i>ywcG</i>	HP, similar to nitro/flavin reductase		0.3	-93(+)	AGTTCAATTATTAACTT
SA0719 ^P	<i>trxB</i>	thioredoxine reductase		0.4	-634(+)	CATATAATTATTATAT

Ergebnisse

<i>S. aureus</i> N315			putative Transkriptions- einheit (5'-3') ³	Wt/ $\Delta clpP^4$	Lage ⁵	putative PerR-Box
ORF ¹	Gen	Beschreibung ²				
SA0891 ^L	-	HP, similar to ferrichrome ABC transporter		0.5	-390(+)	AGATTAATTATTAAATA
SA0914	<i>chiB</i>	HP, similar to chitinase B		2.8	-137(-)	GAAATAATTATTATTT
SA1268	<i>ebhB</i>	HP, similar to streptococcal adhesin <i>emb</i>	<i>ebhB</i> (n.d.)- <i>ebhA</i> (0.5)	0.5	-252(+)	TTTATAATTATTATAAA
SA1407	-	CHP		0.3	15(+)	CTTTCAATTATTATTAA
SA1617	-	HP, similar latent nuclear antigen	SA1617(0.1)- SA1618(0.1)- SA1619(0.3)- SA1620(n.d.)- SA1621(0.4)	0.1	-191(+)	TTTACAATTATTAAAT
SA1709	<i>ftnA</i>	HP, similar to ferritin		3.1	-77(+)	ATTATAATTATTATTAT
SA1897 ^C	-	HP, similar to transcriptional activator TenA	SA1897(0.3)- <i>thiD</i> (0.4)- <i>thiM</i> (0.5)- <i>thiE</i> (0.4)	0.3	-261(+)	TATAGAATTATTATTTA
<u><i>S. aureus</i> PerR Konsensus^P</u>						AtTAtAATTATTAtaAT

1: Zusätzliche potenzielle Regulatoren aufgrund von konservierten DNA-Motiven: **P:** potenziell PerR-reguliert in *S. aureus* nach (Horsburgh *et al.*, 2001b; Streker *et al.*, 2005), **L:** LexA (vgl. 4.1.2.8, Tabelle 13), **C:** *cre*-Element (vgl. 4.1.2.13, Tabelle 18). **2:** CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **3:** Die Werte in den Klammern stehen für die Signalquotienten weiterer Gene in einer putativen Transkriptionseinheit (siehe auch Anhang 7.2). **4:** Der Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante >2 bedeutet in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 in der Mutante erhöht exprimiert; „up“ bedeutet im Microarray-Experiment nicht auswertbar, aber erhöhte Transkription mittels RT-PCR bestätigt (4.1.2.14). **5:** Die Entfernung zum putativen Translationsstartpunkt in Basen; +/- in Klammern gibt die Orientierung der Sequenz relativ zur Leserichtung des Gens an.

4.1.2.7. Identifizierung potenziell MntR-regulierter Gene in $\Delta clpP$

In *S. aureus* wird die Expression der Gene der Manganaufnahme-Systeme in Abhängigkeit der oxidativen Bedingungen und der Manganverfügbarkeit durch den bifunktionalen Regulator MntR kontrolliert. Die Expression der Gene *mntABC* wird unter Bedingungen mit hohen Mangankonzentrationen aktiviert, während die Expression von *mntH* reprimiert wird (Horsburgh *et al.*, 2002b; Ando *et al.*, 2003). Das Metall Mangan kann einerseits toxisch auf die Zelle wirken, andererseits verfügt es über antioxidante Eigenschaften, sodass die Manganaufnahme unter oxidativen Stressbedingungen detoxifizierend wirkt. Die durch MntR vermittelte intrazelluläre Verfügbarkeit von Mangan als Kofaktor führt zu der Repression des PerR-Regulons. In der $\Delta clpP$ -Mutante weisen die Gene *mntABC* und *mntH* eine veränderte, gegenläufige Expression auf, die auf eine Regulation durch den aktiven Regulator MntR zurückgeführt werden kann (Tabelle 12). Ein weiteres Operon (SA1437-SA1432) verfügt im Upstreambereich über eine ähnliche, potenzielle MntR-Erkennungssequenz und wird in der $\Delta clpP$ -Mutante vermindert transkribiert. Das Gen SA1432 kodiert für

Ergebnisse

ein Gen mit Homologien zu NRAMP-Transportern, die spezifisch für die Metallionenaufnahme sind.

Tabelle 12 Überblick der potenziell MntR-regulierten Gene in der $\Delta clpP$ -Mutante

S. aureus-N315					
ORF¹	Gen	Wt/$\Delta clpP^2$	Lage³	MntR-Bindungssequenz	
SA0956*	<i>mntH</i>		-47(+)	AAAT TAAA TAAA TTTAGGTTGACCTAAACATTTTATTAGGTTATTATATTTGT	
SA0956 ^{M*} (8325)	<i>mntH</i>	0.5	-47(+)	AAAT TAAA TAAA TTTAGGTTGGCCTAAACATTTTATTAGGTTATTATATTTGT	
SA0589 ^M	<i>mntABC</i>	2.5-4.4	-22(+)	TAT TAT TCAATTAATTTAGGTTAGCCTAAACTTTTAATTAGGAGGTATAACCGT	
SA1437-SA1432		3.2-6.5	-183(-)	ACTCTTACACTAATTTAGGTTCTGCTATCATTCGGTCTGATGGAAAAATTTTA	
<i>S. epidermidis sirR</i> (Hill <i>et al.</i> , 1998)				TAT TAT TAAA TAAA TTTAGGTTAACTAAACTTTTATTAGGAGGTTTAAATAT	
DtxR Konsensus (Lee <i>et al.</i> , 1997)				TTAGGTTAGCCTAAA	

1: M: MntR-Bindungssequenz nach (Horsburgh *et al.*, 2002b). *:Die MntR-Erkennungssequenz im *S. aureus*-Stamm N315 weicht in einer Base von der Sequenz im Stamm 8325 ab. **2:** Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante >2 bedeutet in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 in der Mutante erhöht exprimiert. **3:** Die Entfernung zum putativen Translationsstartpunkt in Basen; +/- in Klammern gibt die Orientierung der Sequenz relativ zur Leserichtung des Gens an.

4.1.2.8. Identifizierung potenziell LexA-regulierter Gene in $\Delta clpP$

LexA ist der Repressor von Genen, deren Produkte für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich sind. Die Proteine LexA in *E. coli* sowie der LexA-homologe Repressor HdiR sind Substrate für die ClpP-vermittelte Proteolyse (Flynn *et al.*, 2003; Neher *et al.*, 2003; Savijoki *et al.*, 2003). In *S. aureus* wurde eine LexA-abhängige Regulation der Expression der Fibronectin-bindenden Proteine nachgewiesen (Bisognano *et al.*, 2003). Für die Beurteilung des Einflusses der *clpP*-Deletion auf die Expression potenziell LexA-regulierter Gene in *S. aureus*, wurde die in *B. subtilis* konservierte Konsensussequenz des LexA-homologen Repressors DinR (CGAACRNRYGTTCG) eingesetzt (Winterling *et al.*, 1998). Ohne Variation der Basenfolge konnte kein putatives LexA-Bindungsmotiv im N315-Genom identifiziert werden. Daher wurden größere Variationen unter besonderer Berücksichtigung des palindromen Sequenzmotivs GAAC-N₄-GTTC zugelassen. Die Transkriptmenge der beiden bislang einzigen experimentell bestätigten LexA-kontrollierten Gene *recA* und *fnbB* ist jeweils in der $\Delta clpP$ -Mutante erhöht (Bisognano *et al.*, 2003). Die als putativ LexA-regulierten Gene *lexA*, *umuC* und *uvrA* sind ebenfalls in der Expression erhöht (Bisognano *et al.*, 2003; Alkema *et al.*, 2004). Weitere Gene, die zusätzlich dem PerR-Regulon zugeordnet werden können, verfügen über ein LexA-DNA-Motiv. Dazu zählen *ahpC*, dessen Transkription von PerR kontrolliert wird und der ORF SA0891, kodiert für einen Eisen-ABC-Transporter (4.1.2.6). Da die Microarray-Hybridisierungsexperimente zu nicht reproduzierbaren Signalintensitäten für das Gen *fnbB* führten, wurde die Transkriptmenge mittels RT-PCR überprüft und als erhöht bestimmt

Ergebnisse

(4.1.2.14). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Analyse auf eine Derepression des LexA-Regulons hin.

Tabelle 13 Überblick der potenziell LexA-regulierten Gene in 8325 Δ *clpP*

<i>S. aureus</i> N315			putative Transkriptions- einheit (5'-3') ³	Wt/ Δ <i>clpP</i> ⁴	Lage ⁵	putative LexA- Bindungssequenz	Ref. ⁶
ORF ¹	Gen	Beschreibung ²					
SA0366 ^P	<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxide reductase subunit F	<i>ahpC</i> (0.3)- <i>ahpF</i> (0.4)	0.3	-308(+)	CGAACAAATATTCT	
SA0714	<i>uvrA</i>	exinuclease ABC subunit A		0.4	-65(+)	CGAAAGATTTTAGAT	a, b
SA0891 ^P	-	HP, similar to ferrichrome ABC transporter		0.5	-354(+)	TGAACAAATTGTTGT	
SA0993	<i>uvrC</i>	exinuclease ABC subunit C		0.5	-79(+)	CGAAGATGTTGATT	
SA1128	<i>recA</i>	RecA		0.4	-86(+)	CGAACAAATATTTCG	a, b
					-129(-)	CGAACAAACGTGCT	
SA1174	<i>lexA</i>	SOS regulatory LexA protein		0.4	-58(+)	CGAACAAATGTTTG	a, b
SA1180	-	HP, similar to exonuclease SbcD		0.5	-15(+)	CGAACAAATGTTCT	
SA1196	<i>umuC</i>	HP, similar to DNA-damage repair protein		0.5	-35(-)	CGAACACCGTGTTC	a
SA2090 ^Y	<i>fnbB</i>	fibronectin-binding protein homolog		up	-58(+)	CGAACAAATATAGAA	a
					-86(-)	TGAAAAAAGCGAG	
SA2291	<i>fnb</i>	fibronectin-binding protein homolog		up	-59(+)	CGAACAAATATAGAC	
SA2375	-	HP, similar to dihydroorotate dehydrogenase		0.4	-223 (-)	TGAACAAATGTTTAG	
SA2473	-	HP		0.4	-205(-)	TGAACGTTGGTTAC	
						cGAACaa	
		<i>S. aureus</i> LexA				GAAC N4 GTTC	b
		<i>B. subtilis</i> DinR (Cheo-Box)				cGAACrnryGTTYg	d

1: Weitere potenzielle Regulatoren aufgrund von konservierten DNA-Motiven: **Y:** YycFG (vgl. 4.1.2.10, Tabelle 15); **P:** PerR (vgl. 4.1.2.6, Tabelle 11). **2:** CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **3:** Die Werte in den Klammern stehen für die Signalquotienten weiterer Gene in einer putativen Transkriptionseinheit (siehe auch Anhang 7.2). **4:** Signalquotient Wildtyp/ Δ *clpP*-Mutante >2 bedeutet in der Δ *clpP*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert, <0.5 in der Mutante erhöht exprimiert; „up“ bedeutet im Microarray-Experiment nicht auswertbar, aber erhöhte Transkription mittels RT-PCR bestätigt (4.1.2.14). **5:** Entfernung zum putativen Translationsstartpunkt in Basen; +/- in Klammern gibt die Orientierung der Bindungssequenz relativ zur Leserichtung des Gens an. **6:** Beschriebene LexA-Bindungssequenz: a: (Alkema *et al.*, 2004), b: (Bisognano *et al.*, 2003), c: (Cheo *et al.*, 1991), d: (Winterling *et al.*, 1998).

4.1.2.9. Identifizierung potenziell σ^B -abhängiger Gene in Δ *clpP*

Die Microarray-Ergebnisse ergaben eine vierfache Erniedrigung der Transkription der Gene des *sigB*-Operons in der Δ *clpP*-Mutante (Tabelle 7). Das *sigB*-Operon setzt sich aus den Genen *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB* zusammen, wobei das Gen *rsbV* auf dem eingesetzten Chip fehlt. Die Transkription der Gene wird durch einem σ^A -abhängigen Promotor stromaufwärts von *rsbU* kontrolliert. Eine weitere σ^B -abhängige Promotorsequenz befindet sich innerhalb des Operons, stromaufwärts von *rsbV*, die eine transkriptionelle Autoregulation der Expression von *rsbV*, *rsbW* und *sigB* ermöglicht. Die Transkriptionsstartpunkte sind bislang nicht experimentell bestätigt.

Ergebnisse

Für die computerunterstützte Suche nach σ^B -abhängigen Promotorsequenzen wurde die von Gertz *et al.* für *S. aureus* ermittelte SigB-Konsensus Sequenz (GTTTWW-N₁₂₋₁₅-GGGTAT) zugrunde gelegt (Gertz *et al.*, 2000): Es wurden nicht mehr als drei Abweichungen in der Basenfolge zugelassen und, falls nicht anders beschrieben, eine maximale Entfernung von 400 Bp zum Translationsstartpunkt nicht überschritten.

Tabelle 14 Potenziell σ^B -regulierte Gene in der $\Delta clpP$ -Mutante

<i>S. aureus</i> N315			Wt/ $\Delta clpP^3$	putative Transkriptions- einheit (5'-3') ⁴	Lage ⁵	putative σ^B - Promotorsequenz			Ref. ⁶
ORF ¹	Gen	Beschreibung ²				-35	N	-10	
verminderte Transkriptionsrate in $\Delta clpP$:									
SA0010	<i>azlC</i>	HP, similar to amino acid permease	3.1		-74	GTCTAA	12	GGGTAT	
SA0286	-	CHP	2.0	SA0286(2.0)- SA0287(2.0)- SA0288(2.1)- SA0289(2.3)- SA0290(2.0)- SA0291(2.7)- SA0292(2.2)	-302	GCTTAA	12	GGGTAT	
SA0330	-	putative ribosomal-protein-serine N-acetyltransferase	3.4		-257	GATTAA	15	AGGTAT	
SA0359	-	CHP	5.0		-65	GAATAA	13	GGGTAA ^{b, g}	
SA0360	-	CHP	2.3		-46	GTTTTA	14	GGGTAC ^b	
SA0455	-	translation initiation inhibitor	2.3	SA0455(n.d.*)- <i>spoVG</i> (2.3)	-154	GTTTTAA	14	GGGTAT ^{b, g}	
SA0531	<i>proP</i>	proline/betaine transporter homolog	2.4		-146	GTTTTAA	13	GGGTAT	
SA0681	-	HP, similar to multidrug resistance protein (Csb29)	2.4		-41	GTATTA	12	GGGTAT ^{e, b}	
SA0721	-	CHP	2.2		-225	GTTTTAT	15	TGGAAA ^b	
SA0752	-	HP	4.1		-42	GTTTTAA	14	GGGTAA ^{b, g}	
SA0755	-	HP, similar to general stress protein 170	2.8		-36	GATTAA	13	GGGTAA ^b	
SA0772	-	CHP (paralogue of Csb8)	3.4		-43	GTTTAG	13	GGGTAA ^{e, b, g}	
SA1692	-	CHP (Csb3)	2.7		-38	GTTTTAA	14	GTCTAT ^e	
SA1697	-	HP, similar to protein-tyrosine phosphatase	2.3		-28	GTTTTAA	14	GGGGAT ^b	
SA1699	-	HP, similar to transporter	2.4		-124	GTTTTTA	16	GCCTAT ^b	
SA1871	<i>rsbV</i>	anti-sigmaB factor antagonist	n.d.*	<i>rsbU</i> (4.2)- <i>rsbV</i> (n.d.*)- <i>rsbW</i> (4.5)- <i>sigB</i> (4.1)	-82	GATTAG	13	GGGTAT ^{f, g, i, l}	
SA1946	-	CHP (Csb9)	2.9		-35	GTTTTTA	14	TGGTAT ^{b, e, g}	
SA1961	-	HP, transcription antiterminator BglG family	2.6	SA1961(2.6)- <i>mtlA</i> (3.2)- <i>mtlD</i> (3.4)	-288	GTTATT	14	GGGTAT ^b	
SA1984	<i>asp23</i>	alkaline shock protein 23	2.9		-114	GTTTTAA	14	GGGTAT ^{b, d, f, h, j}	
SA1986	-	HP	3.7	SA1986(3.7)- SA1985(3.1)	-139	GTTTTAA	13	GGGTAC ^{b, f}	
SA2102	-	formate dehydrogenase	2.4		-344	GTTATT	14	GGGTAT ^b	

Ergebnisse

S. aureus N315		Wt/ $\Delta clpP^3$	putative Transkriptions- einheit (5'-3')⁴	Lage⁵	putative σ^B- Promotorsequenz		Ref.⁶
ORF¹	Gen				Beschreibung²	-35	
SA2119	-	homolog HP, similar to dehydrogenase (Csb28)	2.3	-37	GATTAA	15	GGGTAA ^{b, e}
SA2170	-	HP, similar to general stress protein 26 (Csb19)	2.1	-26	GTTTAG	14	GGCTAT ^e
SA2262 ^Y	-	CHP (Csb7)	2.1	-185	GTGTGA	14	GGGTAG ^{b, e}
SA2352	-	HP	2.5	-59	GTTTAT	13	GGGAAC ^b
erhöhte Transkriptionsrate in $\Delta clpP$:							
SA0573	<i>sarA</i>	(Csb35)	0.4	-419	GATAAA	12	GGGTAT ^{a, b, c, e, j}
SA0742	<i>clfA</i>	fibrinogen-binding protein A	0.3	-41	GATTAA	13	GGGTAT ^{b, g}
SA1367 ^C	-	aminomethyl- transferase	0.4	-5	GTTTTT	12	GGGTAT
GTTTWW-N ₁₂₋₁₅ -GGGTAT ^e							

1: Zusätzliche Regulatoren aufgrund von konservierten DNA-Motiven: **Y:** YycFG (vgl. 4.1.2.10, Tabelle 15); **C:** *cre*-Element (vgl. 4.1.2.13, Tabelle 18). **2:** CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **3:** Der Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante >2 bedeutet in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 erhöht exprimiert. **4:** Die Werte in den Klammern stehen für die Signalquotienten weiterer Gene einer putativen Transkriptionseinheit (siehe auch Anhang 7.2). **5:** Entfernung zum Translationsstartpunkt (in Bp). **6:** σ^B -abhängige Promotoren: a: (Bischoff et al., 2001), b: (Bischoff et al., 2004), c: (Deora et al., 1997), d: (Gertz et al., 1999), e: (Gertz et al., 2000), f: (Giachino et al., 2001), g: (Homerova et al., 2004), h: (Kullik et al., 1998a), i: (Kullik & Giachino, 1997), j: (Miyazaki et al., 1999), k: (Nicholas et al., 1999), l: (Wu et al., 1996).

Unter den in der $\Delta clpP$ -Mutante deregulierten Genen wurden 28 putative σ^B -abhängige ORFs identifiziert, von denen 22 bereits als σ^B reguliert beschrieben sind (siehe Tabelle 14). Vier neue potenziell σ^B -regulierte Gene wurden identifiziert (*azlC*, SA0286, SA0330 und SA1367). Von den potenziell σ^B -abhängigen Genen weisen drei eine erhöhte Transkriptionsrate auf (*sarA*, *clfA*, SA1367). Die in dieser Arbeit eingesetzten Suchkriterien ermöglichten nicht die Identifikation aller von Bischoff et al. als σ^B -abhängig beschriebenen Gene im N315-Genom. In den Upstreambereichen der Gene *lytM*, SA0724, SA1898, SA1980, SA1981, SA2158, SA2447 und SA2489 konnten keine eindeutig σ^B -zugeschriebenen Promotorsequenzen erkannt werden (Bischoff et al., 2004).

Der autoregulatorische Effekt der Erniedrigung der σ^B -Aktivität sollte eine Verringerung des σ^B -Transkriptes innerhalb des *sigB*-Operons zur Folge haben (siehe Abb. 19). Da jedoch die Transkription des gesamten Operons, inklusive des σ^A -abhängigen Bereichs erniedrigt ist, weist dies auf einen „upstream“ gelegenen zusätzlichen Regulationsmechanismus hin. Die Transkription des ORFs SA1873 (*pemK*), der „upstream“ des *sigB*-Operons liegt, ist wie das gesamte Operon um das Vierfache erniedrigt. Dieses Gen gehört zu dem Alanin Racemase Operon (*alr*) (SA1868-

SA1873) (Kullik *et al.*, 1998b). Die weiteren fünf ORFs des *alr*-Operons sind in ihrer Expression jedoch nicht reguliert (Signalquotient =1). Eine mögliche Kotranskription von *pemK* mit den Genen des *sigB*-Operons bei erhöhter Temperatur (43°C) wurde bereits beobachtet (Gertz *et al.*, 1999). Die *in silico*-Analyse des Upstreambereichs von *pemK* führte zu der Identifizierung einer putativen konservierten *cre*-Sequenz, die sich -34 Basen vom Translationsstartpunkt entfernt befindet (Abb. 19 und 4.1.2.13). Die Sequenz stimmt mit der für *B. subtilis* postulierten Konsensussequenz vollständig überein (WTGNAARCGNWNNCW; (Miwa *et al.*, 2000)). Die Existenz dieses Elements weist auf eine mögliche Regulation über Katabolit-Repression hin (siehe auch 4.1.2.13). Mittels RT-PCR (3.1.8.2) wurde überprüft, ob ein Kotranskript von *pemK* und *rsbU* und *rsbV* nachweisbar ist. Dazu wurde cDNA vom *S. aureus*-Stamm 8325 eingesetzt und mit den Primerkombinationen A (1873-uni/*rsbU*-rev), B (1873-uni/*rsbV*-rev), C (*rsbu*-uni/*rsbv*-rev), und D (*rsbv*-uni/*sigB*-rev) amplifiziert (Abb. 19). Mit allen gewählten Primerpaaren konnte ein Transkript nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass ein gemeinsames Transkript von SA1873 und *rsbU* und *rsbV* existiert und eine erniedrigte Expression der Gene eventuell auf die CcpA-vermittelte Katabolit-Repression zurückzuführen ist.

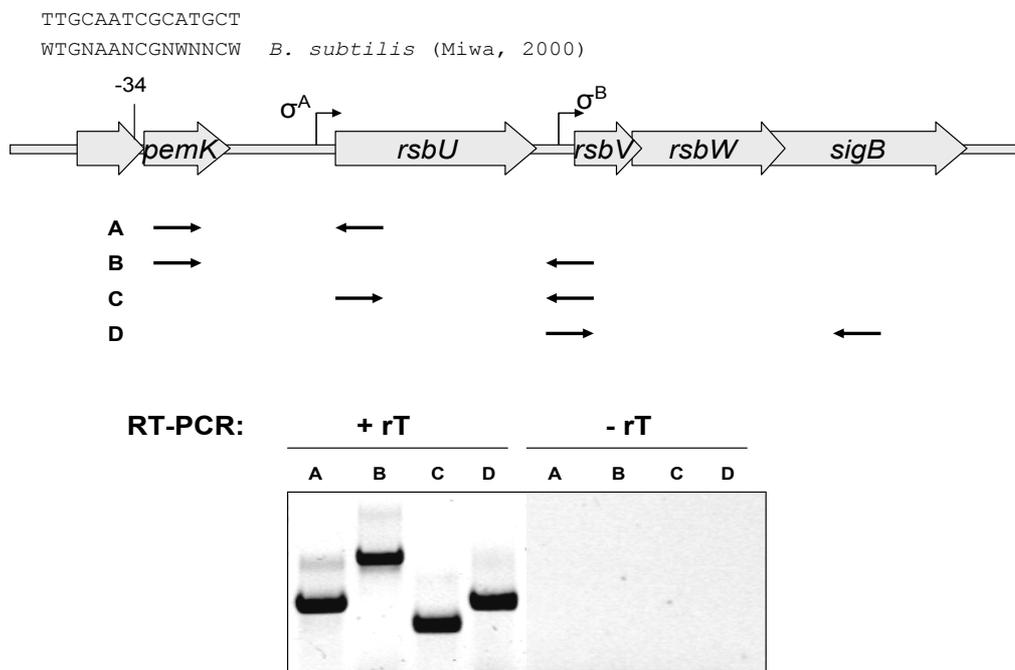


Abb. 19 I:Übersicht des *sigB*-Operons mit Lage der σ^A - und σ^B -abhängigen Promotoren und putativer *cre*-Sequenz 34 Bp relativ zum Translationsstartpunkt des Gens *pemK* (SA1873). Die Lage der Primer für die RT-PCR ist durch Pfeile angedeutet (A-D) **II:** RT-PCR zur Ermittlung der Gene des *sigB*-Operons mit dem upstream gelegenen Gen *pemK*. A, B, C, und D geben die unter I angegebenen Primerkombinationen an (Erläuterung siehe Text). W steht für A oder T und N für eine beliebige Base.

4.1.2.10. Identifizierung potenziell YycF-regulierter Gene in $\Delta clpP$

Das essenzielle Zwei-Komponenten System YycFG ist spezifisch für grampositive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt. YycFG ist in die Regulation von Zellwand-Biosynthese, Zellteilung und Virulenz involviert (Martin *et al.*, 1999; Fukuchi *et al.*, 2000; Howell *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2003; Dubrac & Msadek, 2004).

Die Deletion des *clpP*-Gens führte zu einer erhöhten Transkription den *yycFG*-Locus (Tabelle 7). Die Regulation der Transkription ist bislang ungeklärt. Ein putativer σ^A -abhängiger Promotor wurde 215 Bp stromaufwärts postuliert (Martin *et al.*, 1999). Eine Autoregulation wird ausgeschlossen, da keine YycF-spezifische Erkennungssequenz im Upstreambereich vorhanden ist. In dieser Arbeit wurde eine putative Fnr-Erkennungssequenz 62 Bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes gefunden (siehe 4.1.2.11).

Eine konservierte, für den Responseregulator YycF spezifische DNA-Erkennungssequenz, die aus zwei sich wiederholenden Hexameren besteht, wurde in *B. subtilis* und in *S. aureus* [TGT(A/T)A(A/T/C)-5N-TGT(A/T)A(A/T/C)] identifiziert (Howell *et al.*, 2003; Dubrac & Msadek, 2004). In *S. aureus* wurden 31 ORFs identifiziert, die in ihrem Upstreambereich diese Erkennungssequenz aufweisen. Die Bindung des Responseregulators wurde bei drei Genen (*lytM*, *ssa*, *isaA*) *in vitro* untersucht und bestätigt (Dubrac & Msadek, 2004).

In der $\Delta clpP$ -Mutante sind 16 der putativen Mitglieder des YycFG-Regulons dereguliert. Dazu gehören auch die drei experimentell bestätigten Gene *lytM*, *ssa* und *isaA*. Die computerunstützte Analyse weiterer Gene unter Einsatz der bekannten Erkennungssequenz führte zu der Identifizierung vier weiterer Gene (*aap*, *hsa*, *fnbB* und *vraF*). Von den insgesamt 20 Genen weisen 14 in der $\Delta clpP$ -Mutante eine erhöhte Transkription auf (Tabelle 15). Dabei handelt es sich um Gene, deren Produkte in die Zellwandsynthese (*lytM*, *ssa*, zwei *ssa*-homologe Gene (SA2097 und SA2353)), Virulenz (*isaA*, *ebpS*, SA1898, *fnbB* und *hsa*), Biofilmentwicklung (*aap*), Adaptationsprozesse gegenüber Stressbedingungen (hypothetische Thioredoxin Reduktase, SA1221) sowie in die Transkription (*hu*) involviert sind.

Ergebnisse

Tabelle 15 Potenziell YycFG-regulierte Gene in 8325 Δ *clpP*

S. aureus N315		putative Transkriptionseinheit (5'-3')³	Wt/Δ<i>clpP</i>⁴	Lage⁵	putative YycF-Bindungssequenz
ORF¹	Gen Beschreibung²				
in Δ<i>clpP</i> erhöht exprimiert:					
SA0265 ^{Y*,B}	<i>lytM</i> peptidoglycan hydrolase		0.2	-142(+)	TGTAATGACAAATGTAAT
SA2093 ^{Y*}	<i>ssaA</i> secretory antigen precursor SsaA homolog		0.2	-266(-)	TGTTACAAATTGTAAT
				-138(-)	TGTTAACGTTTGTAAAT
SA2356 ^{Y*}	<i>isaA</i> immunodominant antigen A		0.5	-140(+)	TGTAAGAAAGTGTAAAT
SA0674 ^Y	HP, anion-binding protein		0.5	-16(+)	TGTAATCAAATGTAAT
SA1312 ^Y	<i>ebpS</i> elastin binding protein		0.4	-22(+)	TGTAATAATCATGTAAT
SA1898 ^{Y,B}	- HP, similar to SceD precursor		0.5	-113(+)	TGTAATCACTGTGTAAA
SA2097 ^Y	- HP, similar to secretory antigen precursor SsaA		0.4	-123(-)	TGTTATTGATTGTTAAA
SA2353 ^{Y,F}	- HP, similar to secretory antigen precursor SsaA		0.5	-166(-)	TGTTATCATAATGTAAT
SA2285	<i>aap</i> HP, similar to accumulation-associated protein		0.4	-34(+)	TGTAATAATTCACGTGTAAG
SA2290	<i>fnbB</i> fibronectin-binding protein homolog		up	-121(-)	TGTTAACTTTATGTATA
SA2447 ^{C,B}	<i>hsa</i> HP, similar to streptococcal hemagglutinin protein	<i>hsa</i> (0.3)-SA2446(0.3)- SA2445(0.3)- SA2444(0.3)- SA2443(0.3)- SA2442(0.4)- SA2441(0.5)- SA2440(0.5)	0.3	-388(-)	TGTAATATATGTGTAAT
SA1305 ^Y	<i>hu</i> DNA-binding protein II		0.4	-58(+)	TGTAATGCTTGTGTTAA
SA1221 ^Y	- thioredoxine reductase		0.3	-113(-)	TGTTAAGAAAAATGTAAA
SA2481 ^Y	- Predicted sulfurtransferase		0.3	-24(+)	TGTTATAAGCATGTTAA
in Δ<i>clpP</i> vermindert exprimiert:					
SA0129 ^Y	<i>sasD</i> HP		4.5	-16(+)	TGTAATCAAATGTAAT
SA0682 ^Y	- HP, similar to di-tripeptide ABC transporter	SA0682(3.1)- SA0681(2.4)	3.1	-246(-)	TGTTATTTTAAATGTAAC
SA0913 ^Y	<i>qoxA</i> HP, similar to quinol oxidase polypeptide II QoxA	<i>qoxA</i> (2.4)- <i>qoxB</i> (2.6)- <i>qoxC</i> (2.2)- <i>qoxD</i> (2.3)	2.4	-53(+)	TGTAATAATATTGTGTAAT
SA1945 ^Y	- HP, similar to mannose-6-phosphate isomerase Pmi	SA1945(3.3)- SA1944(3.0)	3.3	-179(+)	TGTTAAAGTACGTGTAAA
SA2262 ^{Y,B}	- CHP (Csb7)		2.1	-327(-)	TGTTAATGTACGTGTACA
SA0616	<i>vraF</i> ABC transporter ATP-binding protein YycF-Konsensus ^Y	<i>vraF</i> (2.4)- <i>vraG</i> (2.1)	2.4	-65(+)	TGTTAGTCATATGTTAA
					TGTWAHNNNNNTGTWAH

1: Y: putative YycF-Bindungssequenz nach (Dubrac & Msadek, 2004); Y*: experimentell bestätigt (Dubrac & Msadek, 2004); weitere potenzielle Regulatoren: F: Fur-reguliert (vgl. 4.1.2.5, Tabelle 10); B: σ^B -abhängig (vgl. 4.1.2.5, Tabelle 14), C: cre-Element (vgl. 4.1.2.13, Tabelle 18). **2:** CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **3:** Die Werte in den Klammern stehen für die Signalquotienten weiterer Gene einer putativen Transkriptionseinheit (siehe auch Anhang 7.2). **4:** Der Signalquotient Wildtyp/ Δ *clpP*-Mutante >2 bedeutet in der Δ *clpP*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 erhöht exprimiert; „up“ bedeutet im Microarray-Experiment nicht auswertbar, aber erhöhte Transkription mittels RT-PCR bestätigt (4.1.2.14). **5:** Die Entfernung der Bindungssequenz zum putativen Translationsstartpunkt in Basen; +/- in Klammern gibt die Orientierung der Bindungssequenz relativ zur Leserichtung des Gens an.

4.1.2.11. Identifizierung potenziell Fnr/ArcR-regulierter Gene in $\Delta clpP$

Die Beobachtung einer verringerten Arginin-Deiminase-Aktivität des Stammes 8325 $\Delta clpP$ lässt auf eine veränderte Expression der Arginin-Deiminase-Wegs (ADI) schließen. Die Gene dieses Wegs sind in dem *arc*-Operon organisiert (*arcABDCR*). Die Signalquotient des Gens *arcA* deutet auf eine verminderte Transkription in $\Delta clpP$ hin (Tabelle 16). Die weiteren Gene des Operons wurden dagegen aufgrund zu geringen Signalintensitäten von der Analyse ausgeschlossen. Die Transkription des ADI wird in verschiedenen Grampositiven in Abhängigkeit der Arginin- und Glukoseverfügbarkeit, sowie der Sauerstoffbedingungen kontrolliert. Die Regulation der anaeroben Aktivierung erfolgt durch Vertreter der Crp/Fnr-Familie (zur Übersicht Körner *et al.*, 2003). Das Gen *arcR* kodiert für ein Crp/Fnr-homologes Protein und wurde als positiver Regulator der Expression des ADI unter anaeroben Bedingungen beschrieben. Die ArcR-Erkennungssequenz weist Homologien zu den Erkennungssequenzen von Crp in *E. coli* sowie von Fnr in *B. subtilis* auf. Die Suche der palindromen Sequenz TGTG-N₆-CTCT im *S. aureus* N315-Genom führte zur Identifikation von 19 Genen, deren Expression in $\Delta clpP$ verändert ist. Die Produkte dieser Gene werden insbesondere in Anpassung an anaerobe Bedingungen benötigt. Unter den 15 vermindert transkribierten ORFs, befinden sich 10 Gene des anaeroben Stoffwechsels, sowie der Transkriptionsregulator *mrgA/rat*. Die Gene *pfiB*, *lctE*, *lctP* und *arcA* weisen im Upstreambereich eine weitere palindrome Sequenz mit Ähnlichkeit zu dem CcpA-Bindungsmotiv auf (4.1.2.13). Die Gene der anaeroben Atmung *narK* und *nirR* verfügen über eine zusätzliches Motiv, das auf eine Regulation durch das Zwei-Komponenten System NreBC hinweist (4.1.2.12). Zu den 4 Loci mit erhöhten Transkriptmengen gehören die Gene des Zwei-Komponenten-Systems YycFG und einer hypothetischen NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase. Im Upstreambereich des Locus *srrAB*, der für ein Zwei-Komponenten-System kodiert, das in Abhängigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit die Expression von Virulenzfaktoren in *S. aureus* kontrolliert (Pragman *et al.*, 2004), wurde ebenfalls eine ArcR/Fnr-homologe Motiv identifiziert. Die Transkription der Gene wird durch die Deletion von *clpP* jedoch nicht beeinflusst.

Ergebnisse

Tabelle 16 Überblick der potenziell Fnr/ArcR-regulierten Gene in 8325 Δ *clpP*

S. aureus N315		putative Transkriptions-einheit (5'-3')³	Wt/Δ<i>clpP</i>⁴	Lage⁵	putative Fnr-Bindungs-Sequenz
ORF¹	Gen Beschreibung²				
erniedrigte Transkription in 8325 Δ <i>clpP</i> :					
SA0218 ^C	<i>pflB</i> Formate acetyltransferase	<i>pflB</i> (15.7)- <i>pflA</i> (7.8)	15.7	-79(+)	ATGTGAAAAAAAAATCACA
SA0232 ^C	<i>lctE</i> L-lactate dehydrogenase		12.1	-210(+)	ATGTGAAAATAAAATCACA
				-152(+)	ATGTGAAAATAAAATCACA
SA2156 ^C	<i>lctP</i> L-lactate permease <i>lctP</i> homolog		5.5	-107(+)	TTGTGAAAAAAAAATCACA
SA2428 ^C	<i>arcA</i> arginine deiminase	<i>arcA</i> (3.4)- <i>arcB</i> (n.d.)- <i>arcD</i> (n.r.)- <i>arcC</i> (n.r.)- <i>arcR</i> (n.r.)	3.4	-62(+)	ATGTGAAATAAATCACA
SA2176 ^N	<i>narK</i> nitrite extrusion protein		3.6	-151(-)	TTGTGAAAAAGTGAACAT
SA2189 ^N	<i>nirR</i> HP, similar to NirR	<i>nirR</i> (10.1)- <i>nasD</i> (7.7)	10.1	-47(-)	TTGTGAAAAGAAATCACA
SA0293	<i>nirC</i> HP, similar to formate transporter NirC		4.4	-55(-)	TTGTGAAATAATTCACA
SA0143	<i>adhE</i> alcohol-acetaldehyde dehydrogenase		6	-22(+)	TTGTGAAAATAATTCACA
SA0295	- HP, outer membrane protein precursor		5.7	-141(+)	ATGTGATAGGTCCTCCAT
SA0562	<i>adh1</i> alcohol-dehydrogenase I		3.5	-289(+)	TTGTGAATTAATTCACAT
SA1272	<i>ald</i> alanine dehydrogenase		3.8	-21(-)	TTGTGAATAATTCACAA
SA0641	<i>rat/ mgrA</i> transcriptional regulator		3.8	-69(+)	TTGTGAATTAATAACAA
SA1323	<i>srrA</i> staphylococcal respiratory response protein SrrA	<i>srrA</i> (n.r.)- <i>srrB</i> (n.r.)	n.r.	-86(-)	TTGTGAAAAAAAAATCTCAA
SA1813	<i>lukM</i> HP, similar to leukocidin chain <i>lukM</i> precursor	<i>lukM</i> (4.3)- <i>lukF</i> (n.d.)	4.3	-49(-)	ATGTGAAATAATAACACA
SA2430	<i>aur</i> zinc metalloproteinase aureolysin		18.8	-215(-)	TTGTGAAAATATTAACAA
SA2268	- HP		17.8	-112(+)	TTGTGAAATACATCACA
erhöhte Transkription in 8325 Δ <i>clpP</i> :					
SA0017	<i>vicR</i> response regulator	<i>vicR</i> (0.5)- <i>vicK</i> (0.4)	0.5	-62(-)	TTGTGTAAAAAAATCACAG
SA0175	- CHP		0.4	-42(-)	TTGTGAAAATAATCACA
SA2373	- HP	SA2373(0.5)-SA2372(0.5)-SA2371(0.5)	0.5	-95(+)	TTTGTGAATAAATCACA
SA2311	HP, similar to NAD(P)H-flavin oxidoreductase		0.5	-168(+)	TTGTGAAAATAATCACA
putative Fnr/ArcR-Konsensussequenz in <i>S. aureus</i>					tTgTGaawww tcaCAa

1: Weitere potenzielle Regulatoren aufgrund von konservierten DNA-Motiven: **C:** *cre*-Element (vgl. 4.1.2.13, Tabelle 18); **N:** NreBC (vgl. 4.1.2.12, 0). **2:** CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **3:** Die Werte in den Klammern stehen für die Signalquotienten weiterer Gene in einer putativen Transkriptionseinheit. n.r.: nicht reguliert, n.d. nicht auswertbar (siehe auch Anhang 7.2); **4:** Signalquotient Wildtyp/ Δ *clpP*-Mutante >2 bedeutet in der Δ *clpP*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 in der Mutante erhöht exprimiert. **5:** Entfernung zum putativen Translationsstartpunkt in Basen; +/- in Klammern gibt die Orientierung der Bindungssequenz relativ zur Leserichtung des Gens an.

4.1.2.12. Identifizierung potenziell NreBC-regulierter Gene in Δ *clpP*

Die Transkriptionsanalyse der Δ *clpP*-Mutante ergab, dass eine Reihe von Genen, die für anaerobes Wachstum benötigt werden herunterreguliert ist. Der Locus SA2181-SA2179 kodiert für bisher noch nicht näher für *S. aureus* beschriebene Gene, die eine

Ergebnisse

hohe Homologie zu den *S. carnosus* Genen *nreA*, *nreB* und *nreC* aufweisen (Fedtke *et al.*, 2002). *nreB* und *nreC* kodieren für die Sensorkinase NreB und den Response-Regulator NreC eines Zwei-Komponenten Systems. Dieses System ist in die Regulation der anaeroben Atmung in *S. carnosus* involviert, indem es in Abhängigkeit anaerober Bedingungen die Transkription des Nitrat Reduktase Operons (*narGHJI*) und des Nitrit-Reduktase-Operons (*nir*) aktiviert (Fedtke *et al.*, 2002). In der $\Delta clpP$ -Mutante werden beide Loci deutlich vermindert exprimiert. Zwei weitere Gene mit einem putativen NreC-Erkennungsmotiv konnten durch die computerunterstützte Analyse der Upstreambereiche der in der $\Delta clpP$ -Mutante deregulierten Gene identifiziert werden. Zusätzlich wurde das Erkennungsmotiv im Upstreambereich von *narK* identifiziert, dessen Transkription ebenfalls erniedrigt ist. Der ORF SA0422 kodiert für ein nicht näher charakterisiertes hypothetisches Lipoprotein und ist in der Expression erhöht. Da die Transkription des *nar*-Operons in *S. carnosus* auch unter Sauerstoffbedingungen nachweisbar ist, führen diese Ergebnisse zu dem Schluss, dass die Aktivierung und die Aufrechterhaltung einer NreBC-vermittelten Basisaktivität durch die *clpP*-Deletion nicht mehr vorhanden ist. Wie unter 4.1.2.11 beschrieben, wurden in den Upstreambereichen von *nirR* und *narK* jeweils ein zusätzliches Fnr/ArcR-Erkennungsmotiv identifiziert, sodass die verminderte Expression aufgrund von zwei regulatorischen Erkennungsmotiven nicht eingeordnet werden kann.

Tabelle 17 Überblick der NreBC-regulierten Gene in 8325 $\Delta clpP$

<i>S. aureus</i> N315		Beschreibung ²	putativer Transkriptions- einheit (5'-3') ³	Wt/ $\Delta clpP$ ⁴	Lage ⁵	putative NreB- Bindungssequenz
ORF ¹	Gen					
SA0422		HP, similar to lactococcal lipoprotein		0.4	-61(+)	TAGGGAAATGTCCTA
SA2176 ^{Fn}	<i>narK</i>	nitrite extrusion protein		3.6	-169(+)	AAGGGAAAATCCTT
SA2189 ^{NFn}	<i>nirR</i>	HP, similar to NirR	<i>nirR</i> (10.1)- <i>nasD</i> (7.7)- <i>nasE</i> (2.2)- <i>nasF</i> (n.d.)	10.1	-78(-)	CAGGGAAATTCCTG
SA2185 ^N	<i>narG</i>	respiratory nitrate reductase alpha chain	<i>narG</i> (4.6)- <i>narH</i> (n.d.)- <i>narJ</i> (n.d.)- <i>narI</i> (2.1)	4.6	-119(-) -140(+)	TAGGGAAATCACCTA TAGGGAAATTCCTT TAGGGNNNNCCCTA

1: N: NreBC-reguliert nach (Fedtke *et al.*, 2002). Weitere potenzielle Regulatoren aufgrund von konservierter DNA-Elementen: **Fn:** Fnr/ArcR (vgl. 4.1.2.11, Tabelle 16). **2:** HP: hypothetisches Protein. **3:** Werte in Klammern stehen für Signalquotienten weiterer Gene in einer putativen Transkriptionseinheit (siehe auch Anhang 7.2); n.d.: nicht auswertbar. **4:** Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante: >2 in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 erhöht exprimiert. **5:** Die Entfernung zum putativen Translationsstartpunkt in Basen; +/- in Klammern gibt die Orientierung der Bindungssequenz relativ zur Leserichtung des Gens an.

4.1.2.13. Identifizierung potenziell Katabolit-regulierter Gene in $\Delta clpP$

Die Katabolit-Repression in Grampositiven Bakterien wird durch das regulatorische Protein CcpA vermittelt. Die Interaktion mit verschiedenen Kofaktoren beeinflusst die Aktivität von CcpA. Für die Analyse der Rolle der Katabolit-Repression in $\Delta clpP$ wurde die palindrome Konsensussequenz WTGNAANCGNWNWCW aus *B. subtilis* eingesetzt (Miwa et al., 2000). Es wurden insgesamt 27 Gene identifiziert, die ein putatives *cre*-Element im Upstreambereich verfügen und in $\Delta clpP$ dereguliert sind (Tabelle 18). 20 ORFs weisen eine erniedrigte Expression auf, deren Produkte u.a. für fermentative Prozesse benötigt werden. Dazu gehören auch Gene, die potenziell unter der Kontrolle des Regulators Fnr/ArcR stehen (4.1.2.11), wie *pflB*, *lctE*, *lctP* und *arcA*. Zusätzlich wurden potenzielle *cre*-Elemente in den Upstreambereichen der Virulenzfaktor-assoziierten Gene *hla*, *spIB* und *lip* identifiziert. Aufgrund der bisher nur unzureichenden Charakterisierung der Katabolit-Repression auf die globale Genexpression in *S. aureus* und der großen Anzahl möglicher *cre*-Elemente im N315-Genom ist die Interpretation der Daten nicht eindeutig.

Tabelle 18 Überblick potenziell CcpA-regulierter Gene in $\Delta clpP$

<i>S. aureus</i> N315 ORF ¹	Gen	Beschreibung ²	putative Transkriptionseinheit (5'-3') ³	Wt/ $\Delta clpP$ ⁴	Lage ⁵	putatives <i>cre</i> -Element
in $\Delta clpP$ vermindert transkribiert:						
SA0184	-	CHP	SA0184(2.9)- SA0185(2.7)- SA0186(2.3)-SA0187(2.2)	2.9	-49 (+)	ATGTAAGCGATTACA
SA0218 ^{Fn}	<i>pflB</i>	Formate acetyltransferase	<i>pflB</i> (15.7)- <i>pflA</i> (7.8)	15.7	-45(+)	ATGAAAACGTTAACA
SA0232 ^{Fn}	<i>lctE</i>	L-lactate dehydrogenase		12.1	-257(+)	ATGTAATCGTATACA
SA0250	<i>lytS</i>	TCS	<i>lytS</i> (2.1)- <i>lytR</i> (2.1)	2.1	0(+)	GTGCTATCGCTAACA
SA0304	<i>nanA</i>	N-acetylneuraminatase Lyase subunit		2.9	-49(-)	TTGTAACCGCTATCA
SA0322	-	HP, similar to transcription regulator, MarR family	SA0322 (3.5)- <i>svrA</i> (2.8)	3.5	-175(+)	TTGTAAGCGATTTTCT
SA0754	-	HP, similar to lactococcal prophage ps3 protein 05		2.1	-230(-)	TTGGAACCGGTCAACA
SA0820	<i>glpQ</i>	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase		4.4	-88(-)	GTGAAAACGCTTTTAC A
SA0848	<i>oppF</i>	oligopeptide transport system ATP-binding protein OppF homologue	<i>oppB</i> (8.8)- <i>oppC</i> (10.7)- <i>oppD</i> (9.8)- <i>oppF</i> (10.9)- <i>oppA</i> (6.0)	10.9	-44(+)	ATGAAAACCGATGCCT
SA0995	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase cytochrome b-558	<i>sdhC</i> (2.9)- <i>sdhA</i> (2.3)- <i>sdhB</i> (1.9)	2.3	-221(+)	GTGGAAGCGTTTTTCT
SA1007	<i>hla</i>	Alpha-Hemolysin precursor		3.8	-320(+)	TTGTAATCGATTACA
SA1140	<i>glpF</i>	glycerol uptake facilitator	<i>glpF</i> (2.3)- <i>glpK</i> (n.r.)	2.3	-118(-)	ATGAAAACCGTTGTCA
SA1555	<i>acuA</i>	acetoin dehydrogenase homolog	<i>acuA</i> (2.1)- <i>acuC</i> (2.1)	2.1	-133(+)	GTGAAAACGCTTTTCT
SA1630	<i>spIB</i>	serine protease SpIB	<i>spIA</i> (n.r.)- <i>spIB</i> (3.6)- <i>spIC</i> (7.7)- <i>spID</i> (3.6)	3.6	-65(-)	ATGTAACCGTTTTTCT
SA1873	-	CHP		3.3	-34(-)	TTGCAATCGCATGCT
SA1927	<i>fbA</i>	fructose-bisphosphate aldolase (Klasse 2)		2.4	-127(-)	ATGCAAACGTTAACA

Ergebnisse

S. aureus N315			putative Transkriptions-	Wt/	Lage⁵	putatives
ORF¹	Gen	Beschreibung²	einheit (5'-3')³	$\Delta clpP^4$		cre-Element
SA2156 ^{Fn}	<i>lctP</i>	L-lactate permease <i>lctP</i> homolog		5.5	-71(-)	TGTTATCGATAACA
SA2463	<i>lip</i>	triacylglycerol lipase precursor		3.7	-123(+)	ATGTAACCGCTTTCT
SA2411	<i>citM</i>	HP, similar to magnesium citrate secondary transporter		2.4	-268(+)	TCGAAGTCGTACTA
SA2428 ^{Fn}	<i>arcA</i>	arginine deiminase	<i>arcA</i> (3.4)- <i>arcB</i> (n.d.)- <i>arcD</i> (n.r.)- <i>arcC</i> (n.r.)- <i>arcR</i> (n.r.)	3.4	-49(+)	ATGTAAGCGTTTGAA
in $\Delta clpP$ erhöht transkribiert:						
SA1897 ^P	-	HP, similar to transcriptional activator TenA	SA1897(0.3)- <i>thiD</i> (0.4)- <i>thiM</i> (0.5)- <i>thiE</i> (0.4)	0.3	-208(+)	TCGAAACCGTTTGCT
SA1938	<i>pdp</i>	pyrimidine nucleoside phosphorylase	SA1339(0.5)- <i>pdp</i> (0.5)-SA1337(0.5)	0.5	-53(+)	ATGAAATCGATAGCT
SA1939	-	deoxyribose-phosphate aldolase	SA1339(0.5)- <i>pdp</i> (0.5)-SA1337(0.5)	0.5	-200(+)	ATGTAACCGCATAACA
SA0162 ^F	<i>aldA</i>	aldehyde dehydrogenase homologue		0.3	-89(+)	ATGTAACCGCTTACT
SA2304	<i>fbp</i>	fructose-bisphosphatase		0.4	-69(+)	ATGTTAACGTTTTCT
SA2320	-	HP, similar to regulatory protein PfoR	SA2320(0.3)-SA2319(0.4)-SA2318(0.2)	0.3	-62(+)	TCGAAACCGTTTTCT
SA2447 ^Y	<i>hsa</i>		<i>hsa</i> (0.3)-SA2446(0.3)-SA2445(0.3)-SA2444(0.3)-SA2443(0.3)-SA2442(0.4)-SA2441(0.5)-SA2440(0.5)	0.3	-135(-)	ATGGAATCGTTTTCA
SA1367 ^B	-	aminomethyltransferase	SA1367(0.4)-SA1366(0.4)-SA1365(0.4)	0.4	-242(+)	ATGAAATCGCATTCA
cre-Konsensus <i>B. subtilis</i> (Miwa et al., 2000)						WTGNAANCGNWNNCW

1: Weitere potenzielle Regulatoren aufgrund von konservierten DNA-Motiv: **Fn:** Fnr/ArcR (vgl. 4.1.2.11, Tabelle 16), **F:** Fur-reguliert (vgl. 4.1.2.5, Tabelle 10) **Y:** YycFG (vgl. 4.1.2.10, Tabelle 15); **P:** PerR (vgl. 4.1.2.6, Tabelle 11), **B:** σ^B -abhängig (vgl. 4.1.2.5, Tabelle 14). **2:** CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **3:** Die Werte in den Klammern stehen für die Signalquotienten weiterer Gene einer putativen Transkriptionseinheit (siehe auch Anhang 7.2); n.d.: nicht auswertbar, n.r.: nicht reguliert. **4:** Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante: >2 in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 in der Mutante erhöht exprimiert. **5:** Die Entfernung zum putativen Translationsstartpunkt in Basen; +/- in Klammern gibt die Orientierung der Bindungssequenz relativ zur Leserichtung des Gens an.

Im Upstreambereich des Gens *hla*, das für das Alpha-Toxin in *S. aureus* kodiert, wurde eine bisher nicht beschriebene putatives *cre*-Element identifiziert, das in allen Basen mit der *cre*-Konsensussequenz von *B. subtilis* übereinstimmt und unmittelbar am *hla*-Transkriptionsstartpunkt (~332 Bp) beginnt (Novick, 1991)(Abb. 20). Mittels RT-PCR wurde die Lage des Transkriptionsstartpunktes annäherungsweise mit den Primerkombinationen: A. *hla*1-*hla*4, B:*hla*2-*hla*4 und C: *hla*3-*hla*4 überprüft. Mit den Primerpaarungen B und C konnte jeweils ein Transkript nachgewiesen werden, während die Primerkombination A kein Produkt ergab. Dieses Ergebnis bestätigt die

Lage des Transkriptionsstartpunkt in einem Bereich von -456 -- -325 Bp relativ zum Translationsstartpunkt.

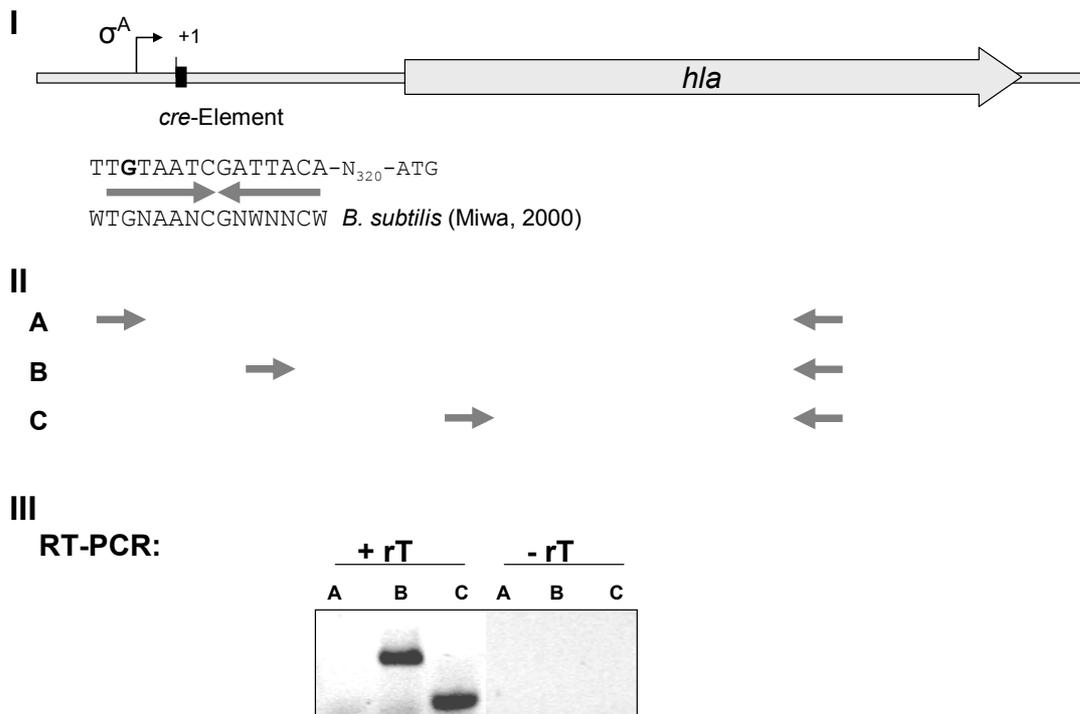


Abb. 20 Annäherungsweise Ermittlung des *hla*-Transkriptionsstartpunkt (+1: -332 Bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt) mittels RT-PCR. **I**: Überblick der *hla*-Genregion, Lage des Transkriptionsstartpunktes (Novick, 1991), und Lage des σ^A -abhängigen Promotors. Lage des potenziellen *cre*-Elementes an +1 des Transkriptionsstartpunktes. Potenzielles *cre*-Element im Vergleich zu der von Miwa *et al.* postulierten Konsensussequenz in *B. subtilis* (Miwa *et al.*, 2000). Die grauen Pfeile markieren die palindromen Sequenz-Bereiche. **II**: Übersicht der für die RT-PCR eingesetzten Primerpaarungen A, B, C (Erläuterungen siehe Text). **III**: RT-PCR. Die PCR-Reaktion wurde mit wildtypischer cDNA als Template und den Primerpaarungen A, B, C durchgeführt. Dabei wurde ein Ansatz mit cDNA (+rT) und als Kontrolle unbehandelte mRNA eingesetzt (-rT).

4.1.2.14. Überprüfung der veränderten Transkription ausgewählter Gene der 8325 Δ *clpP*-Mutante

Zur Überprüfung der Microarray-Hybridisierungs-Experimente und der veränderten Expression in der mit dem Expressionsvektor pHP*Sc**clpP* komplementierten Δ *clpP*-Mutante (Δ *clpP*⁺) wurden die Veränderungen der Transkriptmengen ausgewählter Gene mittels Northern Blot-Analyse (3.1.14) und semi-quantitativer RT-PCR analysiert (3.1.8.2). Dazu wurde die RNA der Stämme 8325 und der isogenen Δ *clpP* und Δ *clpP*⁺-Mutanten mit einer RNAlII-spezifischen Sonde im Northern Blot hybridisiert. Es konnte gezeigt werden, dass aufgrund der verminderten Expression der Gene *agrA* und *agrC* (vgl 4.1.2, Tabelle 5) auch eine Verminderung der RNAlII-Expression in der Δ *clpP*-Mutante zu beobachten ist, die in der Komplementante wieder auf Wildtyp-Niveau anstieg (Abb. 21 I). Für die semiquantitative RT-PCR wurde cDNA der gleichen

Ergebnisse

Stämme eingesetzt, um die relativen Transkriptmengen der Gene *fnbB*, *fnb*, *cflA*, *sigB* und *hla* zu ermitteln. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Transkriptomanalyse, konnte eine erhöhte *cflA*- sowie eine Verminderung der *sigB*- und *hla*-Transkriptmenge nachgewiesen werden. Die bei der Microarray-Analyse ausgeschlossenen Gene *fnbB* und *fnb* werden erhöht transkribiert. Mit Ausnahme von *cflA* wurden alle Gene in der $\Delta clpP$ -Mutante in einer mit dem Wildtyp vergleichbaren Stärke exprimiert.

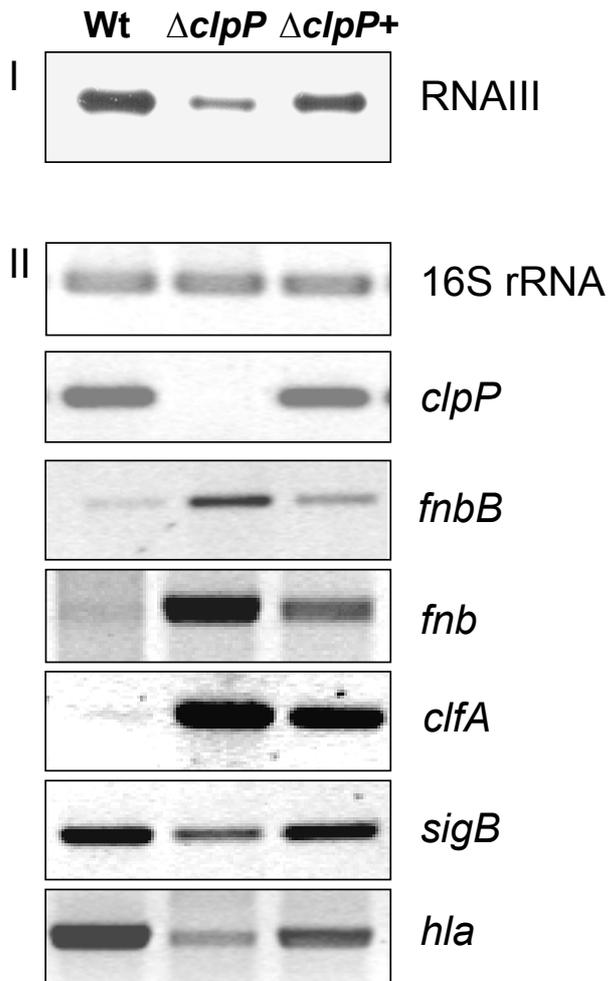


Abb. 21 Analyse der veränderten Transkriptmengen ausgewählter Gene mittels semi-quantitative RT-PCR (3.1.8.2). **I:** Northern Blot-Analyse der RNAIII-Expression in den Stämmen 8325 (Wt), 8325 $\Delta clpP$ und 8325 $\Delta clpP+$. **II:** Semi-quantitative RT-PCR zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge in den Stämmen 8325 (Wt), 8325 $\Delta clpP$ und 8325 $\Delta clpP+$. Als Kontrollen wurde Amplifikationen mit 16S rRNA-cDNA und *clpP*-cDNA durchgeführt.

4.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 4.1.

Die Deletion des *clpP*-Gens in *S. aureus* 8325 führte zu

- Wachstumsdefekten bei verschiedenen Temperaturen (30°C, 37°C, 42°C, 45°C). ClpP ist essenziell für das Wachstum bei 20°C. Bei niedrigen Temperaturen (30°C und 20°C) ist die Transkription des *clpP*-Gens erhöht.
- einer veränderten Zelloberfläche und einer Verringerung der Zell- und Koloniegröße
- einem Wachstumsdefekt unter anaeroben Bedingungen
- einer erhöhten Triton X-100 induzierbaren Autolyse
- Veränderungen der physiologischen Eigenschaften in Form einer stark erhöhten Urease-Aktivität, einer verminderten Argin Deiminase-Aktivität sowie eine schwache Reduzierung der Fähigkeit Laktose zu verwerten
- einer Verringerung der hämolytischen Aktivität
- einer Verminderung der Fähigkeit an Polystyren zu adhären
- einer ~10-fach erhöhten Internalisierungsrate durch 293T-Zellen in einem Invasionsassay
- ~2-fach erhöhte Fibronektin-Bindungskapazität
- vielfältigen Veränderungen der Genexpression, ~15 % der Gene des Gesamt-Genoms sind durch die *clpP*-Deletion transkriptionell betroffen

4.2. Herstellung und Überprüfung *arlS*- und *arlR*-Deletionsmutanten

Die Herstellung der $\Delta arlS$ - und *arlR*-Deletionsmutanten erfolgte nach der unter 3.2 beschriebenen Anleitung. Für die Herstellung des Deletionsvektors pMA $\Delta arlS$ wurde der *arlS*-Upstreambereich (1 kb) mit den modifizierten Primern *arlS1/HindIII* und *arlS2/BamHI* und der *arlS*-Downstreambereich mit den Primern *arlS3/PstI* und *arlS4/EcoRI* und für die Konstruktion des Deletionsvektors pMA $\Delta arlR$ der *arlR*-Upstreambereich (0.9 kb) mit den Primern *arlR1/HindIII* und *arlR2/BamHI* sowie der *arlR*-Downstreambereich (1 kb) mit den Primern *arlR3/PstI* und *arlR4/EcoRI* mittels PCR amplifiziert. Nach Fertigstellung der Vektoren und Transformation in den *S. aureus*-Stamm 8325 konnten nach einem Integrationsschritt bei 42°C für beide Gene jeweils drei Em-resistente und Cm-sensitive Klone isoliert werden, die mittels Southern Blot-Analyse überprüft wurden (Abb. 22). Die chromosomale DNA des Wildtyp-Stammes 8325 und jeweils drei potenzieller *arlS*- und *arlR*-Mutanten wurde mit *Accl* geschnitten. Die Gene *arlR* und *arlS* liegen auf dem gleichen *Accl*-Fragment, sodass die Sequenz des jeweils anderen Gens als Sonde genutzt werden kann. Bei der Überprüfung der *arlS*-Mutanten (Abb. 22 I) wurde die *arlR*-spezifische Sonde eingesetzt. Im Wildtyp konnte ein Signal bei ~4,4 kb detektiert werden. Durch eine im 3'-Bereich der *ermB*-Sequenz gelegene *Accl*-Schnittstelle, verkleinerte sich das Signal in den *arlS*-Mutanten, sodass ein Fragment von ~3,7 kb nachzuweisen war. Die Hybridisierung mit einer *ermB*-spezifischen Sonde, ergab im Wt kein Signal. In den Mutanten wurden zwei Signale (3,7 und 0,75 kb) detektiert, die auf die erfolgreiche Integration der *ermB*-Kassette zurückzuführen sind. Die Herstellung der potenziellen *arlR*-Mutanten konnte ebenfalls mit der Southern Blot-Analyse nachgewiesen werden. Durch die Hybridisierung mit einer *arlS*-spezifischen Sonde wurde ein wildtypisches Signal bei ~4,4 kb detektiert. Durch die Integration der *ermB*-Kassette konnte in den potenziellen Mutantenklonen ein verkleinertes Fragment mit einer Größe ~3,1 kb nachgewiesen werden. Die Hybridisierung mit einer verkürzten *ermB*-spezifischen Sonde, die nicht den 3'-Bereich mit der darin gelegenen *Accl*-Schnittstelle umfasst, führte zu der Detektion eines 2,2 kb-Fragments.

Die Inaktivierung des Arl-Systems führt in den Stämmen 8325-4 und 8325 zu stamm-spezifischen Unterschieden in der Virulenzfaktorenexpression sowie in der Fähigkeit Biofilm zu bilden (Fournier *et al.*, 2001). Um Aufschluss über die Rolle dieses Zwei-Komponenten-Systems in *S. aureus* zu erhalten, war es von Interesse *arlRS*-

Ergebnisse

Mutanten in weiteren Stämmen zu untersuchen. Dazu wurden die fertiggestellten $\Delta arlR$ und $\Delta arlS$ -Mutanten eingesetzt um die Mutation in die Stämme COL, Wood 46 und 377 mithilfe des Phagen $\Phi 85$ zu transduzieren. Die erfolgreiche Transduktion der Mutation wurde in den Mutanten Col $\Delta arlS$, Wood46 $\Delta arlS$ und 377 $\Delta arlR$ mittels Southern Blot-Analyse überprüft und bestätigt (nicht gezeigt).

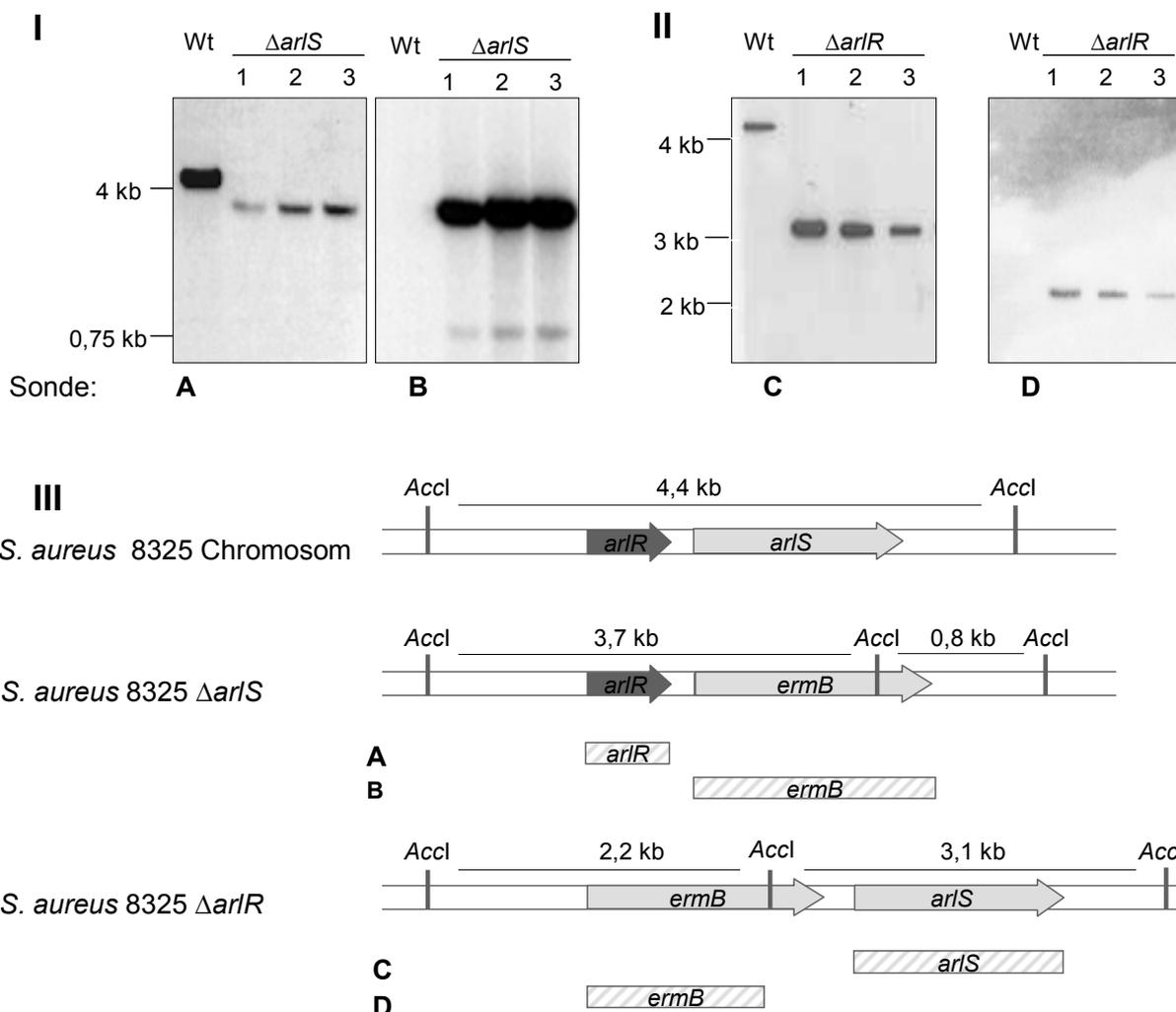


Abb. 22 Southern Blot-Analyse des Wildtypstammes *S. aureus* 8325 und drei $\Delta arlS$ -Mutanten (I) und drei $\Delta arlR$ -Mutanten (II). Die chromosomale DNA wurde mit *Accl* geschnitten. I: Überprüfung von $\Delta arlS$ mit einer *arlR*-spezifischen Sonde (A) und einer *ermB*-spezifischen Sonde (B). II: Überprüfung der *arlR*-Mutanten mit einer *arlS*-spezifischen Sonde (C) und mit einer *ermB*-spezifischen Sonde (D). III: Übersicht der Sequenz des *arlRS*-Locus und der Lage der *Accl*-Schnittstellen im 8325-Genom sowie der eingesetzten Sonden (A-D) und erwartete Größen der Fragmente.

4.2.1. Phänotypische Charakterisierung der *arlS* und *arlR* Deletionsmutanten

4.2.1.1. Adhärenz-Assay der $\Delta arlR$ - und $\Delta arlS$ -Mutanten an Polystyren

Die Inaktivierung des ArlRS-Zwei-Komponenten Systems in *S. aureus* 8325 führt zu einer Erhöhung der Adhärenz an Polystyren (Fournier & Hooper, 2000). In einem Mikrotiterplatten-Assay sollte überprüft werden, ob die Inaktivierung des Zwei-Komponenten Systems auch in anderen *S. aureus*-Stämmen zu einer erhöhten Adhärenz führt (siehe 3.6). Dazu wurden die Stämme 8325, COL, Wood 46 und 377 und die jeweiligen isogenen *arl*-Mutanten ($8325\Delta arlS$, $8325\Delta arlR$, $COL\Delta arlS$, $Wood\Delta arlS$, $377\Delta arlR$) über Nacht in Mikrotiterplatten kultiviert, der Überstand vorsichtig abgenommen und adhärierende Bakterien mit Kristallviolett angefärbt (Abb. 23). Der Wildtypstamm 8325 zeigte eine geringe Affinität zu Polystyren. In Übereinstimmung mit den veröffentlichten Ergebnissen, erhöhte die Deletion der Gene *arlS* und *arlR* hier deutlich die Oberflächenbindung. Die *arl*-Inaktivierung führte dagegen zu keiner signifikanten Veränderung der Adhärenz in den Stämmen COL, Wood 46 und 377.

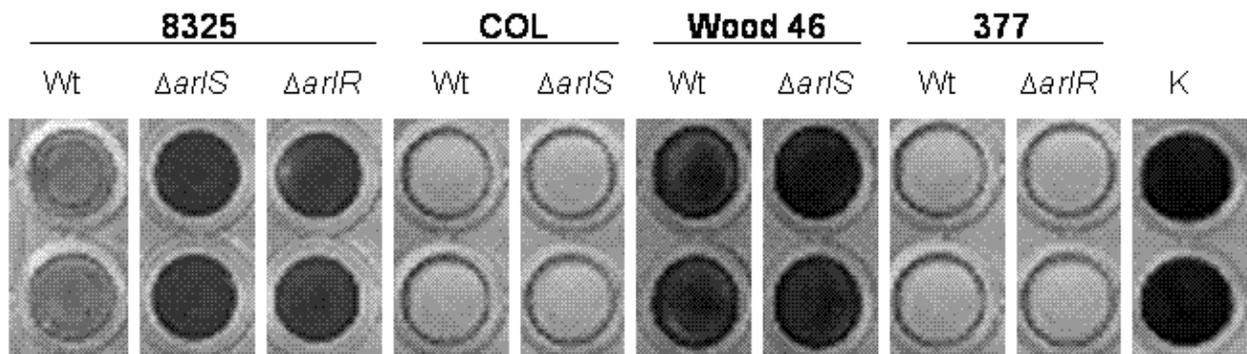


Abb. 23 Adhärenz verschiedener *S. aureus*-Stämme an Polystyren. Als Kontrolle wurde der *S. epidermidis*-Stamm RP62A eingesetzt (K). Die Bakterien wurden in TSB-Medium unter Zugabe von 1 % Glukose kultiviert.

4.2.1.2. Hämolytische Aktivität der 8325 $\Delta arlR$ - und $\Delta arlS$ -Mutanten

Die Inaktivierung des *arlRS*-Zwei-Komponenten Systems in *S. aureus* durch Transposon-Insertion führte zu einer Erhöhung der hämolytischen Aktivität im *S. aureus*-Stamm 8325-4 (Fournier & Hooper, 2000). Die in dieser Arbeit hergestellten *arlR*- und *arlS*-Deletionsmutanten im Stamm 8325 sollten daher auf ihre hämolytischen Eigenschaften auf Schafsblut-Agarplatten überprüft werden. Nach Inkubation der Agarplatten ÜN bei 37°C wiesen die Mutanten im Vergleich zum Wildtypstamm eine deutlich verstärkte hämolytische Aktivität auf. Außerdem wurde die hämolytische Aktivität der 377 $\Delta arlR$ und der COL $\Delta arlS$ -Mutanten überprüft. Der wildtypische Stamm 377 wies nur eine sehr geringe Hämolyse auf, die in der Mutante nicht signifikant verändert erschien. Der Stämme COL und COL $\Delta arlS$ waren nach gleicher Inkubationszeit nahezu ahämolytisch.

4.2.1.3. Triton X-100 induzierte Autolyse der $\Delta arlR$ - und $\Delta arlS$ -Mutanten

Die *arl*-Transposon-Mutante im Stamm 8325 weist eine erhöhte autolytische Aktivität in einem Triton X-100-Autolyse-Assay auf (Fournier & Hooper, 2000). Die in dieser Arbeit hergestellten *arl*-Deletionsmutanten in den Stämmen 8325, COL und 377 und die isogenen Wildtypstämme wurden daher ebenfalls in einem Triton X-100-Assay auf die Induzierbarkeit der autolytischen Aktivität überprüft (Abb. 24). Die autolytische Aktivität von 8325 $\Delta arlR$ und 8325 $\Delta arlS$ konnte durch Triton X-100 deutlich erhöht werden (Abb. 24 A). Nach 60 min wiesen beide Mutanten eine Lysierung von 20-28 % auf, während der Wildtyp nur schwach lysierte (2 %). Die *arlS*-Deletion in dem Stamm COL und die *arlR*-Deletion im Stamm 377 führten jeweils zu einer gesteigerten Autolyse im Vergleich zu dem jeweiligen Wildtypstamm (Abb. 24 B u. C).

Ergebnisse

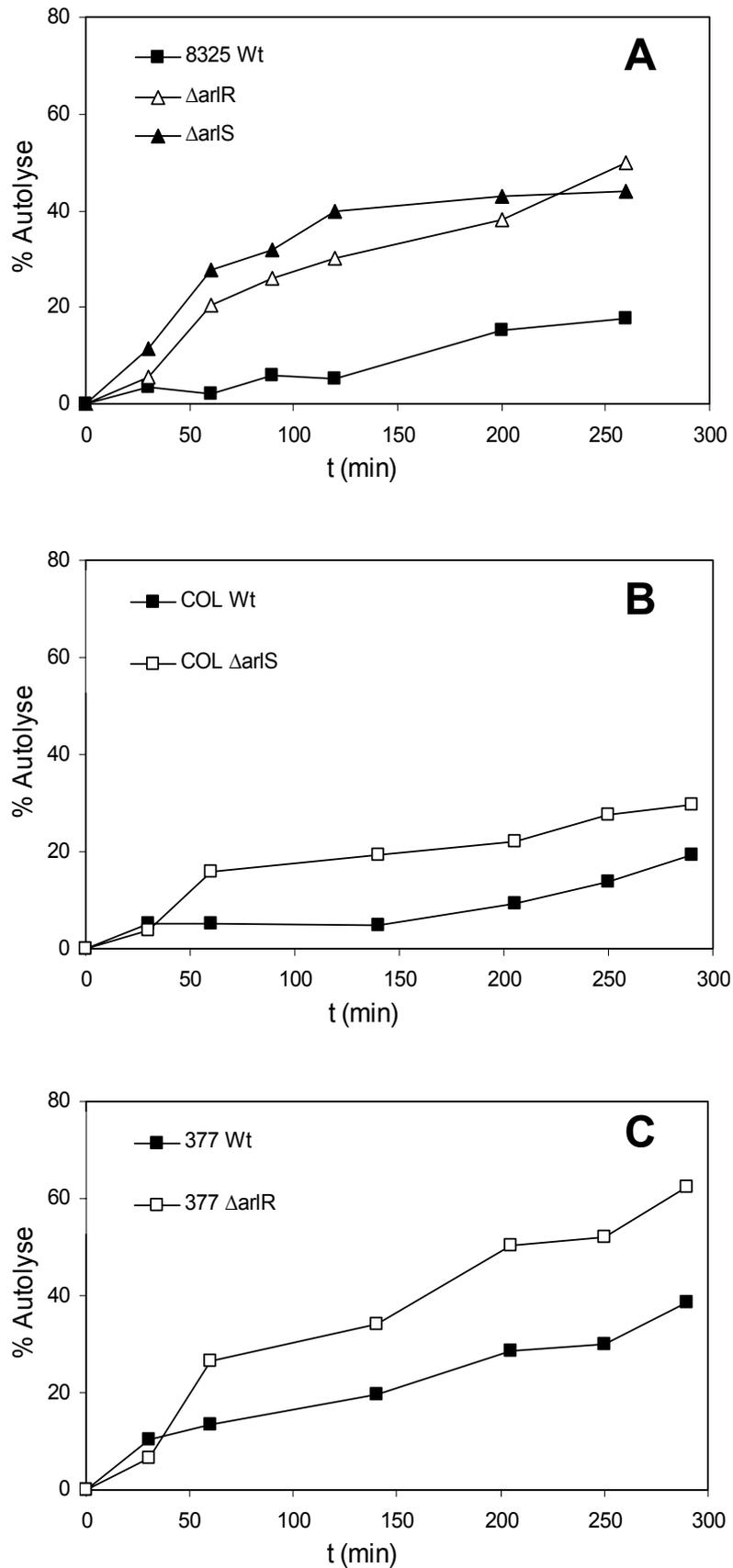


Abb. 24 Triton X-100 induzierte Autolyse der Stämme 8325 Wt (\blacklozenge), 8325 $\Delta arlR$ (\blacksquare) und komplementierter $\Delta clpP$ -Mutante (8325 $\Delta clpP^+$) (\blacktriangle). Bakterien wurden mit 0,1 % Triton X-100 bei 30°C in einem Schüttelinkubator kultiviert und Veränderungen in der optischen Dichte protokolliert (vgl. 3.7).

4.2.1.4. Internalisierung der 8325 $\Delta arlR$ - und $\Delta arlS$ -Mutante durch 293T-Zellen

Aufgrund der Rolle des ArIRS-Zwei-Komponenten Systems in der globalen Regulation der Virulenzfaktorexpression sollte die Internalisierungsrate der isogenen Wildtyp- und Mutantenstämme in humanen 293T-Epithelzellen untersucht werden (vgl. 3.8). Es zeigte sich, dass sowohl die 8325 $\Delta arlR$ - als auch die $\Delta arlS$ -Mutante weniger effizient von den Epithelzellen internalisiert wurden (Abb. 25). Obwohl die mikroskopische Kontrolle keine Schädigung der Epithelzellen erkennen ließ, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verminderte Anzahl der CFU der *arl*-Mutanten auf eine erhöhte *agr*-Expression und der damit verbundenen gesteigerten Aktivität extrazellulärer Virulenzfaktoren wie Proteasen und α -Hämolysin zurückzuführen ist. Weiterhin wurde die Internalisierung der Stämme COL, COL $\Delta arlS$, 377 und 377 $\Delta arlR$ überprüft. Aufgrund der geringen Invasivität der jeweiligen Wildtyp-Stämme ließen sich diese Versuche statistisch nicht auswerten.

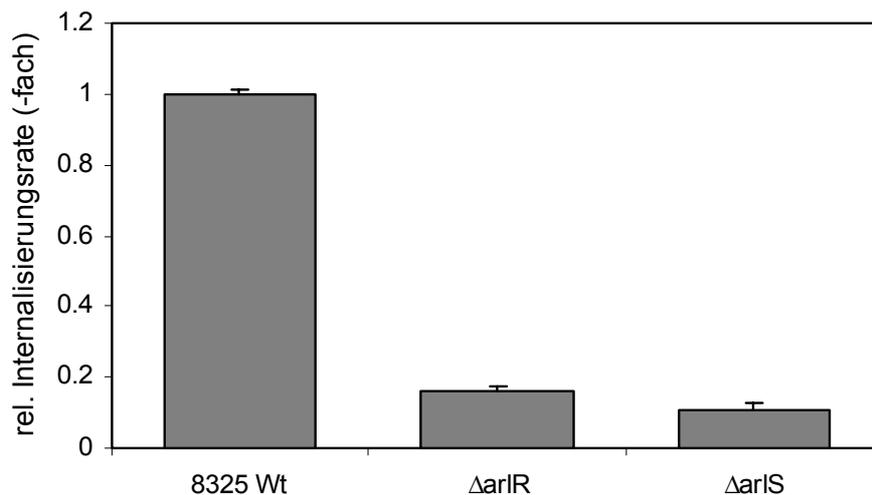


Abb. 25 Ermittlung der relativen Internalisierungsraten der Stämme 8325 $\Delta arlR$ und 8325 $\Delta arlS$ im Vergleich zum Wt in einem Zellkulturassay mit 293T-Zellen. Die Infektion wurde mit einer MOI von 20 durchgeführt.

4.2.1.5. Infektionsversuche mit den Mutanten 377 $\Delta arlS$ und COL $\Delta arlR$ in einem Katheter-assoziierten Infektionsmodell in Ratten

Um die Auswirkungen der *arlRS*-Inaktivierung *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Katheter-assoziiertes Infektionsmodell in Ratten verwendet (vgl. 3.9). Es sollte der Einfluss der *arl*-Deletion auf die Virulenz von zwei verschiedenen *S. aureus*-Stämmen untersucht werden. In diesem vorläufigen Experiment, wurden jeweils zwei Ratten in einem kompetitiven Ansatz infiziert. Dazu wurde eine aus *arl*-Mutante und isogenem Wildtyp (377 $\Delta arlS$ / 377 und COL $\Delta arlR$ / COL) gemischte Bakteriensuspension von jeweils $\sim 1e+03 - 1e+04$ CFU/ml für die Infektion eingesetzt. Die Suspension wurde für 15 min in dem Katheter belassen, um die initiale Adhäsion der Bakterien zu ermöglichen. 72 h nach der Infektion der Ratten wurde die Virulenz der *S. aureus*-

Ergebnisse

Stämme anhand der Multi-Organ-Besiedelung bestimmt. Dazu wurden Proben von Nieren, Lunge, Milz, Leber und Herz homogenisiert und für die Ermittlung der CFU von Wildtyp und Mutante pro Gramm Organ auf MKP-Agar-Platten sowie Em-haltigen TSB-Agar-Platten ausplattiert. Ebenso wurden das Blut und die Besiedelung der Katheter untersucht. In allen Proben wurden geringere CFU für die Mutanten beider Stämme im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp nachgewiesen (Abb. 26).

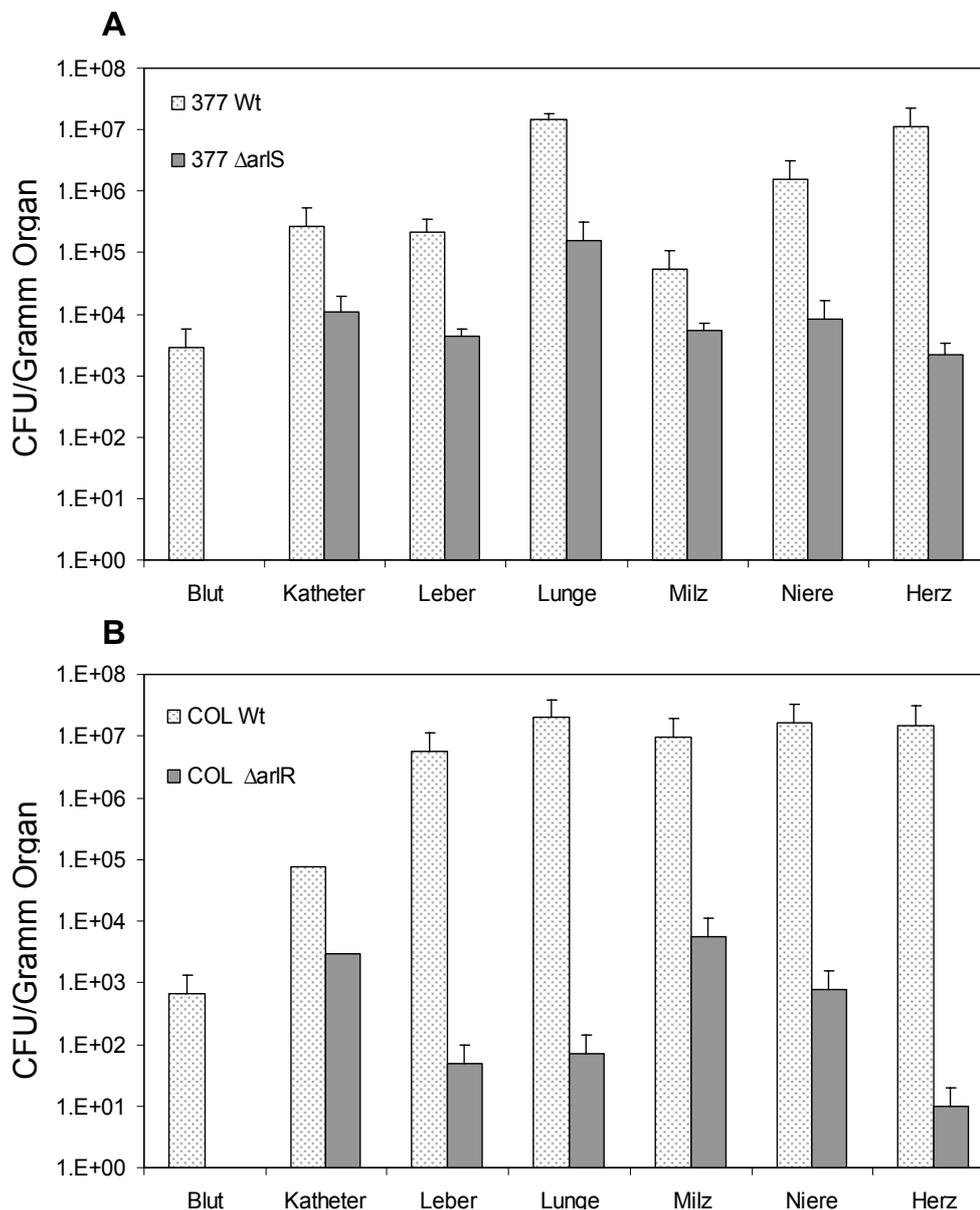


Abb. 26 Ermittlung der CFU pro Gramm Gewebe (Organe) und CFU pro ml (Blut/Katheter) der *arl*-Deletionsmutanten in den Stämmen 377 (A) und COL (B) in einem Katheter-assoziierten Infektionsmodell in Ratten.

4.2.2. Differenzielle Transkriptomanalyse der 8325 Δ arlR-Mutante mittels Microarray-Hybridisierung

Der Einfluss der Inaktivierung des ArlRS-Zwei-Komponenten Systems auf das Transkriptom mit besonderer Beachtung der Virulenzfaktorexpression von *S. aureus* sollte mit Hilfe der differentiellen Microarray-Hybridisierung analysiert werden (vgl. 3.2.). Dazu wurden Gesamt-RNA-Präparationen des Wildtyps 8325 und der isogenen Δ arlR-Mutante für die Synthese von cDNA-Sonden eingesetzt (vgl. 3.3.1.). Die Stämme wurden bei 37°C in LB-Medium kultiviert und das Zellmaterial für die Gesamt-RNA-Präparation in der exponentiellen Phase (OD1) und Anfang der stationären Phase (OD3) gewonnen. Für die Microarray-Analyse wurden jeweils drei verschiedene Hybridisierungen durchgeführt. Diese setzten sich aus jeweils drei unabhängigen Gesamt-RNA-Präparationen von Wildtyp und Mutante zusammen. Die Hybridisierungsexperimente und die anschließende Auswertung der Daten wurden wie unter 3.2 beschrieben durchgeführt. Nach Berechnung des Quotienten der Fluoreszenzsignale von Wildtyp gegen Mutante wurden Werte ≥ 2 als in der Δ arlR-Mutante erhöht und Werte $\leq 0,5$ als vermindert angesehen. Die Δ arlR-Mutante wies in der exponentiellen Phase eine 5 %-ige Veränderung des Transkriptionsprofils bezogen auf das N315-Gesamt-Genom auf. 3 % der Gene wurden erhöht und 2 % vermindert exprimiert (vgl. Anhang 7.2). Die Analyse der Daten zu Beginn der stationären Phase (OD3) wurden insgesamt 15 % der Gene im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich transkribiert. 5 % der Gene wiesen eine erhöhte und 10 % eine verminderte Expression auf.

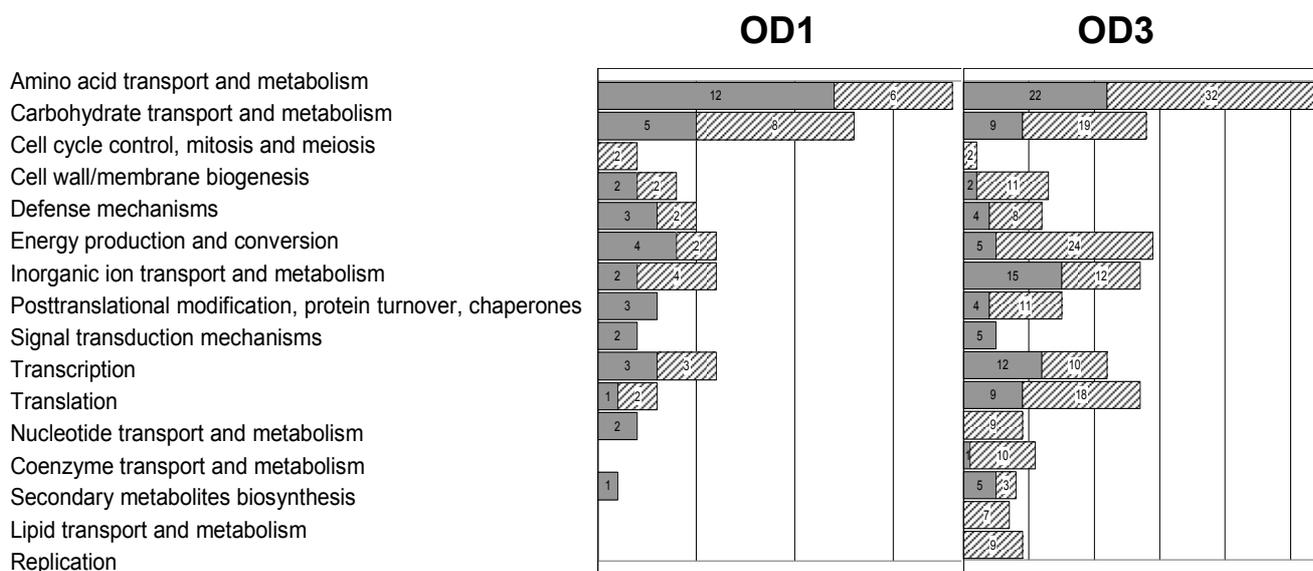


Abb. 27 Übersicht der Verteilung der in die Auswertung eingegangenen ORFs bezüglich ihrer funktionellen Einordnung. Einteilung in Kategorien wurde nach www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes

Ergebnisse

durchgeführt. Einzelne Buchstaben bezeichnen die COG („Cluster of Ortholog Genes“-)Kategorie. Die hellgraue Balken repräsentieren die in der $\Delta arlR$ -Mutante ermittelten ORFs mit verminderter Transkription (Signalquotient >2). Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die in $\Delta arlR$ ermittelten ORFs mit erhöhter Transkription (signalquotient $< 0,5$). Die Gesamtanzahl der deregulierten ORFs ist innerhalb der Balken angegeben. Von der Darstellung ausgeschlossen wurden bei OD1 insgesamt 61 hypothetische ORFs (30 ORFs $<0,5$ und 31 ORFs >2); bei OD3 wurden insgesamt 123 ORFs ausgeschlossen (42 ORFs $<0,5$ und 81ORFs >2).

Tabelle 19 Überblick der differenziell regulierten Transkription von Transkriptionsregulatoren in $\Delta arlR$

S. aureus-N315			Wtl $\Delta arlR$²	
ORF	Gen	Beschreibung¹	OD1	OD3
I: bei OD1 und OD3 erhöht				
SA1843	<i>agrC</i>	accessory gene regulator C	0.1	0.1
SA1844	<i>agrA</i>	accessory gene regulator A	0.3	0.2
SA1748	-	HP, similar to transcription regulator, GntR family	0.1	0.4
SA1883	<i>kdpE</i>	KDP operon transcriptional regulatory protein KdpE	0.4	0.3
SA2320	-	HP, similar to regulatory protein pfoR	0.2	0.2
II: bei OD1 und OD3 vermindert				
SA0641	<i>rat/mgrA</i>	CHP, similar to transcriptional regulator	3.2	2.3
III: bei OD1 erhöht nicht reguliert bei OD3				
SA0187	-	HP, similar to transcription regulator	0.2	n.r.
V: OD1 nicht reguliert und bei OD3 vermindert				
SA0298	-	HP, similar to regulatory protein PfoR	n.r.	2.5
SA0480	<i>ctsR</i>	transcription repressor of class III stress genes homologue	n.r.	4.0
SA0857	<i>mecA</i>	HP, similar to negative regulator of genetic competence MecA	n.r.	2.2
SA1120	-	HP, similar to transcription regulator GntR family	n.r.	2.4
SA1289	-	HP, similar to bifunctional biotin ligase/biotin operon repressor	n.r.	2.0
SA1947	<i>czrA</i>	repressor protein	n.r.	4.0
SA2159	-	HP, similar to transcription repressor of sporulation, septation and degradation <i>paiA</i>	n.r.	2.2
IV: bei OD1 nicht reguliert und bei OD3 erhöht				
SA0434	-	HP, similar to trehalose operon transcriptional repressor	n.r.	0.5
SA0653	-	HP, similar to transcription repressor of fructose operon	n.r.	0.5
SA1246	<i>arlS</i>	putative protein histidine kinase ArlS	n.r.	0.2
SA1591	<i>arsR</i>	arsenical resistance operon repressor homolog	n.r.	0.4
SA2062	<i>sarV</i>	HP	n.r.	0.1
SA2089	<i>sarR</i>	staphylococcal accessory regulator A homolog	n.r.	0.4
SA2108	-	HP, similar to transcription regulator, RpiR family	n.r.	0.2
SA2179	-	HP, similar to response regulators of two-component regulatory	n.r.	0.3
SA2180	-	HP, similar to two component sensor histidine kinase	n.r.	0.3
SA2308	-	HP, similar to transcription regulator MarR family	n.r.	0.4

1: CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **2:** Der Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante >2 bedeutet in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 erhöht exprimiert

4.2.2.1. Einfluss der *arlR*-Deletion auf die Transkription von Virulenzfaktoren

Die Deletion des Gens *arlR* führt zu einer Veränderung der Transkription verschiedener Virulenzfaktor-assoziiierter Gene (Tabelle 20). 19 ORFs werden zu den beiden getesteten Wachstumsphasen (OD1 und OD3) gleich im Vergleich zum Wildtyp reguliert. 15 Gene, die überwiegend für Exoenzyme und Toxine kodieren,

Ergebnisse

werden erhöht und nur 4 vermindert transkribiert. Gene die in der exponenziellen Phase verstärkt exprimiert werden und in der stationären Phase im Vergleich zum Wildtyp unverändert sind kodieren für die Adhäsine *clfA*, *clfB* und *sdrC*. Zu den Genen, die in der exponenziellen Phase unverändert, aber in der stationären Phase erhöht transkribiert werden, gehören die Adhäsine *fnb*, *fnbB* und *ebhA* sowie die Gene der extrazellulären Proteasen *sspB* und Staphopain. Die Gene *nuc* und *isaA* sowie weitere Gene für hypothetische Virulenzfaktoren wurden in der stationären Phase vermindert und in der exponenziellen Phase unverändert exprimiert. Es wurden keine Gene identifiziert, deren Expression in der exponenziellen Phase vermindert und in der stationären Phase erhöht exprimiert gewesen wäre.

Tabelle 20 Überblick der differentiellen Transkription von Virulenz-assoziierten Genen in 8325 Δ *arlR* in zwei verschiedenen Wachstumsphasen

S. aureus-N315 Beschreibung¹		Wt/ Δ<i>arlR</i> <i>agr</i>³		
ORF	Gen	OD1	OD3	
I: bei OD1 und OD3 erhöht				
Exoenzymes:				
SA0222	<i>coa</i> staphylocoagulase precursor	0.5	0.5	up ^N
SA0309	<i>geh</i> glycerol ester hydrolase	0.5	0.4	up ^{DN}
SA0901	<i>sspA</i> serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase	0.4	0.3	
SA1629	<i>spIC</i> serine protease SpIC	0.4	0.5	up ^N
SA2463	<i>lip</i> triacylglycerol lipase precursor	0.1	0.2	up ^{DN}
Adhesins				
SA1268	<i>ebhB</i> HP, similar to streptococcal adhesin emb	0.4	0.1	up ^D
SA2447	<i>hsa</i> HP, similar to streptococcal hemagglutinin protein	0.2	0.3	up ^{DN}
Toxins				
SA1007	<i>hla</i> Alpha-Hemolysin precursor	0.1	0.1	up ^{DN}
SA1638	<i>lukE</i> leukotoxin LukE	0.4	0.2	
SA1752	<i>hIb</i> truncated beta-hemolysin	0.2	up	up ^N
SA1811	<i>hIb</i> truncated beta-hemolysin	0.5	0.0	up ^N
SA2208	<i>hlgC</i> gamma-hemolysin component C	0.2	0.1	up ^{DN}
SA2209	<i>hlgB</i> gamma-hemolysin component B	0.2	0.1	up ^{DN}
Others				
SA2337	<i>feoB</i> ferrous iron transport protein B homolog	0.3	0.1	
SA0891	- HP, similar to ferrichrome ABC transporter	0.4	0.2	
II: bei OD1 und OD3 vermindert				
SA0566	- HP, similar to iron-binding protein	2.2	2.5	
SA0841	- HP, similar to cell surface protein Map-w	3.7	5.5	
SA2356	<i>isaA</i> immunodominant antigen A	2.6	2.7	
SA2430	<i>aur</i> zinc metalloproteinase aureolysin	4.6	2.2	up ^{DN}
III: bei OD1 erhöht nicht reguliert bei OD3				
Adhesins				
SA0519	<i>sdrC</i> Ser-Asp rich fibrinogen-binding, bone sialoprotein-binding protein	0.4	n.r.	
SA0742	<i>clfA</i> fibrinogen-binding protein A, clumping factor	0.5	n.r.	
SA2423	<i>clfB</i> Clumping factor B	0.4	n.r.	up ^D

Ergebnisse

<i>S. aureus</i> -N315 Beschreibung ¹			Wt/ $\Delta arlR$ agr ³	
ORF	Gen		OD1	OD3
IV: bei OD1 nicht reguliert und bei OD3 erhöht				
Adhesins				
SA1267	<i>ebhA</i>	HP, similar to streptococcal adhesin emb	n.r.	0.0
SA2290	<i>fnbB</i>	fibronectin-binding protein homolog	n.r.	0.2
SA2291	<i>fnb</i>	fibronectin-binding protein homolog	n.r.	0.3
Exoenzymes				
SA0900	<i>sspB</i>	cysteine protease precursor	n.r.	0.3 up ^{DN}
SA1725	-	Staphopain, Cysteine Proteinase	n.r.	0.4
V: OD1 nicht reguliert und bei OD3 vermindert				
Exoenzymes				
SA0746	<i>nuc</i>	staphylococcal nuclease	n.r.	3.6
SA2323	-	CHP	n.r.	2.1
Others				
SA2097	-	HP, similar to secretory antigen precursor SsaA	n.r.	3.1
SA2431	<i>isaB</i>	immunodominant antigen B	n.r.	2.1
SA0217	-	HP, similar to periplasmic-iron-binding protein BitC	n.r.	2.1
SA0406	-	HP	n.r.	3.0
SA0276	-	CHP, similar to diarrheal toxin	n.r.	6.3

1: CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **2:** Der Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante >2 bedeutet in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 erhöht exprimiert **3:** agr-reguliert nach D: (Dunman *et al.*, 2001) und N: (Novick, 2003b).

4.2.2.2. Auswirkung der *arl*-Inaktivierung auf die RNAIII-Expression in 8325 $\Delta arlR$

Die RNAIII-Expression in den 8325 $\Delta arlR$ - und der 8325 $\Delta arlS$ -Mutanten wurde mittels Northern Blot-Analyse überprüft. Es zeigte sich, dass in der exponentiellen Phase (OD1) und in der frühen stationären Phase (OD3) im Vergleich zum Wildtypstamm 8325 die RNAIII-Konzentration deutlich erhöht ist.

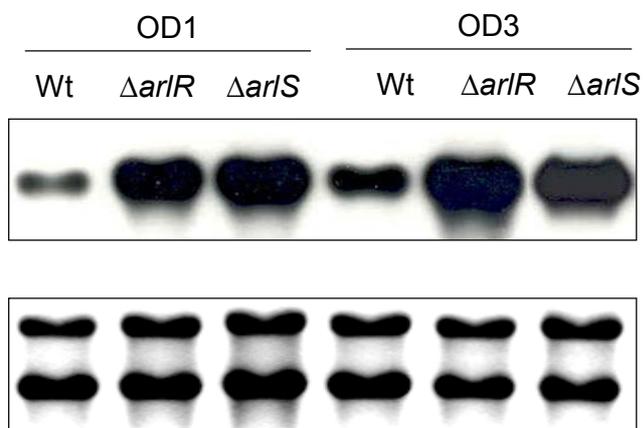


Abb. 28 Northern Blot-Analyse der Auswirkung der *arlR*- und *arlS*-Inaktivierung auf die RNAIII-Expression in den Stämmen 8325 und COL in der exponentiellen und frühen stationären Phase (OD₆₀₀=1 und OD₆₀₀=3)

4.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 4.2

Deletion der Gene *arlR* und *arlS* in *S. aureus* führte zu

- einer gesteigerten Fähigkeit an Polystyren zu adhären im Stamm 8325, jedoch nicht in den Stämmen COL, Wood 46 und 377
- einer verstärkten hämolytischen Aktivität im Stamm 8325, jedoch nicht in den Stämmen COL und 377
- einer erhöhten Triton X-100 induzierbaren Autolyse in den Stämmen 8325, COL und 377
- einer Verminderung der Aufnahme durch 293T-Zellen in einem Zellkulturassay
- einer verminderten Virulenz in den Stämmen 377 und COL in einem Katheter-
verwandten Infektionsmodell in Ratten
- der Veränderung des Transkriptionsprofils um 5 % in der exponentiellen
Wachstumsphase sowie um 15 % in der stationären Phase in dem Stamm
8325 Δ arlR
- erhöhter RNAlII-Expression im Stamm 8325

4.3. Herstellung und Überprüfung der *putP*- und *purH*-Deletionsmutanten

Die Klonierung der *putP*- und *purH*-Deletionsvektoren und die Isolierung der Deletionsmutanten wurde wie unter 3.2 beschrieben durchgeführt. Als Zielstamm wurde der *S. aureus*-Stamm 8325 eingesetzt. Isolierte Em-resistente und Cm-sensitive Klone aus beiden Ansätzen wurden mittels PCR und Southern Blot überprüft (Abb. 29 und Abb. 30).

***putP*:** Für die Herstellung des *putP*-Integrationsvektors pMA Δ *putP* wurden mittels PCR ein *putP*-Upstreamfragment (~1 kb) mit den modifizierten Primern putP1/*Hind*III und putP2/*Bam*HI und für das Downstreamfragment (~1 kb) die Primer putP3/*Pst*I und putP4/*Eco*RI eingesetzt. Nach Fertigstellung des Vektors, erfolgreicher Transformation in den Stamm 8325 und anschließender Kultivierung bei 42°C wurden Em-resistente und Cm-sensitive Klone mittels PCR und Southern Blot überprüft. Für die PCR wurden zunächst Primer gewählt, die innerhalb des *putP*-Gens positioniert waren (putP7-putP8). Mit dieser Primerkombination konnte nur im Wildtyp ein Produkt (A: 0,89 kb) nachgewiesen werden (Abb. 29). Für den Nachweis der korrekten Positionierung der integrierten *ermB*-Kassette wurden zwei weitere Primerkombinationen gewählt (B, C). Der im Upstreambereich gelegene Primer putP6 und der in Gegenrichtung innerhalb der *ermB*-Kassette gelegene Primer erm5 ergaben ein Produkt von 1,42 kb (B). Eine weitere Primerkombination im Downstreambereich (erm10-putP5) ergab ein Produkt von 1,39 kb (C). Für die Southern Blot-Analyse wurden die chromosomale DNA des Wildtypstammes 8325 und die der drei Klone mit *Ac*I gespalten. Die Hybridisierung mit einer *ermB*-spezifischen Sonde im Wildtyp kein Signal (II), dagegen konnte bei den Δ *putP*-Mutanten ein Signal bei 2,3 kb nachgewiesen werden.

Ergebnisse

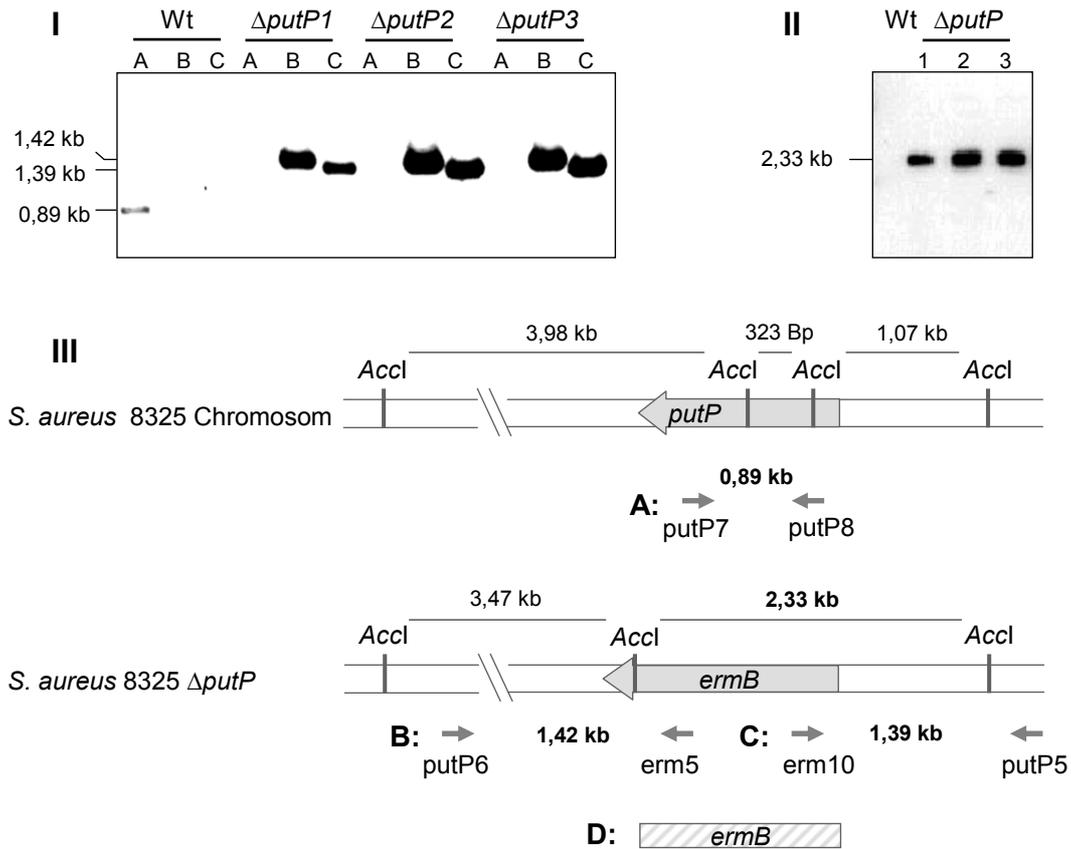


Abb. 29 I: Überprüfung von drei $\Delta putP$ -Mutanten ($\Delta putP1-3$) mittels PCR. Für den PCR-Nachweis verwendete Primerkombination und Lage im *S. aureus*-Chromosom (siehe III, A-C). **II:** Southern Blot-Analyse des Wildtypstammes *S. aureus* 8325 und der Klone $\Delta putP1-3$. Chromosomale DNA wurde mit *AccI*-gespalten und mit einer *ermB*-spezifischen Sonde (siehe III D) hybridisiert. **III:** Übersicht über die wildtypische Sequenz von *putP* und Umgebung. Lage der Schnittstellen, Primer-Kombination (A-C) und *ermB*-Sonde (D).

purH: Für die Herstellung des *purH*-Deletionsvektors pMA $\Delta purH$ wurden ein *purH*-Upstreamfragmentes (~1,2 kb) mit den Primern *purH1/EcoRI* und *purH2/BamHI* und das Downstreamfragment (~12 kb) mit *purH3/PstI* und *purH4/HindIII* amplifiziert. Die Überprüfung von drei potenziellen $\Delta purH$ -Mutanten erfolgte analog zu der bereits beschriebenen Analyse der $\Delta putP$ -Mutanten (s. o. und Abb. 30). Mit den Primerkombinationen *purH7-purH8* (A), *purH6-erm5* (B) und *erm10-purH5* (C) konnte die erfolgreiche Integration der *ermB*-Kasstte mittels PCR nachgewiesen werden Lage und Größe der Produkte, siehe Abb. 30 I u. III). Für die Southern Blot-Analyse wurde die chromosomale DNA mit *EcoRV* gespalten. Der Einsatz einer *ermB*-spezifischen Sonde erbrachte kein Signal im Wildtyp und ein Signal bei ~5,5 kb in den drei $\Delta purH$ -Mutanten. Für der Überprüfung der Auswirkung der *purH*-Deletion *in vivo* in einem Tiermodell sollte *purH* in dem Stamm MA12 deletiert werden. Dazu wurde der Stamm 8325 $\Delta purH$ als Spenderstamm für die Transduktion der Mutation unter Einsatz des

Ergebnisse

Phagens $\Phi 85$ in den Stamm MA12 eingesetzt. Eine MA12 $\Delta purH$ -Mutante konnte erfolgreich isoliert werden und wurde mittels Southern Blot-Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).

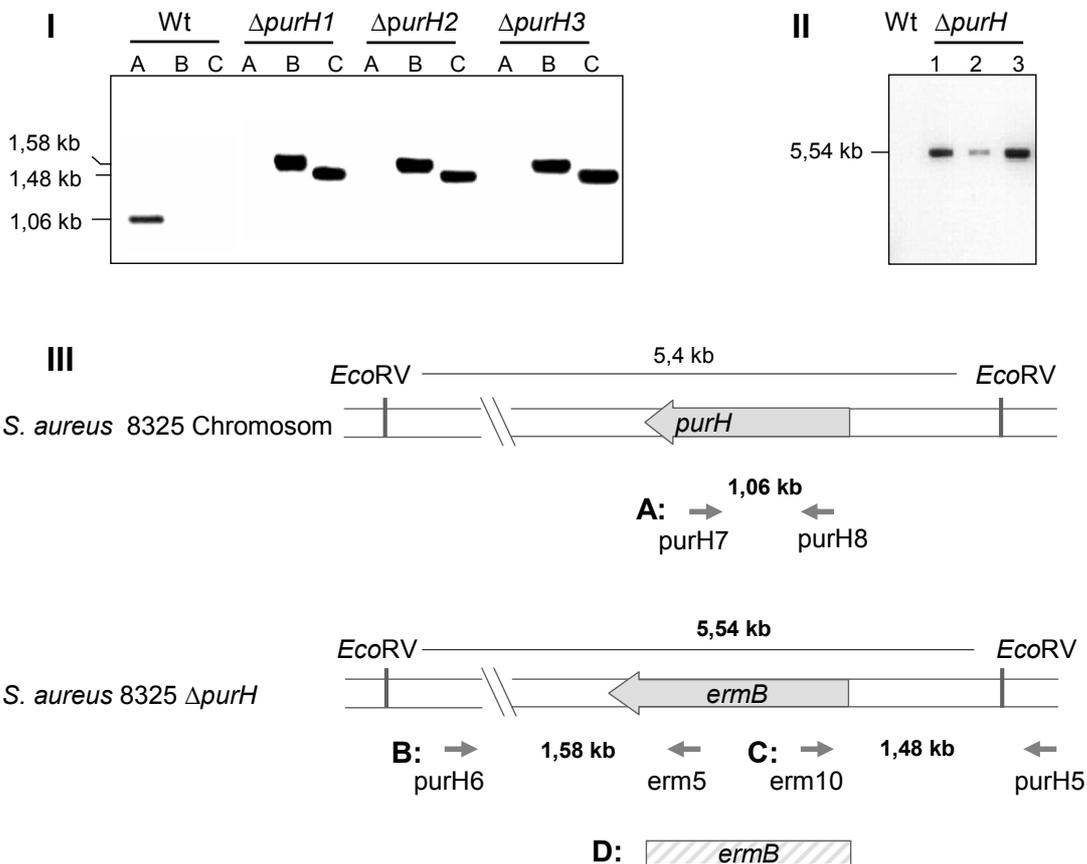


Abb. 30 I: Überprüfung von drei $\Delta purH$ -Mutanten ($\Delta purH1-3$) mittels PCR. Für den PCR-Nachweis verwendete Primerpaare und Lage im *S. aureus*-Chromosom (siehe III, A-C). II: Southern Blot-Analyse des Wildtypstammes *S. aureus* 8325 und der Klone $\Delta purH1-3$. Chromosomale DNA wurde mit *Accl*-gespalten und mit einer *ermB*-spezifischen Sonde (siehe III D) hybridisiert. III: Übersicht über die wildtypische Sequenz von *purH* und Umgebung. Lage der Schnittstellen, Primer (A-C) und *ermB*-Sonde (D).

Die 8325 $\Delta putP$ -, die 8325 $\Delta purH$ - und die MA12 $\Delta purH$ -Mutanten wurden jeweils phänotypisch untersucht. Dazu wurden Wachstumsexperimente unter Veränderung verschiedener Parameter wie Temperatur (30°C, 37°C, 42°C, 45°C) und Osmolarität (1 M NaCl) durchgeführt. Dabei konnten keine Veränderungen im Wachstumsverlauf im Vergleich zum isogenen Wildtyp festgestellt werden. Weitere Experimente, in denen die Mutanten auf ihr Fähigkeit an Polystyren zu adhären und auf ihre hämolytische Aktivität überprüft wurden, ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. In einem Zellkulturassay wurden die 8325 $\Delta putP$ - und die 8325 $\Delta purH$ -

Mutanten auf Veränderungen der Internalisierungsrate durch 293T-Zellen getestet. Es konnten auch hier keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

4.3.1. Infektionsversuche mit der Mutante MA12 Δ *purH* in einem Rattenmodell

Die Δ *purH*-Mutanten in den Stämmen 8325 und MA12 wiesen *in vitro* keine phänotypischen Veränderungen auf. Die Fähigkeit des Stammes MA12 Δ *purH* eine Infektion *in vivo* zu etablieren, sollte in einem Rattenmodell überprüft werden. Die Versuche wurden von Dr. Christian Hüttinger wie unter 3.9 beschrieben durchgeführt. Es wurden Infektionsversuche mit den jeweiligen Stämmen im Einzelexperiment und in einem kompetitiven Ansatz in Ratten durchgeführt. Dazu wurden $\sim 1 \times 10^{10}$ CFU/ml Wildtyp- und *purH*-Mutante intraperitoneal infiziert. Nach vier Tagen wurden die Ratten euthanasiert und die Keimzahl von Wildtyp und Mutante in den Organen durch differenzielle Ausplattierung auf MKP- und Em-haltigen TSB-Platten bestimmt. Dabei ergaben sich signifikante Unterschiede bei der Besiedelung der einzelnen Organe durch Wildtyp und *purH*-Mutante. Nach Ermittlung der Keimzahlen pro Gramm Organ zeigte sich, dass der Stamm MA12 Δ *purH* im Vergleich zum wildtypischen Stamm MA12 eine deutliche Attenuierung der Kolonisierung der einzelnen Organe aufwies (Abb. 31). In Leber und Milz wurden jeweils 10^3 bis 10^4 -fach weniger CFU der *purH*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. In Lunge, Herz und Nieren konnte keine Besiedelung durch MA12 Δ *purH* festgestellt werden. In allen Konkurrenzexperimenten war die Menge an wildtypischen Bakterien mindestens die 100-fache Menge an Mutantenbakterien (Daten nicht gezeigt).

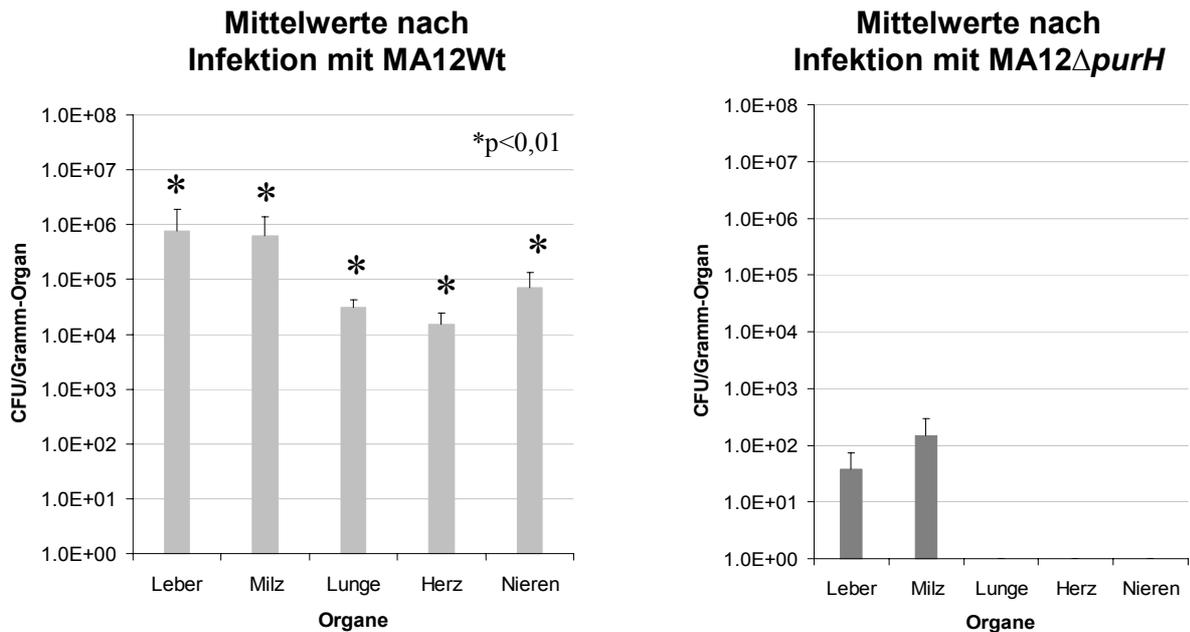


Abb. 31 Der Einfluss der *purH*-Deletion auf die Kolonisierung der Organe in einem Rattenmodell. Ermittlung der CFU pro Gramm Organ der Stämme MA12 und MA12Δ*purH* in Einzelexperimenten. Die Infektion erfolgte mit ~2e+10 CFU/ml Bakteriensuspension.

4.3.2. Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 4.3

- Die Gene *putP* und *purH* sind nicht essenziell *in vitro* und die Deletion der Gene führt zu keinen phänotypischen Veränderungen unter Laborbedingungen.
- Das Gen *purH* ist essenziell für die Kolonisierung der Organe *in vivo*. In einem Ratten-Infektionsmodell führte die Deletion von *purH* zu einer ~10³ bis 10⁴-fachen Attenuierung in Leber und Milz und zu der Unfähigkeit der Mutante Lunge, Herz und Nieren zu besiedeln.

4.4. Inaktivierung der Gene *ssrA* und *smpB*

Das SsrA-SmpB-System stellt ein Protein-Qualitätskontrollsystem dar, das maßgeblich für die Freisetzung blockierter Ribosomen verantwortlich ist (zur Übersicht Muto *et al.*, 1998; Karzai *et al.*, 2000; Vioque & de la Cruz, 2003). Aufgrund der fundamentalen Rolle im bakteriellen Translationsprozess, zählt es zu den putativen Targets für die Entwicklung antibakterieller Therapien. Ungeklärt ist bislang, welche Auswirkung die Inaktivierung dieses Systems in *S. aureus* hat.

4.4.1. Herstellung der *smpB::ermB*- und *ssrA::ermB*-Insertionsmutanten in *S. aureus* MA12 und COL

Für die Inaktivierung der Gene *smpB* und *ssrA* wurden zunächst Vektoren konstruiert, die eine Inaktivierung des jeweiligen Gens durch Insertion einer Erythromycin-Resistenzkassette (*ermB*) durch homologe Rekombination (doppelter Crossover) von entsprechenden Up- und Downstreambereichen von ca. 1 kb Länge erlauben. Als Insertionsstelle für die *ermB*-Kassette wurden in der jeweiligen Gensequenz vorhandene Restriktionsschnittstellen ausgewählt.

***smpB* (SA0736):** Für die Konstruktion des Insertionsvektors pMA*smpB*I wurden zunächst mit den Primern *smpB*1 und *smpB*2, an Position -577 und +1372 relativ zum Startcodon, ein 1948 Bp Fragment mittels PCR amplifiziert. Nach Kontrolle des Produkts mittels Agarosegelelektrophorese wurde es in den Vektor pGEM-T Easy ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Klone wurden mit Hilfe von X-Gal/IPTG/Amp-Platten selektioniert und das isolierte Plasmid mittels Restriktionsspaltung mit *Eco*RI überprüft. Anschließend wurde das rekombinante Plasmid mit *Hind*III linearisiert und dephosphoryliert. Die *ermB*-Kassette wurde aus dem bereits vorliegenden Vektor pHW2 mit *Hind*III gespalten und in den pGEM-T*smpB* Vektor ligiert, um den Vektor pGEM-T*smpB*I herzustellen. Klone wurden auf Amp/Em-Platten selektioniert. Um die relative Lage der klonierten Fragmente zueinander zu klären, wurde per PCR unter Verwendung der Primerpaare *smpB*1-*erm*10 (*smpB*1: -577, *erm*10: +201) und *smpB*1-*erm*5 (*erm*5: +1161) die Lage der *ermB*-Kassette im Verhältnis zu dem *smpB*-Fragment ermittelt (Abb. 33). Da nur die Primerpaarung *smpB*1 und *erm*10 ein spezifisches Produkt ergab, konnte gezeigt werden, dass die *ermB*-Kassette in gleicher Richtung wie das *smpB*-Fragment im Vektor orientiert vorliegt. Anschließend sollte das rekombinante Insert mit *Eco*RI geschnitten und in den mit *Eco*RI linearisierten und mit alkalischer Phosphatase behandelten pBT2-Vektor ligiert

werden. Allerdings ließen sich auf Amp/Em-Platten nur pGEM-T*smpB*-Religanten isolieren. Daher wurde ein Zwischenschritt eingeführt, indem das Insert in den Vektor pBCSK umklont wurde und Klone auf Cm-Platten selektioniert wurden. Um eine klare Trennung des Inserts mit einer Länge von 3,35 kb von dem Vektor pBCSK mit einer Größe von 3,4 kb zu gewährleisten, wurde ein Restriktionsansatz mit *EcoRI* und *PvuII* durchgeführt. Aufgrund von drei *PvuII* Schnittstellen innerhalb der pBCSK-Vektorsequenz, konnte eine Fragmentierung des Plasmids und eine Isolierung des Inserts mittels Agarosegelelektrophorese erzielt werden. Das gereinigte Insert wurde daraufhin in den mit *EcoRI* linearisierten pBT2 ligiert und in *E. coli* transformiert. Klone wurden auf Amp/Em-Platten selektioniert. Um die Lage des Inserts relativ zum Vektor zu bestimmen, wurde ein Restriktionsansatz mit *SnaBI* durchgeführt. Da innerhalb der *ermB*-Kassette an Position +1,2 und im Plasmid bei 1,9 kb jeweils eine *SnaBI*-Schnittstelle vorhanden ist, konnte aufgrund der Fragmentgrößen von 3,2 und 7,2 kb eine Lage in Gegenrichtung relativ zu den Replikationsstartpunkten ermittelt werden.

ssrA (SATmRNA01): Für die Klonierung des *ssrA*-Integrationsvektors wurde mit den Primern *ssrA1* und *ssrA2*, an Position -1044 und +1141 relativ zur Startsequenz ein 2,2 kb-Fragment mittels PCR amplifiziert, in den Vektor pGEM-T Easy ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Nach Selektion rekombinanter Klone auf X-Gal/IPTG/Amp-Platten wurde das Insert mit *EcoRI* aus dem Vektor gespalten und in den ebenfalls mit *EcoRI* gespaltenen und mit alkalischer Phosphatase behandelten Vektor pBT1 ligiert. Für die Insertion der *ermB*-Kassette in das *ssrA*-Fragment wurde eine *SacI*-Schnittstelle an Position +32 gewählt. Daher konnte nicht der Vektor pBT2 eingesetzt werden, da dieser über eine *SacI*-Schnittstelle in der „Multi Cloning Site“ verfügt. Nach Kontrolle des entstandenen Vektors pBT1*ssrA*, wurde dieser mit *SacI* linearisiert, mit alkalischer Phosphatase behandelt und aufgereinigt. Die *ermB*-Kassette wurde mit Hilfe einer PCR mit den modifizierten Primern *erm3* und *erm4* aus dem Vektor pEC1 amplifiziert und mit *SacI*-Schnittstellen versehen. Nach Ligation und Transformation konnte so der Vektor pAM*ssrA*I durch Selektion der Klone auf Amp/Em-Platten erhalten werden. Die gleichgerichtete Lage der *ermB*-Kassette relativ zur Lage des *ssrA*-Fragments wurde mittels PCR mit den Primern *ssrA1* (-1044) und *erm10* (+201) bestätigt. Durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym *SnaBI*, das an Position +1,2 in der *ermB*-Sequenz und im Vektor bei 1,9 kb schneidet, wurde

Ergebnisse

eine Orientierung in gleicher Richtung relativ zu den Replikationsstartpunkten ermittelt.

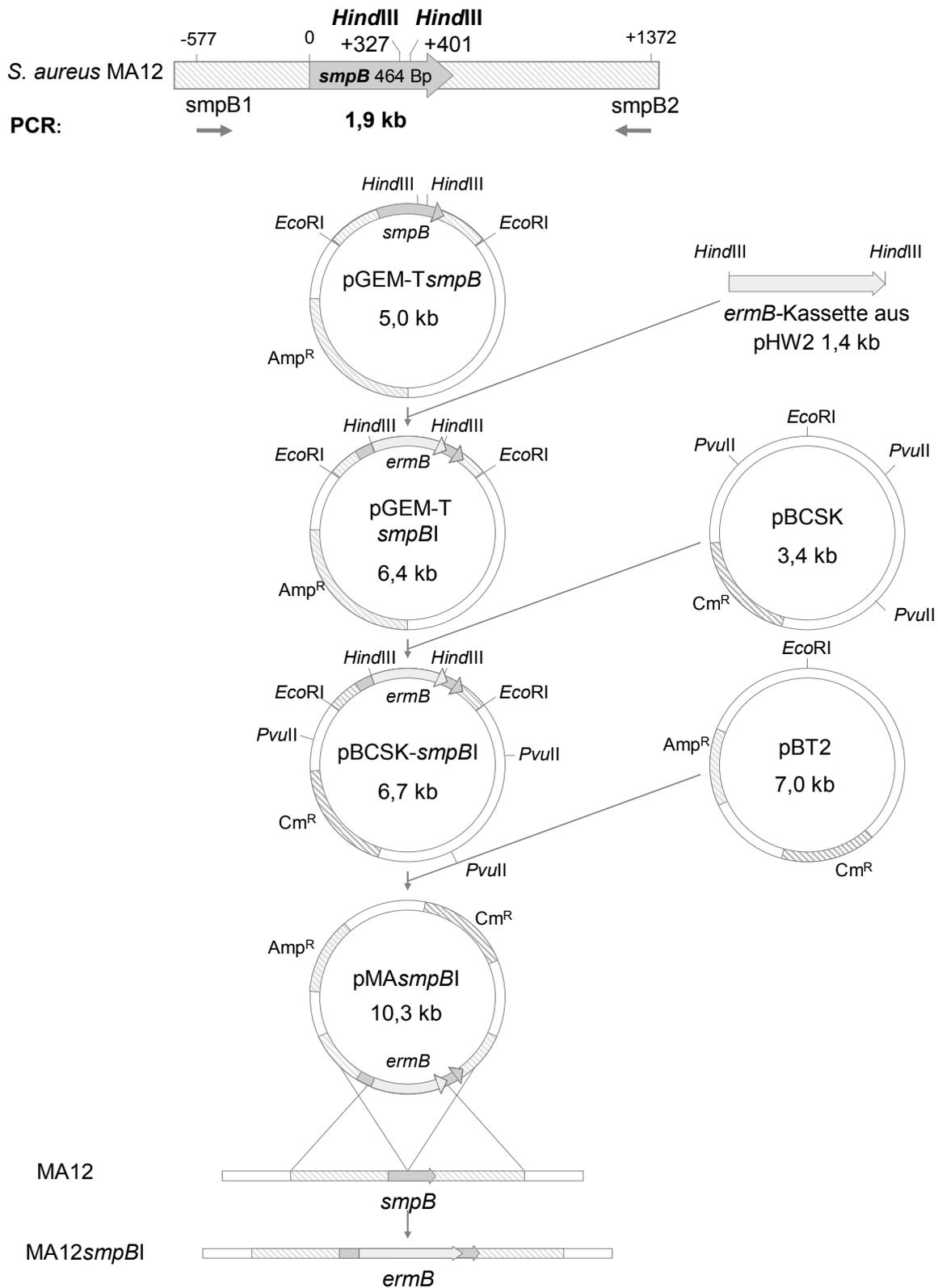


Abb. 32 Klonierungsstrategie für die Herstellung des pMA *smpBI*-Insertionsvektors und anschließende Integration der *ermB*-Kassette in das Genom von *S. aureus* MA12. Erläuterungen siehe Text.

Ergebnisse

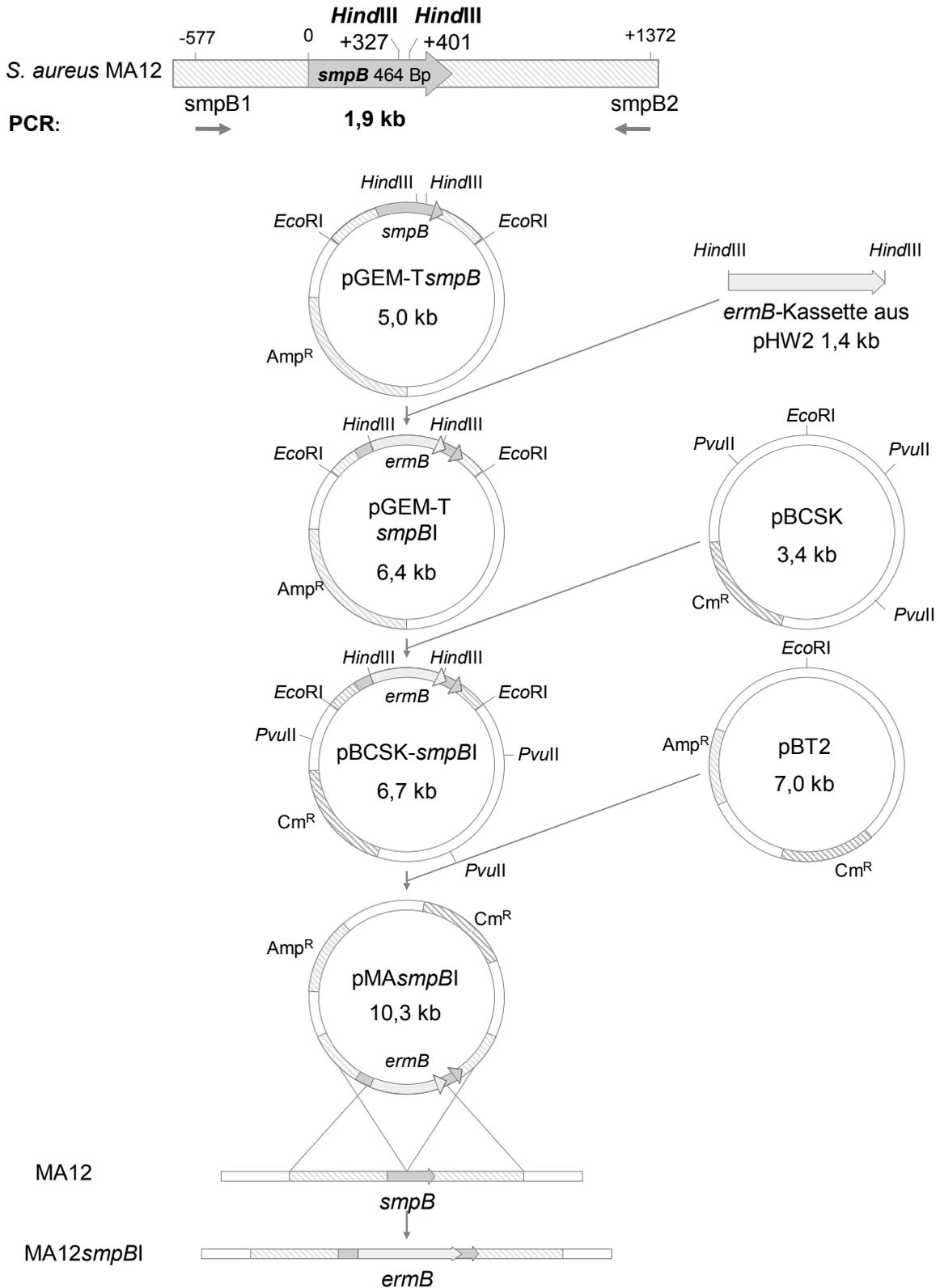


Abb. 33 Klonierungsstrategie für die Herstellung des pMA*ssrAI*-Insertionsvektors und anschließende Integration der *ermB*-Kassette in das Genom von *S. aureus* MA12. Erläuterungen siehe Text.

Die verwendeten Vektoren pBT2 und pBT1 sind sogenannte „Shuttle-Vektoren“, die über zwei, jeweils für gramnegative und grampositive Bakterien geeignete

Ergebnisse

Replikationsstartpunkte verfügen und daher für beide Organismengruppen einsetzbar sind. Nach den in *E. coli* durchgeführten Klonierungsschritten zur Erstellung der Insertionsvektoren pMA*smpBI* und pMA*ssrAI* durch Selektion der rekombinanten Klone mit Ampicillin und Erythromycin (jeweils 100 µg/ml), wurden in *S. aureus* rekombinante Klone mit Chloramphenicol und Erythromycin (10 µg/ml Cm, 10 µg/ml Em) selektiert. Die Plasmide wurden dazu zunächst in den restriktionsnegativen Stamm RN4220 mittels Elektroporation transformiert (3.1.11). Überprüfte rekombinante Klone wurden im nächsten Schritt dazu verwendet die Plasmide mit Hilfe von Phagenisolat Φ85 in den gewünschten *S. aureus*-Zielstamm zu transduzieren (3.1.11.5). Aufgrund der Schwierigkeit bestimmte *S. aureus*-Stämme genetisch zu manipulieren, wurden zwei verschiedene *S. aureus*-Isolate eingesetzt (COL und MA12). Für die Integration der Insertionskonstrukte in das Genom wurden überprüfte Klone über 3 - 4 Tage unter geringem Selektionsdruck (2 - 5 µg/ml Em) bei 42°C passagiert (3.2.2). Anschließend wurden Aliquots auf Em-Platten ausplattiert und mehrere Tausend Klone auf ihre Em-Resistenz und Cm-Sensitivität überprüft. Erst nach mehrfacher Wiederholung der Integrationszyklen mit Variationen der Em-Konzentration, Temperatur und unter der Verwendung zwei verschiedener *S. aureus*-Stämme konnte eine *smpB::ermB*-Insertionsmutante im Stamm MA12 hergestellt werden. Die potenzielle Mutante wurden mittels Southern Blot-Analyse überprüft und bestätigt (Abb. 34). Die Analyse des *ssrA*-Transkripts mittels Northern Blot-Hybridisierung ergab ein Signal von ca. 0,4 kb im Wildtyp und ca. 1,7 kb in der Mutante. Eine weitere Hybridisierung mit einer *ermB*-spezifischen Sonde ergab in der Mutante ebenfalls ein Signal bei ca. 1,7 kb (Abb. 34 II). Daraus lässt sich folgern, dass die inserierte *ermB*-Kassette mit *ssrA* kotranskribiert wird. Da das Produkt des Gens *ssrA* ein funktionelles RNA-Molekül ist und nicht ein Protein, dessen Translation durch die Inserierung einer Resistenzkassette gestört wird, ist nicht auszuschließen, dass die Faltung der tmRNA und somit ihrer Funktionalität noch vorhanden ist. Die phänotypische Untersuchung der *ssrA*-Insertionsmutante ergab keine Beeinträchtigungen des Wachstums unter verschiedenen Bedingungen wie Temperatur (30°C, 37°C, 42°C, 45°C) und 1 M NaCl.

Ergebnisse

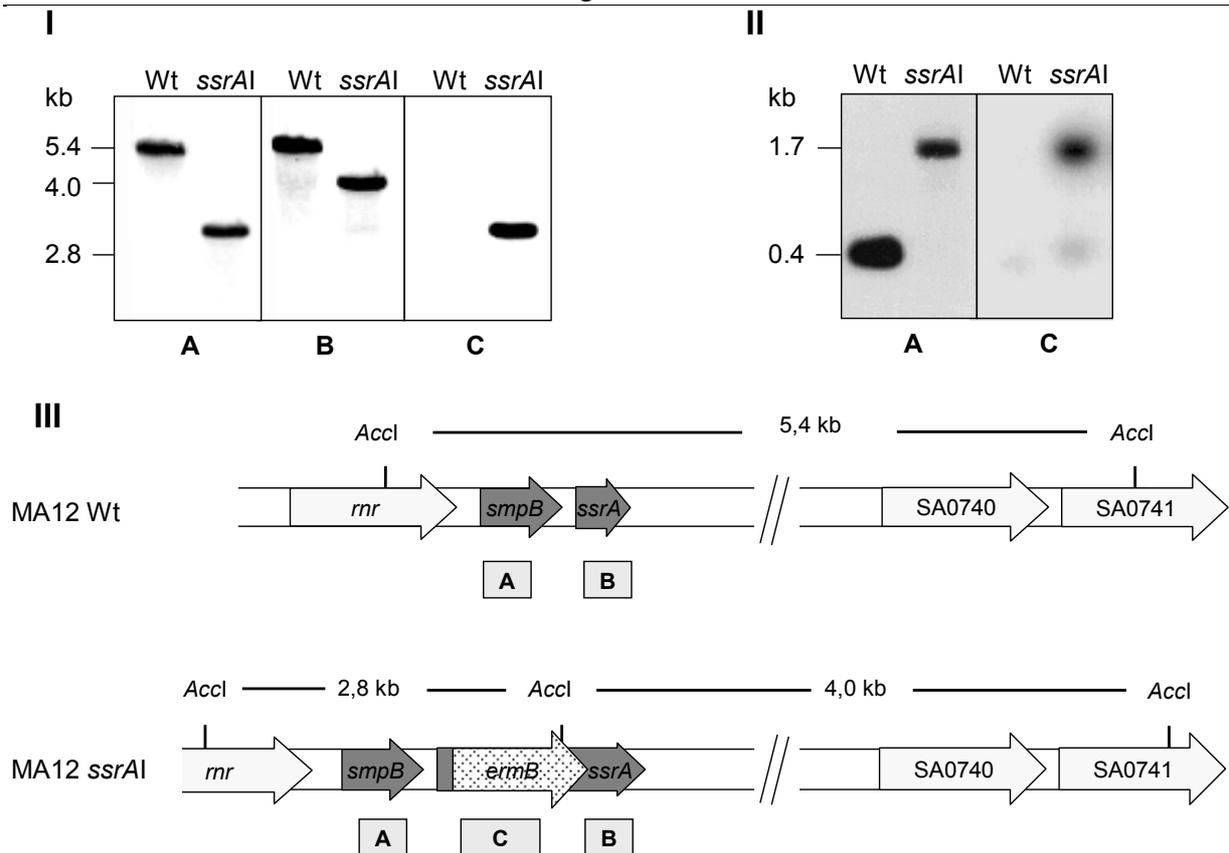


Abb. 34 I: Southern Blot-Analyse der *S. aureus* MA12*ssrA::ermB*-Insertionsmutante (*ssrAI*) und des isogenen Wildtypstammes MA12 (Wt). Die chromosomale DNA wurde mit *Accl* geschnitten. Der Blot wurde mit den Sonden A, B, und C hybridisiert, deren Lage unter III schematisch dargestellt ist. Spur 1: *S. aureus* MA12 Wt, Spur 2: *S. aureus* MA12*ssrAI*. **II:** Northern Blot-Analyse der MA12*ssrAI*-Mutante. **III:** schematische Darstellung des *smpB-ssrA*-Locus und Umgebung. SA-Nummern beziehen sich auf ORF-Benennung in *S. aureus* N315.

4.4.2. Herstellung einer Deletionsmutante *S. aureus* 8325 Δ *ssrA*

Um einen eindeutigen Resultat bezüglich der Frage der Essenzialität des SsrA-SmpB-Systems zu erhalten, wurde des Weiteren versucht das gesamte *ssrA*-Gen zu deletieren (3.2). In diesem Ansatz wurde für die Mutagenese der *S. aureus*-Stamm 8325 gewählt, der sich erfahrungsgemäß gut für die genetische Manipulation eignet.

Für die Konstruktion des Deletionsvektors wurden mit den Primerpaaren *ssrA11-ssrA12* (-1044 und -10 relativ zur Startsequenz) und *ssrA13-ssrA14* (+364 und +1402) die stromaufwärts und abwärts des *ssrA*-Gens gelegenen Sequenzbereiche mittels PCR amplifiziert und die für die weiteren Klonierungsschritte notwendigen Restriktionsschnittstellen angefügt (*EcoRI-BamHI* und *PstI-HindIII*). Nach Ligation der Fragmente in den pGEM-T Easy Vektor und Überprüfung durch Sequenzierung, wurden diese mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus den Vektoren geschnitten. Weiterhin wurde die *ermB*-Kassette mit den Enzymen *PstI* und *BamHI* aus dem Vektor pEC1 gespalten und der Vektor pBT2 mit *EcoRI* und *HindIII*

linearisiert. Die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese isoliert, aufgereinigt und in einem Ligationsansatz inkubiert. Klone wurden nach Transformation in *E. coli* DH5 α auf Amp/Em-Platten selektioniert und anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft. Daraufhin wurde das Plasmid pMAssrA in den *S. aureus*-Stamm RN4220 elektroporiert. Klone wurden auf Em/Cm-Platten isoliert und überprüft. Rekombinante Klone wurden für die Herstellung von Phagenlysat eingesetzt, um das Plasmid mittels Phagentransduktion in den *S. aureus* Zielstamm 8325 zu bringen. Nach Inkubation des Zielstammes mit dem Phagenlysat, wurden Klone auf Em/Cm-Platten selektioniert und anschließend überprüft. Die Integration der *ermB*-Kassette wurde durch die Inkubation mit einer geringeren Em-Konzentration (2,5 $\mu\text{g/ml}$) und Passagierung über 1-3 Tage in Flüssigmedium bei 42°C unterstützt (Brückner, 1997b). Trotz mehrfacher Wiederholung der Integrationsschritte und der Überprüfung von mehr als 2500 Klonen auf ihre Erythromycin-Resistenz und Chloramphenicol-Sensitivität als Zeichen eines erfolgreichen doppelten Crossover-Ereignisses und der damit verbundenen Integration der *ermB*-Kassette in das Genom, ließen sich keine *ssrA*-Deletionsmutanten isolieren. Daraus lässt sich schließen, dass das *ssrA-smpB*-System eine wichtige Rolle für *S. aureus* spielt und dass eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit von mutierten Klonen einen Selektionsnachteil während der Mutagenisierungsschritte nach sich zieht.

4.4.3. Herstellung konditional letaler Mutanten

Aufgrund der vorangegangenen erfolglosen Versuche, die Gene *ssrA* und *smpB* durch Insertion oder Austausch der Gene durch eine *ermB*-Kassette zu inaktivieren, lässt sich vermuten, dass dieses System eine essenzielle Funktion in *S. aureus* hat. Da die erfolglose Inaktivierung der Gene nur einen indirekten Hinweis auf deren Essenzialität liefert, wurden zusätzlich zwei unterschiedliche Strategien eingesetzt, die eine regulierte Expression der Gene *ssrA* und *smpB* ermöglichen sollen. Für beide Strategien wurde die Promoter-Operator-Region des aus *Staphylococcus xylosus* stammenden Xylose-Operons (*xyIAB*) inklusive des Gens *xyIR*, das für den Xylose-Repressor kodiert und insgesamt als Xylose-Regulon bezeichnet wird, eingesetzt.

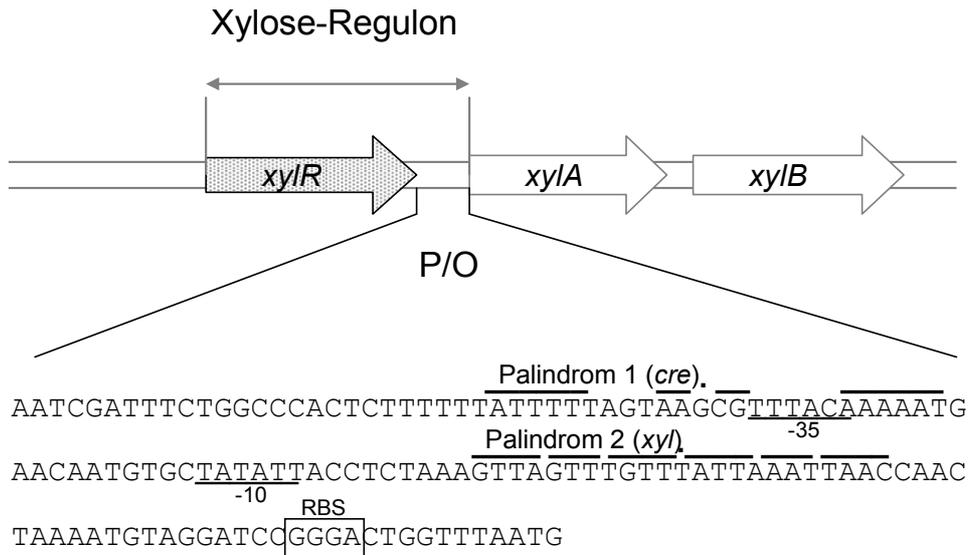


Abb. 35 Schematische Darstellung des Xylose-Operons aus *S. xylosus*. Upstream des *xylAB*-Operons befindet sich das Gen *xylR*, das für den Xylose-Repressor kodiert. P/O steht für die Promotor/Operator-Region des *xylAB*-Operons, in der sich zwei palindrome Operatorsequenzen befinden. Das *cre*-Element und das *xyl*-Element dienen als Erkennungssequenzen des Katabolit-Kontrollproteins CcpA und des Xylose-Repressors XylR.

Der Repressor XylR bindet in Abwesenheit von Xylose an eine palindrome DNA-Erkennungssequenz (*xyl*-Element) und wird durch die Zugabe von Xylose inaktiviert (Sizemore *et al.*, 1992). Eine zweite Operatorsequenz (*cre*-Element (catabolite repressive element)) ermöglicht die zusätzliche Regulation durch Katabolit-Repression in Anwesenheit von Glukose durch den Repressor CcpA. Die Transkription der nachfolgenden Gene ist durch die Zugabe von Glukose hemm- und durch Xylose aktivierbar (Rohrer *et al.*, 1999). Liegen beide Kohlenstoffquellen gleichzeitig im Medium vor, dominiert die Regulation durch Katabolit-Repression (Wieland *et al.*, 1995).

4.4.3.1. Kontrollierte Expression der Gene *smpB*- und *ssrA* durch das Xylose-Regulon

In diesem Ansatz sollten die Gene *smpB* und *ssrA* jeweils unter die Kontrolle des Xylose-Regulons gestellt werden, indem die wildtypischen Promotoren der Gene *ssrA* und *smpB* jeweils durch das bereits beschriebene Xylose-Regulon ausgetauscht wurden. Zunächst wurden Fragmente, die den 5'-Bereich des jeweiligen Zielgens (*smpB* oder *ssrA*) umfasst, mittels PCR amplifiziert (Primer: *smpB*7-*smpB*8 für *smpB* und *ssrA*7-*ssrA*8 für *ssrA*). Dabei wurden die Schnittstellen *KpnI* und *Bam*HI für die nachfolgenden Klonierungsschritte angefügt. Es wurde darauf geachtet, dass das jeweilige 5'-Fragment die Ribosomenbindestellen, aber nicht den wildtypische Promotorbereich enthält. Das *smpB*- und das *ssrA*-5'-Fragment (430 Bp und 352 Bp) wurde jeweils in einem Zwischenklonierungsschritt in den Vektor pGEM-T (Promega) inseriert und sequenziert. Danach wurden sie mit *KpnI* und *Bam*HI herausgespalten, in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Shuttle-Vektor pBT2*xyIR* ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Nach Überprüfung der auf Cm-haltigen Agarplatten wachsenden Klone durch Plasmid Mini-Präparation, Restriktionsspaltung und Agarosegelelektrophorese wurden die Plasmide jeweils in den restriktionsnegativen *S. aureus*-Stamm RN4220 elektroporiert und anschließend mithilfe des Phagen Φ 85 in den *S. aureus*-Stamm 377 transduziert. Für die Selektion von Klonen, in denen der jeweilige Vektor durch ein einfaches Rekombinationsereignis (einfacher Crossover) in dem Genom integriert vorlag, wurden drei Subkultivierungsschritte bei 42°C durchgeführt und potenzielle Cm-resistente Mutanten mittels Southern Blot-Analyse überprüft. Das einfache Crossover-Ereignis sollte zu der Integration des gesamten Plasmids in das Chromosom durch homologe Rekombination des 5'-Bereichs führen, wodurch der ursprüngliche Promoter des Zielgens räumlich entfernt und durch das Xylose-Regulon ersetzt wird. Dabei kommt es zu einer Verdoppelung der an der Rekombination beteiligten Sequenz (Abb. 36 I u. II). Trotz wiederholter Integrationsversuche des Vektors pBT2*xyIRssrA*, gelang es nicht, das *ssrA*-Gen unter die Kontrolle des *xyIA*-Promotors zu bringen. Dagegen konnte eine konditionale 377P*xyIRsmpB*-Mutante isoliert werden, in der der Vektor pBT2*xyIR:smpB* erfolgreich in das Genom integrierte (Abb. 36 III).

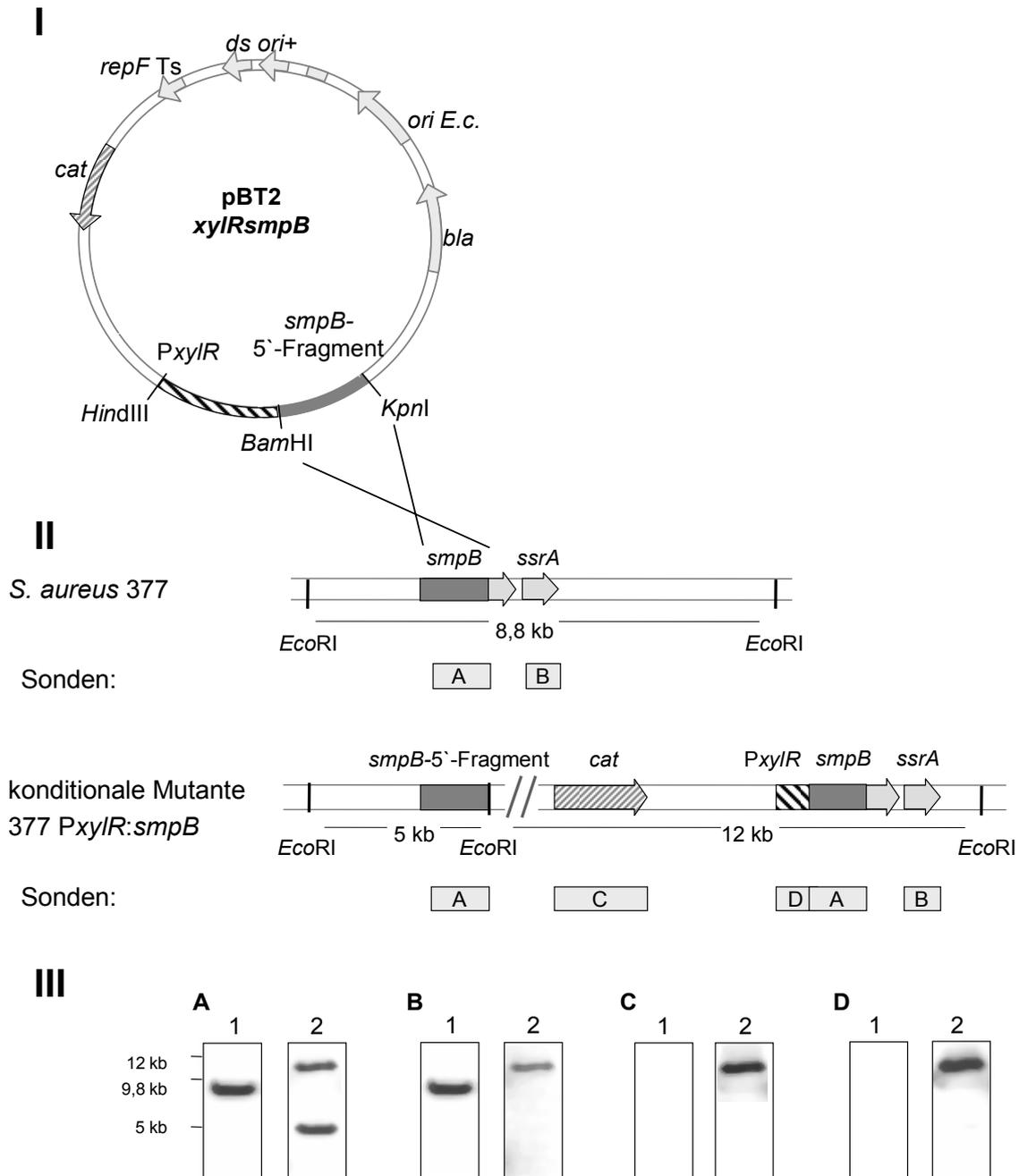


Abb. 36 Schematische Darstellung der Herstellung einer konditional letalen *smpB*-Mutante in *S. aureus* 377. **I:** Das 5'-*smpB*-Fragment wurde in den konditionalen Expressionsvektor pBT2xyIR mit den Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *BamHI* kloniert. **II:** Chromosomale Organisation des *smpB*-*ssrA*-Locus im wildtypischen *S. aureus*-Stammes 377 und der 377PxyIR*smpB*-Mutante. **III:** Southern Blot-Analyse des Stammes 377 (Spur 1) und 377PxyIR*smpB* (Spur 2). Die chromosomale DNA wurde mit *EcoRI* gespalten und den Sonden A, B, C und D hybridisiert.

Die für die Southern Blot-Analyse eingesetzte chromosomale DNA des Wildtyp- und des Mutanten-Stammes wurde mit *EcoRI* gespalten. Durch die Integration des gesamten Vektorkonstruktes pBT2xyIR:*smpB* in das Chromosom wurde eine zusätzliche *EcoRI*-Schnittstelle eingeführt, die aus der MCS des Vektors stammt. Die Sonde, die dem *smpB*-5'-Bereich entspricht (Sonde A), führte zu der Detektion des

Ergebnisse

wildtypischen Fragments bei ~8,8 kb. In der Mutante konnten zwei Signale (~5 und ~12 kb) detektiert werden, die auf die bereits erwähnte Duplizierung des 5'-Bereichs zurückzuführen ist. Die Hybridisierungen mit einer *ssrA*-spezifischen Sonde (Sonde B) erzeugte in der Mutante ein Signal bei ~12 kb. Die Vektor-spezifischen Sonden C (*cat*-Kassette) und D (*xyIR*) bestätigten die Integration des Vektors (~9 kb) und der damit verbundenen Vergößerung des Fragments (Abb. 36 II u. III).

Um die Regulierbarkeit der *smpB*-Transkription durch das Xylose-Regulon zu überprüfen, wurde eine Northern Blot-Analyse der *smpB*-Transkripte des Wildtypstammes und der konditionalen *PxyIRsmpB*-Mutante in LB-Medium ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle und unter Zugabe von 1 % Xylose oder 0,5 % Glukose durchgeführt. Ohne Zusätze konnte weder im Wildtyp noch in der konditionalen *smpB*-Mutante ein *smpB*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 37). Die Zugabe von 1 % Xylose führte in der Mutante zu einer deutlichen Erhöhung der *smpB*-Transkriptmenge. Durch die Zugabe von 0,5 % Glukose konnte, aufgrund der schlechten Nachweisbarkeit des *smpB*-Transkriptes ohne Zugabe von Xylose, keine Verminderung des Transkriptes festgestellt werden. Dies könnte auf die zu geringe Sensitivität der gewählten Nachweismethode, der geringen Stabilität des Transkriptes sowie auf die gewählten Bedingungen zurückzuführen sein.

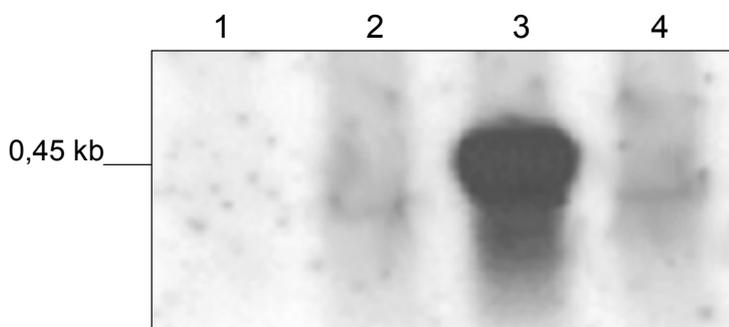


Abb. 37 Northern Blot-Analyse des *smpB*-Transkripts in der exponentiellen Phase ($OD_{600} = 1$) des *S. aureus*-Stammes 377 (Spur 1) und der isogenen *377PxyIRsmpB*-Mutante (Spuren 2-4) in LB-Medium. Spur 1: *S. aureus* 377 ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle, Spur 2 *377PxyIRsmpB*-Mutante ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle, Spur 3: *377PxyIRsmpB*-Mutante mit 1 % Xylose, Spur 4: *377PxyIRsmpB*-Mutante mit 0,5 % Glukose.

In einem weiteren Experiment sollten die Auswirkungen des regulierbaren Expressionssystems auf das Wachstum in Anwesenheit von Glukose und Xylose untersucht werden. Sollte es sich bei *smpB* um ein essenzielles Gen handeln, dann würde das Wachstum durch die Zugabe von Glukose gehemmt und in Gegenwart von Xylose ohne zusätzliche Glukose wiederhergestellt werden. Die Wachstumsanalysen der konditionalen *smpB*-Mutante und des Wildtypstammes wurden in LB-Medium mit 1 % Xylose als Induktor und 0,5 % Glukose als Repressor durchgeführt (Rohrer *et al.*, 1999). Im Vergleich zum Wildtyp konnte kein Unterschied im Wachstumsverlauf der Mutante bei Kultivierung in Anwesenheit von Glukose festgestellt werden. Dies

könnte auf eine instabile Integration des Expressionssystem im Genom zurückzuführen sein. Aufgrund der durch den einfachen Crossover entstandenen Duplizierung des 5'-Bereichs des Zielgens, ist eine Herauspaltung und die Wiederherstellung eines replizierfähigen Vektors nicht auszuschließen. Die Zugabe von Cm übt einen Selektionsdruck auf das Plasmid aus, jedoch nicht auf dessen stabile chromosomale Integration. Da eine Replikation des eingesetzten temperatursensitiven Shuttle-Vektors pBT2 in *S. aureus* bei erhöhten Temperaturen (> 37°C) nicht mehr stattfinden sollte, wurde die Wachstumsexperimente bei 42°C wiederholt. Auch unter diesen Bedingungen konnte keine Veränderung im Wachstumsverlauf der Mutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Um die Stabilität der Integration zu überprüfen wurde eine Southern Blot-Analyse durchgeführt, die zeigte, dass in der 377PxyIR*smpB*-Mutante die Herauspaltung des Vektors nachzuweisen war. Daraus ergibt sich, dass das eingesetzte System sich aufgrund einer instabilen Integration im Genom und einer nicht nachgewiesenen Hemmbarkeit durch die Zugabe von Glukose, nicht für den Nachweis eines putativ essenziellen Gens eignet.

4.4.3.2. Antisense-RNA-Strategie zur Hemmung der Expression der Gene *smpB* und *ssrA*

In einem zweiten Ansatz sollte die Hemmung der Transkription der Gene *smpB* und *ssrA* mittels eines regulierbaren Antisense-RNA-Systems erzielt werden. Diese Methode konnte bereits erfolgreich zur Identifizierung von essenziellen Genen oder von Genen deren gehemmte Expression zu einem Wachstumsdefekt in *S. aureus* führen, eingesetzt werden (Ji *et al.*, 2001). Die kontrollierte Expression, in Form einer erhöhten Zielgen-spezifischen Antisense-RNA-Konzentration, sollte zu einer Hemmung der Genexpression durch die Hybridisierung der komplementären Transkripte und im Falle eines essenziellen Gens zu einem Wachstumsdefekt führen. Als konditionales System wurde das Xylose-Regulon eingesetzt, für das im vorangegangenen Experiment (vgl. 4.4.3) eine gute Induzierbarkeit der Expression des nachfolgenden Gens nachgewiesen werden konnte.

Mittels PCR wurde mit den modifizierten Primern *smpBA1* und *ssrAA2* ein 934 Bp-Fragment mit den Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BamHI* amplifiziert, das den gesamten Bereich des *smpB-ssrA*-Locus beinhaltet. Das *smpB-ssrA*-Fragment wurde in Gegenrichtung in den Upstreambereich des Xylose-Regulons kloniert, das bereits

im Shuttle-Vektor pRB473*xyIR* kloniert vorlag. Der in *E. coli* DH5 α erstellte Vektor pRB*xyIRsmpBssrA* wurde in den *S. aureus*-Stamm RN4220 elektroporiert. Durch die Zugabe von 1 % Xylose sollte die Antisense-RNA-Expression des *smpB-ssrA*-Locus von dem Vektor pRB*xyIRsmpBssrA* induziert und durch Zugabe von Glukose reprimiert werden.

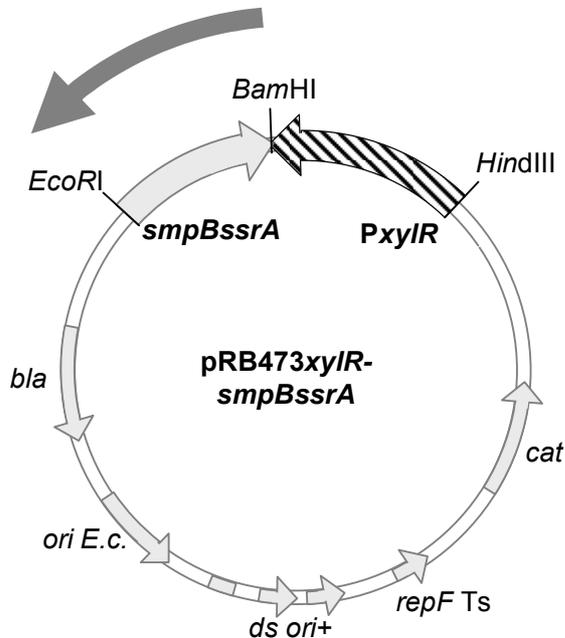


Abb. 38 Schematische Darstellung des regulierbaren Antisense-RNA-Vektors pRB473*xyIR*. Hinter das durch Xylose induzierbare und durch Glukose reprimierbare *XylR*-Regulon (*xyIR*) wurde das *smpB-ssrA*-Fragment in Gegenrichtung kloniert.

Um eine Hemmung durch Glukose im Medium zu vermeiden, wurde für die Wachstumsexperimente chemisch definiertes Medium (CDM) verwendet, dem 0,75 % Mannose als Kohlenstoffquelle zugefügt wurde (Abb. 39 I). Als Kontrolle wurde der Stamm RN4220 mit dem Vektor pRB473*xyIR* eingesetzt. Unabhängig von der Zugabe des Repressors Glukose oder des Induktors Xylose konnte eine Wachstumsbeeinträchtigung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die Zugabe von Xylose führte zu einer geringen Verstärkung der Wachstumshemmung. Die Zugabe von Glukose führte dagegen nicht zu einer Wiederherstellung des mit dem Wildtyp vergleichbaren Wachstums. Daraus lässt sich schließen, dass unter den gewählten Bedingungen die Transkription der Antisense-RNA durch Glukose nicht vollständig reprimiert werden konnte. Die Northern Blot-Analyse der beiden Stämme in der exponentiellen Phase zeigte, dass bereits ohne die Zugabe von Glukose eine erhöhte Basisaktivität der vektorspezifischen Expression festzustellen war, die auch nicht durch die Zugabe von Glukose vermindert werden konnte (Abb. 39 II). Bei den für die Hybridisierungen eingesetzten Sonden handelte es sich um doppelsträngige

Ergebnisse

PCR-Fragmente des *ssrA*-sowie des *smpB*-Bereichs, wodurch nicht zwischen Sense- und Antisense-RNA unterschieden werden konnte.

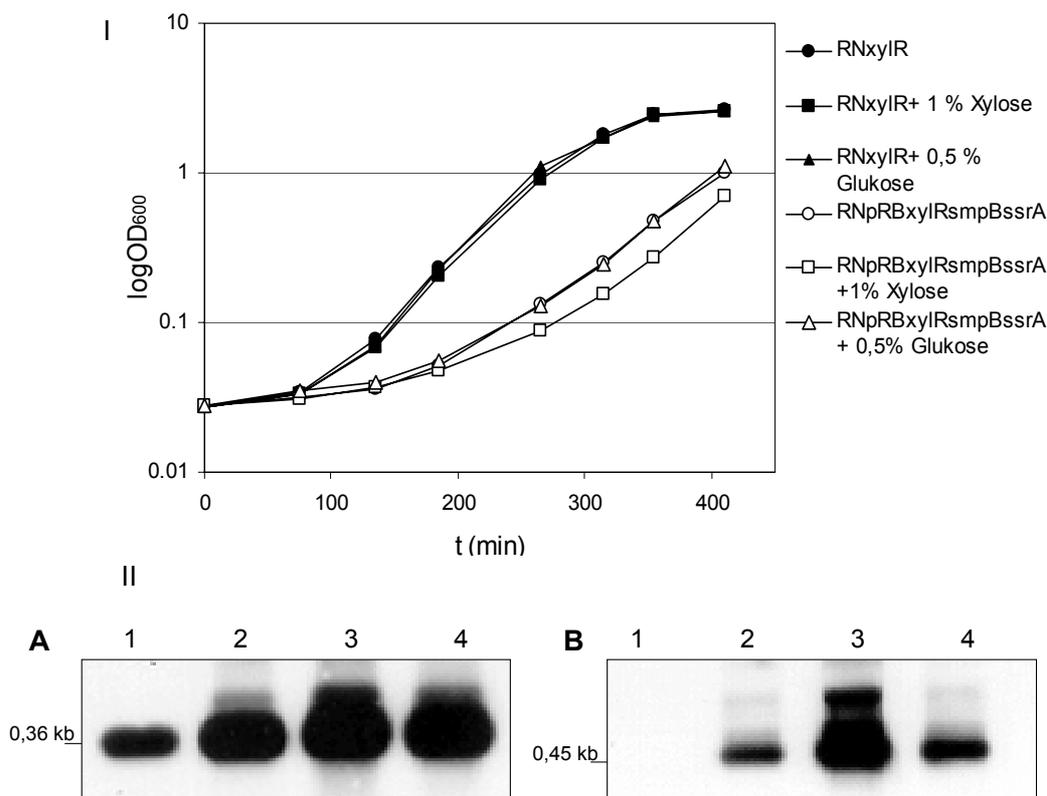


Abb. 39 I: Diagramm einer Wachstumskurve in CDM-Medium mit 0,75 % Mannose und 10 µg/ml Cm bei 37°C. Gefüllte Symbole: Wachstum des Kontroll-Stammes (RNxyIR). Offene Symbole: Wachstum der Antisense-Mutante (RNpRBxyIRsmpBssrA). Jeweils unter Zugabe von 1 % Xylose (Quadrate), 1 % Glukose (Dreiecke) und ohne Zusatz (Kreise). **II:** Northern Blot-Analyse der *ssrA*- (A) und der *smpB*- (B)-spezifischen Transkripte. Doppelsträngige Sonde hybridisiert mit Sense- und Antisense-RNA, Spur 1: RNxyIR ohne Zugabe einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle, Spur 2: RNpRBxyIRsmpBssrA ohne Zugabe einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle, Spur 3: RNpRBxyIRsmpBssrA mit 1 % Xylose, Spur 4: RNpRBxyIRsmpBssrA mit 0,5 % Glukose.

Um den für die Hemmung verantwortlichen Bereich einzugrenzen, wurden analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise Fragmente innerhalb des *smpB-ssrA*-Locus mit unterschiedlicher Größe und Lage mittels PCR amplifiziert (Abb. 40 A). Die Wachstumsexperimente der Klone mit den unterschiedlichen Vektorkonstrukten wurden in CDM mit 0,75 % Mannose bei 37°C unter Zugabe von 1% Xylose durchgeführt (Abb. 40 B). Es zeigte sich, dass die Hemmung der Transkription des *smpB* bzw. des *ssrA*-Gens allein im Gegensatz zu dem Antisense-Konstrukt, das den Bereich beider Gene umfasst, nicht zu einer weiteren Verminderung des Wachstums führte. Eine vergleichbare Hemmung konnte dagegen durch die Induktion des 567-Bp-Antisense-Fragments beobachtet werden. Die deutlichste Wachstumshemmung wurde durch ein 750-Bp-Fragment erzielt, das die vollständige Sequenz des *smpB*-

Ergebnisse

und den 5'-Bereich des *ssrA*-Gens beinhaltet. Alle weiteren Antisense-Konstrukte zeigten keinen Unterschied im Wachstum im Vergleich zur Kontrolle.

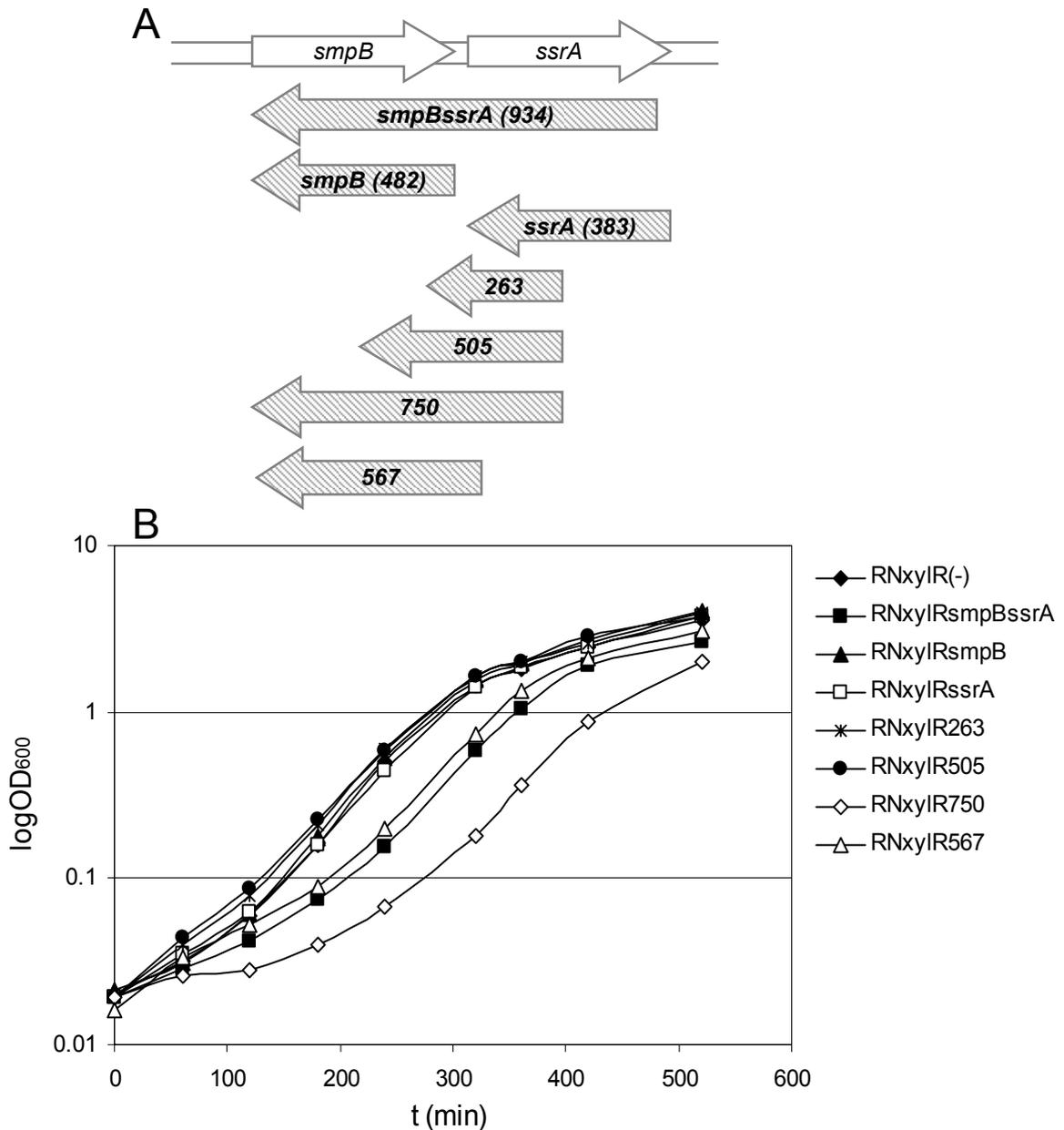


Abb. 40 A: Schematische Übersicht der Fragmente aus dem *ssrA-smpB*-System, die in Antisense-Orientierung in den Vektor pRB473xyIR kloniert wurden (Primer: smpBA1-smpBA2: 482 Bp; ssrAA1-ssrAA2: 383 Bp, smpBA3-ssrAA3: 263 Bp, smpBA4-ssrAA3: 505 Bp, smpBA1-ssrAA3: 750 Bp, smpBA1-ssrAA12: 567 Bp). Die Benennung der Fragmente bezieht sich auf die Lage der Sequenzen oder auf die Größe in Bp. **B:** Diagramm einer Wachstumskurve in CDM-Medium mit 1 % Xylose und 10 µg/ml Cm bei 37°C.

4.4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 4.4

Das SsrA-SmpB-System ist vermutlich essenziell in *S. aureus*. Der direkte Nachweis durch den Einsatz verschiedener Strategien konnte jedoch nicht erbracht werden:

- Die Gene *ssrA* und *smpB* konnten nicht durch die Insertion einer *ermB*-Kassette oder durch Deletion inaktiviert werden.
- Eine konditionale *smpB*-Mutante zeigte keinen veränderten Phänotyp, aufgrund von nicht vollständig durch Glukose hemmbarer Basisaktivität des gewählten Xylose-Regulons und der Instabilität der chromosomalen Integration. Eine konditionale *ssrA*-Mutante konnte nicht hergestellt werden.
- Durch eine Antisense-RNA-Strategie konnte der direkte Beweis einer Verminderung der *smpB*- und *ssrA*-Expression nicht erzielt werden. Jedoch führte die induzierte Antisense-RNA-Expression des *smpB-ssrA*-Locus zu einer Wachstumsbeeinträchtigung.

5. DISKUSSION

Staphylokokken gehören zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen. Die Behandlung wird zunehmend durch die Multiresistenz vieler *S. aureus*-Stämme erschwert. Um eine erfolgreiche Therapie gegen *S. aureus*-Infektionen auch zukünftig zu gewährleisten, ist die Entwicklung neuer Antibiotika dringend erforderlich. Bisherige Antibiotika greifen in die Proteinsynthese, den Nukleinstoffwechsel oder die Zellwandsynthese von Bakterien ein. In der vorliegenden Arbeit wurden Zielstrukturen untersucht, die in die Kontrolle der Translation und des Proteinumsatzes (*ssrA*, *smpB*, *clpP*) und in die Virulenzexpression (*arlRS*) sowie an der Etablierung einer Infektion *in vivo* (*putP* und *purH*) beteiligt sind.

5.1. Die Inaktivierung von *clpP* in *S. aureus* 8325 führt zu der veränderten Transkription unterschiedlicher globaler Regulons und beeinflusst die Virulenz

Die Degradation von Proteinen durch zytoplasmatische, energieabhängige Proteasen stellt einen wichtigen regulatorischen Prozess bei Eukaryoten und Prokaryoten dar. Die Kontrolle der Basalkonzentration regulatorischer Proteine sowie die Eliminierung beschädigter und unbenötigter Proteine ermöglicht eine schnelle Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen. Verschiedene instabile Proteine wurden bereits als wichtige Regulatoren der Stressantwort, der Zellzykluskontrolle und der Differenzierung identifiziert (zur Übersicht: Hengge & Bukau, 2003; Jenal & Hengge-Aronis, 2003; Ehrman & Clausen, 2004).

Die Deletion des *clpP*-Gens in *S. aureus* 8325 führte zu multiplen Veränderungen des Phänotyps im Vergleich zum Wildtyp. Die $\Delta clpP$ -Mutante zeigte einen Wachstumsdefekt unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, Anaerobiose), eine verringerte Zellgröße (0,8-fach), eine verminderte Adhärenz an Polystyren, eine erhöhte Triton X-100-induzierbare Autolyse und verminderte hämolytische Aktivität. Des Weiteren führte die *clpP*-Deletion zu einer veränderten Urease- und Arginin-Deiminase-Aktivität. Die $\Delta clpP$ -Mutante wurde in Zellkulturexperimenten mit einer ~10-fach erhöhten Rate von Epithelzellen internalisiert und zeigte in Adhärenzstudien eine ~2,2-fach erhöhte Fibronectin-Bindungskapazität. Alle beobachteten phänotypischen Veränderungen der $\Delta clpP$ -Mutante konnten durch Komplementation mit einem *clpP*-exprimierenden Plasmid erfolgreich revertiert werden.

Die Transkriptomanalyse der $\Delta clpP$ -Mutante ergab eine deutliche Veränderung des Transkriptionsprofils im Vergleich zum isogenen Wildtyp. In der $\Delta clpP$ -Mutante weisen die Gene der Transkriptionsregulatoren der Hitzeschockantwort (*ctsR*, *hrcA*), der Kontrolle von DNA-Reparaturmechanismen (*lexA*) sowie das essenzielle Zwei-Komponenten-System (*vicKR/lycFG*) und ein hypothetisches Zwei-Komponenten-System mit unbekannter Funktion (SA2417-SA2418) eine erhöhte Transkriptmenge auf. Weitere Gene die für die Regulatoren der Virulenzfaktorexpression und Autolyse (*agrCA*, *arIRS*, *lytSR*, *sarA*, *sarT*, *sarR*, *rat/mgr/norR*), der anaeroben Atmung (*nreBC* (SA2180-SA2179)) sowie das *sigB*-Operon kodieren, sind durch die *clpP*-Deletion auf der Transkriptionsebene beeinflusst. Der Einfluss von ClpP auf die Genexpression, in Form der gezielten Degradation von regulatorischen Proteinen ist für *S. aureus* bislang nicht geklärt. In einem computerunterstützten Ansatz, basierend auf bekannten Konsensussequenzen mit regulatorischer Funktion, wurden in der $\Delta clpP$ -Mutante verschiedene Gruppen gemeinsam regulierter Gene identifiziert. Diesen Genen sind Regulatoren übergeordnet, die für die transkriptionelle Kontrolle in Abhängigkeit von Stressbedingungen sowie veränderte Redox-Bedingungen verantwortlich sind. In der $\Delta clpP$ -Mutante wurde die vollständige transkriptionelle Derepression der bekannten Gene des CtsR- und HrcA-Hitzeschock-Regulons, eine teilweise Derepression des LexA-regulierten SOS-DNA-Reparatur-Regulons und potenziell Fur- und PerR-regulierter Gene der Metall-Homöostasis und oxidativen Stressantwort nachgewiesen. Die Transkription MntR-regulierter Gene lässt auf einen aktiven Regulator der Manganaufnahme und der oxidativen Stressantwort schließen. Die Identifizierung der hochkonservierten Fnr/ArcR-Konsensussequenz vor einer Reihe von Genen der anaeroben Respiration und Fermentation mit einer verminderten Expression in der $\Delta clpP$ -Mutante, zeigt eine Kontrolle dieser Faktoren durch ClpP. Ebenfalls weisen die Ergebnisse auf die Inaktivierung der positiven Regulation der Nitrat- und Nitrit-Atmung durch das bislang nur für *S. carnosus* beschriebene Zwei-Komponenten System NreBC hin. Weitere Regulationsmechanismen, die zu dem stark veränderten Transkriptionsprofil der $\Delta clpP$ -Mutante führen könnten, stellen der bislang nur in *B. subtilis* beschriebene Regulator Spx der oxidativen Stressantwort und die durch CcpA aktivierte Katabolit-Repression dar. Weiterhin ist die Transkription der Gene des YycFG-Regulons stark erhöht, was eine Aktivierung dieses Systems durch die Inaktivierung von *clpP* nahelegt. Die Analyse der Genexpression des σ^B -Regulons ergab eine überwiegend

verminderte Expression von putativ σ^B -abhängigen Genen. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit an Erkenntnissen bezüglich der Genexpressions-Regulation in *S. aureus*, handelt es sich hierbei um einen spekulativen Ansatz, der im Detail noch überprüft werden muss.

Die meisten stressinduzierten Proteine sind Chaperone oder Proteasen, die für die korrekte Faltung von Proteinen und deren Degradation verantwortlich sind (Gottesman et al., 1997). Für *B. subtilis* sind die sogenannten Hitzeschockproteine in vier Klassen eingeteilt. Klasse I beinhaltet klassische Chaperone, deren Expression durch den Repressor HrcA kontrolliert wird, Klasse II umfasst σ^B -abhängige Proteine und Klasse III-Hitzeschockgene werden durch CtsR reprimiert. Die Gene, die für weitere Hitzeschockproteine kodieren, die bis jetzt noch keinem Regulator zugeschrieben werden konnten, werden in der Klasse IV zusammengefasst (Schumann et al., 2002).

In *S. aureus* steht das HrcA-Regulon unter der Kontrolle von CtsR (Chastanet et al., 2003; Frees et al., 2004). Das CtsR-Regulon (*ctsR-mcsA-mcsB-clpC* und *clpB*) sowie das HrcA-Regulon (*hrcA-grpE-dnaK-dnaJ* und *groESL*) sind in der $\Delta clpP$ -Mutante dereprimiert. In Grampositiven wird die Aktivität von CtsR unter der Vermittlung der Proteine McsA (SA0481) und McsB (SA0482) moduliert und unter Stressbedingungen der Degradation durch den ClpCP-Protease-Komplex zugeführt (Derre et al., 2000; Krüger et al., 2001). Somit führt die Inaktivierung von *clpP* zu der Akkumulation des Repressors. Da trotz erhöhter CtsR-Abundanz eine erhöhte Expression des Klasse III Hitzeschock-Regulons zu beobachten ist, scheint CtsR in inaktiver Form zu akkumulieren. Die Aktivierung der Repressorfunktion von CtsR erfolgt durch Dimerisierung, die durch McsA vermittelt wird (Krüger et al., 2001). McsA verfügt über zwei Zinkfinger-Domänen (CXXC), die vermutlich für der Dimerisierung und Aktivierung von CtsR benötigt werden (Krüger et al., 2001). Das aktive CtsR-Dimer wird nicht mehr degradiert. McsB dagegen übt eine antagonistische Rolle aus. Unter Stressbedingungen modifiziert McsB CtsR über einen unbekanntem Mechanismus, indem es die Dimerisierung inhibiert. Die CtsR-Monomere werden anschließend durch den ClpCP-Protease-Komplex degradiert (Krüger et al., 2001). *clpP*-Mutanten in *S. aureus* und *S. pneumoniae* weisen eine erhöhte Transkription von Genen des CtsR-Regulons auf (Robertson et al., 2002; Frees et al., 2004). In *B. subtilis* führen erhöhte Temperaturen und oxidative Stressbedingungen (H_2O_2 , Paraquat, NO, Diamid) zu der Inaktivierung von CtsR und zu einer erhöhten Expression des CtsR-

Regulons (Leichert *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2004; Mostertz *et al.*, 2004). Eine mögliche Erklärung stellt die gegenüber Oxidation sensitive Zinkfingerdomäne von McsA dar (Leichert *et al.*, 2003), sodass unter oxidierenden Bedingungen ein inaktiver, monomerer CtsR-Repressor akkumuliert.

HrcA ist der Repressor des *hrcA-grpE-dnaK-dnaJ*- und des *groESL*-Operons und ist in *S. aureus* CtsR untergeordnet (Abb. 41). HrcA benötigt das Chaperon GroE für die Entwicklung der aktiven Repressor-Funktion. Nach einem Hitzeschock assoziiert GroE mit denaturierten und aggregierten Proteinen, als Folge nimmt der Gehalt an freiem GroE ab und HrcA dissoziiert von der Operatorsequenz (Mogk, 1997). Die erhöhte Expression des HrcA-Regulons in der $\Delta clpP$ -Mutante könnte auf die Inaktivierung des übergeordneten Repressors CtsR zurückzuführen sein. Zusätzlich führt das Fehlen von ClpP zu einer erhöhten Konzentration fehlerhafter Proteine und somit zu einem erhöhten Bedarf an GroE. Daher sind in der Folge eine Inaktivierung der HrcA-Repressorfunktion und die damit verbundene Dereprimierung des HrcA-Regulons aufgrund des Fehlens von freiem GroE denkbar.

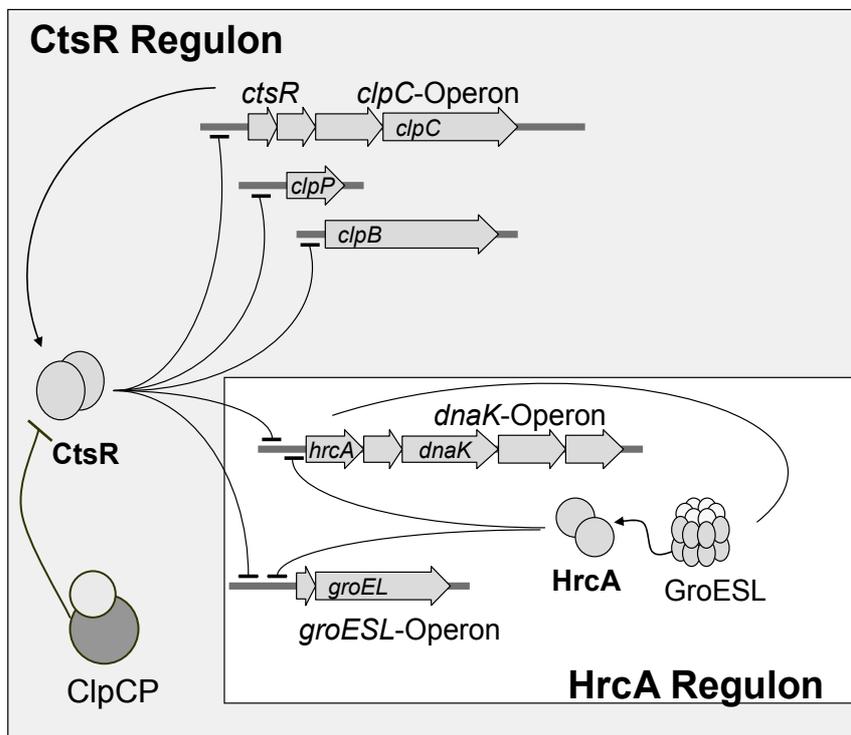


Abb. 41 Das *S. aureus*-HrcA-Regulon ist in das CtsR-Regulon integriert. (nach (Chastanet *et al.*, 2003)

Gene des Hitzeschock-Regulons IV mit ungeklärter Regulation sind ebenfalls in der $\Delta clpP$ -Mutante erhöht exprimiert. Dazu zählen *ftsH*, dessen Expression in *B. subtilis* durch Hitze und osmotischen Stress induziert wird (Deuerling *et al.*, 1995). Das Gen *htrA* kodiert für eine zelloberflächenassoziierte Serin-Protease. In *E. coli* degradiert HtrA denaturierte und durch Oxidation beschädigte Proteine, die durch hohe

Temperaturen und/oder oxidativen Stress entstanden sind und weist bei niedrigen Temperaturen Chaperon-Aktivität auf (Lipinska et al., 1990; Pallen & Wren, 1997). HtrA-ähnliche Proteasen spielen eine Rolle bei der Virulenz verschiedener gramnegativer und grampositiver Bakterien aufgrund ihrer Rolle in der Vermittlung der Stress-Resistenz, des Überlebens und der Prozessierung verschiedener sekretierter Proteine und Virulenzfaktoren (Johnson et al., 1991; Pallen & Wren, 1997; Poquet et al., 2000; Jones et al., 2001; Cortes et al., 2002; Miyoshi et al., 2002; Lyon & Caparon, 2004). Die Rolle der HtrA-Proteasen in *S. aureus* ist bislang noch nicht geklärt. *S. aureus* verfügt über zwei *htrA*-homologe Gene (*htrA1*/SA0879 und *htrA2*/SA1549). Die Behandlung mit zellwandaktiven Antibiotika, die Proteine oxidativ schädigen, führt zu der Induktion der Transkription von *htrA2* in *S. aureus* (Utaida et al., 2003). Der ORF SA0470 kodiert für ein Hsp33-homologes Hitzeschockprotein. Dabei handelt es sich um ein Redox-reguliertes Chaperon, dessen Funktion durch die Bildung von Disulfidbrücken und anschließender Dimerisierung aktiviert wird (Jakob et al., 2000; Graumann et al., 2001; Hoffmann et al., 2004). Aktiviertes Hsp33 bindet an ungefaltete Proteinintermediate und schützt diese vor Fehlfaltungen durch Oxidation (Jakob et al., 1999). Hsp33 wird durch das Glutaredoxin- und das Thioredoxin-System *in vivo* reduziert. In *S. aureus* wird die Transkription von *hsp33* wie *htra2* (s.o.) unter der Einwirkung zellwandaktiver Antibiotika induziert (Utaida et al., 2003).

Der bislang nur in *B. subtilis* beschriebene globale Transkriptionsregulator Spx ist unter Grampositiven mit niedrigem G+C-Gehalt hochkonserviert. Der als ClpP-Substrat identifizierte Regulator könnte ein Faktor für das veränderte Transkriptionsprofil der *S. aureus* 8325 Δ *clpP*-Mutante sein (Nakano et al., 2001; Nakano et al., 2002a; Nakano et al., 2003b). Spx ist ein RNA Polymerase-bindendes Protein, das die Expression der Gene der Kompetenzentwicklung und Sporulation negativ reguliert und als positiver Regulator der Genexpression in Reaktion auf oxidative Stressbedingungen dient (zur Übersicht Zuber, 2004)). Der Regulator zeichnet sich durch den Besitz einer gegenüber Oxidation empfindlichen Zinkfingerdomäne (CXXC-Motiv) aus, die durch Disulfidbrücken-Bildung die Funktion eines Redox-Sensors unter Stressbedingungen (z. B. oxidativer Stress, NO) ermöglicht. Oxidiertes Spx bindet an die C-terminale Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase und erhöht die Affinität zu den Promotoren bestimmter Zielgene über einen noch nicht aufgeklärten Mechanismus. Eine direkte Aktivierung der

Expression der Gene *trxA* und *trxB* durch Spx wurde bereits nachgewiesen (Nakano *et al.*, 2003a). Das Gen *spx* (vorher *yjbD*) wurde ursprünglich als Ort einer Mutation identifiziert, der den in *clp*-Mutanten vorliegenden Defekt der Kompetenzentwicklung und Sporulation in *B. subtilis* unterdrückt (Nakano *et al.*, 2001; Nakano *et al.*, 2002a; Nakano *et al.*, 2002b).

In *L. lactis* wurde ein *spx*-homologes Gen identifiziert, dessen Inaktivierung *recA*-Mutanten Hitze-Resistenz verlieh und durch das der Effekt einer *clpP*-Mutation unterdrückt werden konnte, indem es zu einem allgemeinen Anstieg der proteolytischen Aktivität führte (Duwat *et al.*, 1999; Frees *et al.*, 2001). In *S. aureus* wurde ein *spx*-homologes Gen identifiziert (SA0856) (Zuber, 2004). Über dessen regulatorische Funktion in *S. aureus* liegen keine Erkenntnisse vor. Die erniedrigte Expression dieses ORFs in der $\Delta clpP$ -Mutante könnte auf eine negative Autoregulation hinweisen (4.1.2, Tabelle 7) und schließt eine Akkumulation des Proteins nicht aus. Um einen Hinweis auf die mögliche Rolle von Spx in *S. aureus* zu erhalten, wurden die in der $\Delta clpP$ -Mutante deregulierten Gene mit potenziell Spx-regulierten Genen in *B. subtilis* auf der Grundlage der COG-Kategorien verglichen. Zu den potenziell in der $\Delta clpP$ -Mutante durch Spx aktivierten Genen gehört das Thioredoxin-System, das sich aus Thioredoxin (TrxA) und Thioredoxin Reduktase (TrxB) zusammensetzt. Das Thioredoxin-System ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Thiol-Homoeostasis in der Zelle. Thioredoxin reduziert oxidierte Fe-S-Zentren von Proteinen und wird durch die Thioredoxin-Reduktase unter Verbrauch von NADPH regeneriert. Es ist vermutlich essenziell in *S. aureus*, da ein alternatives Glutathion-System wie in *E. coli* fehlt (Uziel *et al.*, 2004). Die Expression von *trxB* ist aufgrund einer PerR-Box im Upstreambereich dem PerR-Regulon zuzuordnen (Horsburgh *et al.*, 2001b) Zusätzlich gibt es drei weitere *trxB*-homologe Gene (SA1311, SA2162, SA2370), wobei der ORF SA2162 potenziell dem Fur-Regulon angehört ((Horsburgh *et al.*, 2001b)). Über die transkriptionelle Regulation des Gens *trxA* und der *trxB*-homologen Gene SA1311 und SA2370 liegen keine Erkenntnisse vor.

Die Analyse der Upstreambereiche der in der $\Delta clpP$ -Mutante in der Expression differenziell regulierten Gene, weist auf eine Inhibition der Fur- und PerR-vermittelten Repression sowie einer Aktivierung der MntR-vermittelten Regulation hin. In Bakterien wird die Eisen- und Manganaufnahme von regulatorischen Proteinen kontrolliert, die zu den Fur- und DtxR-Familien gehören (O'Halloran 1993, Tao 1994,

Hantke 2001). In gramnegativen sowie in grampositiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt dient Fur als ein Fe^{2+} -abhängiger transkriptioneller Repressor der Expression von Genen, die für Eisenaufnahme-Proteine kodieren (Hantke 2001). In *S. aureus* reprimiert Fur mit Fe^{2+} als Kofaktor die Expression der Gene *sirABC*, *thuD*, *sstABCD* und *orf4* in Anwesenheit hoher Eisenkonzentrationen sowie unter oxidativen Stressbedingungen (Xiong *et al.*, 2000; Horsburgh *et al.*, 2001b). Die von Horsburgh *et al.* als dem Fur-Regulon zugehörig postulierten Gene *feoB1*, *feoB2*, SA2162 (*trxB*-homolog) sind in der ΔclpP -Muante in der Transkription erhöht (Horsburgh *et al.*, 2001b). Die Suche nach weiteren potenziell Fur-regulierten Genen durch die computerunterstützte Analyse der Upstreambereiche der deregulierten Gene wurden neun weitere Gene mit erhöhter Expression identifiziert (4.1.2.5). Wie *B. subtilis* verfügt *S. aureus* über zwei weitere Fur-homologe Proteine, PerR und Zur (Bsat *et al.*, 1998; Gaballa & Helmann, 1998; Horsburgh *et al.*, 2001a; Horsburgh *et al.*, 2001b; Lindsay & Foster, 2001; Patzer & Hantke, 2001). Diese Fur-homologen Proteine reprimieren die Expression der Gene des Peroxid-Resistenz-Regulons und der Zink-Aufnahme-Systeme. In *B. subtilis* dient PerR als ein Mn- und Fe-abhängiger Repressor, dessen DNA-Bindungsaktivität Peroxid-sensitiv ist (Chen & Helmann, 1995; Bsat *et al.*, 1998; Herbig & Helmann, 2001). In *S. aureus* reguliert PerR als ein Mn-abhängiger Repressor die Transkription von Genen, die für antioxidante Proteine (KatA, AhpCF, Bcp, TrxB, NfrA), für die Einlagerung von Eisen (Ftn), das Ferritin-ähnliche Dps-Homolog MrgA sowie die Regulatoren Fur und PerR selbst kodieren (Horsburgh *et al.*, 2001b; Streker *et al.*, 2005). In *S. aureus* ΔclpP sind die Gene *ahpCF*, *nfrA* und *trxB* in ihrer Transkription erhöht (4.1.2.6). Die Transkription des Gens *ftnA* ist dagegen vermindert, sodass eine unvollständige Derepression des PerR-Regulons oder zusätzliche Regulationsmechanismen nicht ausgeschlossen werden können. In *S. aureus* kontrolliert MntR die Mn^{2+} -Homöostasis in Abhängigkeit der Manganverfügbarkeit und oxidativen Stressbedingungen und übt einen direkten Einfluss auf die Expression des PerR-Regulons aus. Obwohl Mangan toxisch für die Zelle ist, stellt die kontrollierte Manganaufnahme, aufgrund der antioxidanten Eigenschaften von Mn^{2+} , einen Abwehrmechanismus gegen Superoxid-Radikale dar. MntR kontrolliert die Expression der *mntABC*- und *mntH*-Gene, die für putative Mangan-Transporter kodieren. MntR kontrolliert in bifunktionaler Weise in Anwesenheit hoher Mangankonzentrationen die Expression des *mntABC*-Operons (SA0587-SA0589) positiv und *mntH* (SA0956) negativ (Horsburgh *et al.*, 2002b). In

S. aureus $\Delta clpP$ ist die Expression des *mntABC*-Operons erhöht und die des Gens *mntH* erniedrigt, sodass auf eine aktive Regulation durch MntR zu schließen ist. Im *mntABC*-Upstreambereich und in gegenläufiger Richtung liegt das Gen *mntR* (SA0590), dessen Expression von der *clpP*-Deletion nicht betroffen ist. Die DNA-Sequenz, an die MntR bindet konnte vor keinem weiteren Gen gefunden werden. Erst die Variation der Basenfolge führte zu der Identifikation eines weiteren potenziell MntR-regulierten Locus, der in der Expression vermindert ist. Dabei handelt es sich um die putative Transkriptionseinheit SA1437-SA1432, dessen Gene für hypothetische Proteine kodieren. SA1435 und SA1436 kodieren für ein AccB- und ein AccC-homologes Protein, die in die Fettsäuresynthese involviert sind. Das letzte Gen der Einheit kodiert für ein hypothetisches Protein, das ebenso wie MntH den NRAMP-Transportern zuzuordnen ist.

Der alternative Sigma-Faktor σ^B spielt eine Rolle bei *B. subtilis* in der transkriptionellen Regulation der Stressantwort. Dagegen ist die Funktion von σ^B in *S. aureus* nicht eindeutig geklärt. In *S. aureus* kontrolliert σ^B die Expression von Genen, die u.a. zu einer Resistenz gegenüber Hitze, Säure und oxidativen Stress führen (Kullik & Giachino, 1997; Chan *et al.*, 1998; Kullik *et al.*, 1998a; Gertz *et al.*, 2000; Horsburgh *et al.*, 2002a). Eine Analyse des Transkriptomts einer *sigB*-Mutante zeigte, dass 251 Gene durch σ^B transkriptionell beeinflusst werden (Bischoff *et al.*, 2004). In *B. subtilis* stehen mehr als 100 Gene unter der Kontrolle von σ^B , die bei Hitze, Säure-, Ethanol-, Salz- und oxidativen Stress benötigt werden (Antelmann *et al.*, 1996; Antelmann *et al.*, 1997; Völker *et al.*, 1999).

In *B. subtilis* erfolgt die Regulation der σ^B -Aktivität auf posttranskriptionaler Ebene. Das Gen *rsbW* kodiert für den Anti-Sigma-Faktor RsbW, der durch Komplexierung mit σ^B die Bindung des Sigma-Faktors an das Core-Enzym des RNA-Polymerase-Komplexes verhindert (Miyazaki *et al.*, 1999). RsbV dient als Anti-Anti-Sigma-Faktor, der im unphosphorylierten Zustand RsbW bindet und so die Bindung von σ^B an die RNA-Polymerase und die Transkription der σ^B -abhängigen Zielgene erlaubt (Dufour & Haldenwang, 1994; Yang *et al.*, 1996). Der Phosphorylierungsstatus von RsbV wird in *B. subtilis* auf zwei verschiedenen Wegen reguliert (Voelker *et al.*, 1995; Kullik *et al.*, 1998a). Der RsbU-abhängige Weg erfolgt unter Ethanol-, Salz- oder Hitzeschock-Bedingungen. Der RsbU-unabhängige Weg erfolgt unter Bedingungen, die eine Senkung des intrazellulären ATP-Gehalts zur Folge haben (stationäre Phase, Glukose- oder Phosphat-Mangel). Dabei wird RsbV nicht phosphoryliert und bindet

direkt RsbW, sodass σ^B freigesetzt wird. In *S. aureus* wurde bislang nur der RsbU-abhängige Weg nachgewiesen. Der *S. aureus*-Stamm 8325 und seine Derivate weisen eine 11 Bp Deletion in *rsbU* auf und gelten als natürliche *rsbU*-Mutanten, die einen σ^B -Defekt aufweisen. Jedoch wurde für den *S. aureus* Stamm RN6390, ein 8325-Derivat, σ^B -Aktivität nachgewiesen (Cheung *et al.*, 1999). Daher wird die Existenz eines RsbU-unabhängiger Weg in *S. aureus* nicht ausgeschlossen (Palma & Cheung, 2001).

Das *sigB*-Operon in *S. aureus* setzt sich aus den Genen *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB* zusammen. Die Gene werden von einem σ^A -abhängigen Promotor stromaufwärts von *rsbU* transkribiert. Eine weitere σ^B -abhängige Promotorsequenz befindet sich innerhalb des Operons, stromaufwärts von *rsbV*, die eine transkriptionale Autoregulation der Expression von *rsbV*, *rsbW* und *sigB* ermöglicht.

Die hier ermittelten Microarray-Ergebnisse ergaben, dass die Transkription der Gene des *sigB*-Operons in der $\Delta clpP$ -Mutante um das Vierfache erniedrigt ist (Tabelle 5). Mittels semi-quantitativer RT-PCR konnte die Erniedrigung in der *sigB*-Transkriptmenge bestätigt werden (4.1.2.14).

Die veränderte Transkription des *sigB*-Operons in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich mit den umgebenden Genen deutet auf eine Kotranskription mit dem „upstream“ gelegenen Gen SA1873 hin. Mittels RT-PCR konnte ein gemeinsames Transkript des ORFs SA1873 (*pemK*) und *rsbV* nachgewiesen werden (4.1.2.9, Abb. 19). Eine Kotranskription von SA1873 mit dem *sigB*-Operon, verbunden mit einer erhöhten Transkriptmenge wurde in *S. aureus* bei Wachstum bei 43°C nachgewiesen (Gertz *et al.*, 1999).

Der ORF SA1873 kodiert für ein hypothetisches Protein, das der COG-Gruppierung COG2337 zugeordnet wird. Diese Gruppe umfasst PemK/ChpA/MazF-ähnliche Proteine. Die Funktion dieses Proteins in *S. aureus* ist nicht geklärt. Das in *E. coli* gut charakterisierte MazE/MazF-System stellt ein Toxin/Antitoxin-System dar. Das MazE/MazF-System ist für reversible Bakteriostasis durch Hemmung der Translation und des Zellwachstums verantwortlich, die es den Zellen ermöglicht Stressbedingungen und Nährstoffmangel zu überdauern (Pedersen *et al.*, 2002). Die Regulation des Systems wird über die gezielte Proteolyse von MazE durch ClpAP gesteuert (Aizenman *et al.*, 1996). PemK wird von dem letzten Gens des Alanin-Racemase-Operons (SA1868-SA1873) kodiert (Kullik *et al.*, 1998b). Die *in silico*-

Analyse führte zu der Identifizierung eines potenziellen hochkonservierten *cre*-Elements (TTGCAATCGCATGCT) 34 Bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt von *pemK*. Das putative *cre*-Element stimmt in allen 15 Basen mit der für *B. subtilis* ermittelten Konsensussequenz überein (WTGNAANCGNWNWCW (Miwa *et al.*, 2000)). In *B. subtilis* wird die σ^B -Aktivität unter Glukose-Mangelbedingungen induziert. Man geht davon aus, dass durch den vorliegenden ATP-Mangelbedingungen, wie Phosphat- oder Glukose-Mangel der RsbU-unabhängige Weg zu einer Erhöhung der σ^B -Aktivität führt (Palma & Cheung, 2001). Ob in *S. aureus* PemK eine Rolle in Modifikation der σ^B -Aktivität spielt oder die Transkription des *sigB*-Operons durch Zugabe von Glukose gehemmt wird ist nicht bekannt. Das Gen *rpoS* des funktionell analogen Sigma-Faktors RpoS in *E. coli* verfügt im Upstreambereich über zwei CRP-DNA-Motive, die eine Hemmung der Expression des Sigma-Faktors bei Wachstum in Vollmedium ermöglichen (Lange *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit wurden 28 putative σ^B -abhängige ORFs identifiziert, von denen 22 als σ^B reguliert beschrieben sind (4.1.2.9). Von den potenziell σ^B -abhängigen Genen weisen drei eine erhöhte Transkriptionsrate auf. Die Transkription des Gens *sarA* ist in der $\Delta clpP$ -Mutante erhöht. Der Sar-Locus verfügt über drei Promotoren. Die σ^A -abhängigen Promotoren P1 und P2 werden in der exponentiellen Phase maximal exprimiert, während der σ^B -abhängige P3-Promotor seine Hauptaktivität in der postexponentiellen Phase aufweist (Manna *et al.*, 1998). Die SarA-Expression unterliegt einer komplexen Regulation, an der SarA als Aktivator sowie σ^B und SarR als negative Regulatoren beteiligt sind (Manna *et al.*, 1998; Cheung *et al.*, 1999; Manna & Cheung, 2001). In dem *rsbU*-negativen Stamm RN6390, einem Derivat des für die *clpP*-Deletion eingesetzten Stammes 8325, führt die Bindung des σ^B -RNAP-Komplexes an den *sarA*-P3-Promotor zu einer Steigerung der P3-abhängigen Expression und gleichzeitig zu einer Verringerung der P1-abhängigen Expression (Adhya & Gottesman, 1981; Manna *et al.*, 1998; Cheung *et al.*, 1999; Miyazaki *et al.*, 1999). Es wurde postuliert, dass aufgrund der relativen Nähe der drei Promotoren zueinander die Bindung von σ^B eine Konformationsänderung bewirkt, die eine Verringerung der σ^A -abhängigen Transkription zur Folge hat. Die gesteigerte Transkription des *sarA*-Locus in der $\Delta clpP$ -Mutante könnte weiterhin auf die verminderte Expression des Repressors SarR zurückgeführt werden sein. Über die transkriptionelle Regulation der Expression dieses Regulators liegen keine Daten vor.

In *S. aureus* wurden 31 putative YycFG-abhängige Gene durch das Vorhandensein einer YycF-spezifischen DNA-Erkennungssequenz identifiziert (Dubrac & Msadek, 2004). Für *lytM*, *ssa* und *isaA* wurde die Bindung von YycF experimentell bestätigt. Diese Gene sind in der $\Delta clpP$ -Mutante in ihrer Transkription stark erhöht (4.1.2.10). Mit Hilfe der konservierten YycF-Konsensussequenz wurde nach weiteren Vertretern YycFG-regulierter Gene gesucht, die in der $\Delta clpP$ -Mutante dereguliert sind. Dabei konnten DNA-Motive mit Homologien zu YycF-Bindungssequenzen im Upstreambereich von SA2285 (*aap*), *fnbB*, SA2447(*hsa*) und *vraF* identifiziert werden. Die bisher identifizierten Mitglieder des YycFG-Regulons in verschiedenen grampositiven Bakterien weisen daraufhin, dass das Zwei-Komponenten-System in die Regulation von Zellwandbiosynthese, Zellteilung und Virulenz involviert ist (Martin *et al.*, 1999; Fukuchi *et al.*, 2000; Howell *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2003; Dubrac & Msadek, 2004). Es wurde postuliert, dass YycFG für die Koordination des Membranwachstums in Abhängigkeit zu den Redox-Bedingungen verantwortlich ist (Martin *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000). Das aktivierende Signal, das von der Sensorkinase YycG erkannt wird, ist bislang unbekannt. YycG zeichnet sich durch den Besitz einer PAS-Domäne aus (Gu *et al.*, 2000). PAS-Domänen können Signale wie Sauerstoff, Licht, Redoxverhältnisse über die Bindung kleiner regulatorischer Moleküle, wie NAD, Haem, FAD und ATP erfassen (Pellequer *et al.*, 1995; Taylor & Zhulin, 1999; Bibikov *et al.*, 2000; Delgado-Nixon *et al.*, 2000; Stephenson & Hoch, 2001).

Die Transkriptomanalyse der $\Delta clpP$ -Mutante ergab, dass eine Reihe von Genen, die für anaerobes Wachstum benötigt werden in der Transkription vermindert sind. Die Untersuchungen zum Wachstum unter anaeroben Bedingungen und die verminderte Arginin-Deiminase-Aktivität deutet auf einen Defekt der Genregulation in Anpassung an anaerobe Bedingungen hin. Die verminderte Aktivität der Arginin-Deiminase in $\Delta clpP$ könnte auf eine Deregulierung der Transkription des Arginin-Deiminase-Operons (*arcABDCR*) hinweisen. Die Signalintensitäten der Gene des *arc*-Operons konnten, bis für das Gen *arcA* mit verminderter Transkription, in der Microarray-Analyse nicht ermittelt werden, sodass unter den gewählten Bedingungen keine eindeutige Aussage bezüglich der Transkription in Abwesenheit von *clpP* getroffen werden kann (4.1.2.11). Bei grampositiven Bakterien wird die Transkription des *arc*-Operons in Abhängigkeit der Sauerstoffbedingungen, der Arginin- und der Glukoseverfügbarkeit reguliert (Maghnouj *et al.*, 2000; Barcelona-Andres *et al.*, 2002;

Zuniga *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2004). In *S. aureus* kodiert *arcR* für den Transkriptionsregulator ArcR der konservierten Crp/Fnr-Familie (zur Übersicht Körner *et al.*, 2003)). Regulatoren dieser Familie zeichnen sich durch den Besitz eines [4Fe-4S]-Clusters aus, das sich aufgrund eines Cystein-Motivs in der Aminosäuresequenz vorhersagen lässt. In *E. coli* ist Fnr ein Fe-S-Protein, das als Sauerstoffsensord fungiert (Green *et al.*, 1996; Unden & Schirawski, 1997; Kiley & Beinert, 1998). In *B. subtilis* besitzt Fnr kein Fe-S-Cluster und ist somit eher mit der PrfA-Regulatorfamilie verwandt. In *B. subtilis* wird die aerobe und die anaerobe Atmung durch ResDE über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus reguliert (Nakano *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1997). Der durch das Fehlen von Sauerstoff durch die Sensorkinase ResD aktivierte Response-Regulator ResE steigert u.a. die Transkription der Gene der Nitrat-Atmung (*nasDE*), der Fermentation (*adhE*, *ldh*), des Flavohemoglobins (*hmp*) und des redox-regulatorischen Proteins Fnr (*fnr*) (Nakano *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996; Cruz Ramos *et al.*, 2000; Marino *et al.*, 2001; Nakano & Zhu, 2001). In *S. aureus* existiert ein Zwei-Komponenten-System mit großer Ähnlichkeit zu ResDE. Dabei handelt es sich um SrrAB (oder auch SrrSR). Eine Mutation des Systems führte zu einer Veränderung der Zellmorphologie, veränderte Expression von Genen, deren Produkte in den Energiegewinnung und andere metabolische Prozesse involviert sind (Throup *et al.*, 2001). Es beeinflusst die Expression von Virulenzfaktoren unter Bedingungen mit geringer Sauerstoffverfügbarkeit und hemmt die RNAIII-Expression (Pragman *et al.*, 2004). Die Expression der Gene *srrAB* ist in der $\Delta clpP$ -Mutante unverändert. Die Analyse der potenziell Fnr/ArcR-regulierten Gene deutet auf die Hemmung der aktivierenden Funktion hin.

CcpA gehört zu der Familie der LacI-Repressoren (Weickert & Adhya, 1992). Dabei handelt es sich um einen bifunktionalen Regulator, der sowohl Repressor- als auch Aktivator-Funktion in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Glukose- und anderer Kohlenstoffquellen im Medium aufweist (Hueck *et al.*, 1994; Henkin, 1996). Die Bindung von CcpA an spezifische DNA-Erkennungssequenzen, den *cre*-Elementen, erfolgt durch einen typischen bakteriellen Repressor-Operator-Komplex, dem die typischen Repressor-Operator-Interaktion folgt (Kim & Chambliss, 1997). Die CcpA-Bindungsaffinität ist relativ gering im Vergleich zu anderen bakteriellen Repressoren und benötigt die Interaktion mit einem Korepressor (Miwa *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1998). Bekannte Korepressoren sind HPr, ein Phosphatgruppenüberträger-Protein

des Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-Systems, zwei glykolytische Metabolite (Fruktose 1,6-Bisphosphat (FDP) und Glukose 6-Phosphat) sowie NADP (Deutscher *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1995; Gosseringer *et al.*, 1997; Miwa *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998).

Die computerunterstützte Suche nach putativen *cre*-Elementen im N315-Genom führte zu der Identifizierung von 27 Genen, die in der $\Delta clpP$ -Mutante unterschiedlich exprimiert werden (4.1.2.13). Davon sind 20 in der Expression erniedrigt, von denen die Gene *pfIB*, *lctE*, *lctP* und *arcA* potenziell zusätzlich durch den Regulator Fnr/ArcR kontrolliert werden (4.1.2.11). Zusätzlich wurden die Gene *spIB*, *hla* und *lip* als potenziell Katabolit-reprimiert identifiziert. Das putative *cre*-Element im Upstreambereich des Gens *hla* befindet sich unmittelbar am *hla*-Transkriptionsstartpunkt, der sich -332 Bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt befindet (Novick, 1991). Einen Hinweis auf die mögliche Regulation durch Katabolit-Repression, könnte die Beobachtung der Hemmung der *hla*-Transkription durch Glukose darstellen (Duncan & Cho, 1972; Ohlsen, 2001). Eine Erklärung für die zumindest teilweise aktive Katabolit-Repression in $8325\Delta clpP$, könnten die Veränderungen der intrazellulären Redoxbedingungen darstellen. Die erhöhte Aktivität des Thioredoxin-Systems könnte zu einem Mangel an Reduktionsäquivalenten führen, sodass sich das NAD(P)H/NAD(P)-Verhältnis zu Ungunsten von NAD(P)H verschiebt. Eine erhöhte Verfügbarkeit von NADP dient in *B. subtilis* als Korepressor von CcpA und würde somit die Katabolit-Repression begünstigen (Kim *et al.*, 1998).

Die Auswirkung der Deletion von *clpP* auf die globale Genexpression, insbesondere der Virulenzfaktor-kodierender Gene, führt zu vielfältigen Effekten, die in zukünftigen Untersuchungen geklärt müssen. Es existieren verschiedene Hinweise für die veränderte Virulenzfaktor-Expression in Abhängigkeit veränderter Redox-Verhältnisse. So könnte die verminderte Fähigkeit des $\Delta clpP$ -Mutante an Polystyren zu adhären auf eine verminderte PIA (polysaccharide intercellular adhesin)-Expression aufgrund einer verminderten Transkription des *ica*-Operons zurückzuführen sein (Heilmann *et al.*, 1996; Mack *et al.*, 1996). Die PIA-Expression ist für die Zell-Zell-Interaktion innerhalb eines Biofilms notwendig. Anaerobe Bedingungen induzieren die *ica*-Expression in *S. aureus* und *S. epidermidis* über einen unbekanntem Mechanismus (Cramton *et al.*, 2001). Die erhöhte Autolyse der $\Delta clpP$ -Mutante könnte auf die verminderte Transkription des Gens des Regulators

RAT zurückzuführen sein, der potenziell von Fnr/ArcR reguliert wird. Außerdem könnte die durch die positive Regulation durch das Zwei-Komponenten-System YycF erhöhte Transkription des Gens der Peptidoglykan-Hydrolase LytM zu diesem Effekt führen. Die erhöhte Internalisierung der $\Delta clpP$ -Mutante durch 293T-Zellen kann mit der erhöhten Transkription der Gene der Fibronectin-bindenden Proteine (*fnb*, *fnbB*) in Verbindung gebracht werden, die für die Internalisierung von *S. aureus* notwendig sind. Fibronectin ermöglicht die indirekte Bindung der Oberflächen-assoziierten Adhäsine an die $\beta_1\alpha_5$ -Integrine der Wirtszelle. Die Frage der Eignung von *clpP* als Zielstruktur für die Entwicklung von antiinfektiven Therapien konnte in diesem Ansatz nicht geklärt werden. Trotz schwerwiegender Wachstumsdefekte *in vitro* ist die Rolle von *clpP* während eines Infektionsverlauf nicht geklärt. Weitere Untersuchungen in Form von Infektionsmodellen könnten weitere Erkenntnisse erbringen.

5.2..Die Inaktivierung von *arlRS* führt zu einer Attenuierung der Virulenz und einem stark veränderten globalen Transkriptionsprofil

Die Deletion der Gene *arlR* und *arlS* im Stamm 8325 führte zu einem veränderten Phänotyp, der die gesteigerte Fähigkeit an Polystyren zu adhären, die erhöhte hämolytische Aktivität sowie die gesteigerte Triton X-100 induzierbaren Autolyse von *arl*-Mutanten bestätigte (Fournier & Hooper, 2000; Fournier *et al.*, 2001). In Übereinstimmung zu den im Stamm 8325 beobachteten Auswirkungen der *arl*-Inaktivierung konnte die induzierbare Autolyse auch in den Stämmen 377 und COL beobachtet werden. Dagegen wiesen diese Stämme keine Unterschiede zu dem jeweiligen isogenen Wildtypstamm bezüglich der Adhärenz an Polystyren und der hämolytischen Aktivität auf. Die Deletion der Gene *arlR* und *arlS* führte zu einer Verminderung der Internalisierungsraten durch 293T-Zellen in einem Zellkulturassay. Obwohl die mikroskopische Kontrolle der 293T-Zellen keine erkennbaren Veränderungen der Zellmorphologie erkennen ließ, könnte eine erhöhte hämolytische Aktivität der Bakterien zu einer Schädigung der Epithelzellen führen, sodass nach Abtötung der extrazellulären Bakterien mit Lysostaphin und Gentamicin eine reduzierte Keimzahl ermittelt wurde. Die Beurteilung der Mutanten $377\Delta arlR$ und $COL\Delta arlS$ war aufgrund einer bereits sehr geringen Invasivität der Wildtypstämme nicht zu ermitteln. In einem Katheter-assoziierten Infektionsmodell in Ratten wiesen die Stämme $377\Delta arlR$ und $COL\Delta arlS$ in einem kompetitiven Ansatz mit dem

jeweiligen Wildtypstamm eine verminderte Kolonisierung der Organe auf. Die Transkriptomanalyse der 8325 Δ *arlR*-Mutante in der exponentiellen Phase (OD1) und in der frühen stationären Phase OD3 ergab ein stark verändertes Transkriptprofil (siehe 4.2.2 und 7.2).

Die grosse Anzahl der deregulierten Gene erschwert die Interpretation des direkten Einflusses des ArIRS-Zwei-Komponenten Systems auf die Genexpression. Das ArIRS-Zwei-Komponenten System reguliert die Expression des *agr*-Systems negativ (Fournier *et al.*, 2001). Die Transkriptomanalyse bestätigt diese Ergebnisse, da eine deutliche Erhöhung der Transkription der Gene *agrC* und *agrA* zu beiden getesteten Zeitpunkten des Wachstumsverlaufs nachgewiesen werden konnte (4.2.2, Tabelle 19). Neben der erhöhten Expression der Gene *agrC* und *agrA* konnte ebenfalls eine verstärkte RNAlII-Expression mittels Northern Blot-Analyse nachgewiesen werden (4.2.2.2, Abb. 28). Aufgrund der globalen Regulation der Virulenzfaktor-Expression, deren Hauptregulator das *agr*-System darstellt, stehen diese Ergebnisse im direkten Zusammenhang mit den beschriebenen Veränderungen des Phänotyps der *arl*-Mutanten (diese Arbeit,; Fournier & Hooper, 2000; Fournier *et al.*, 2001).

Für die Expression der positiv durch *agr*-regulierten Gene *coa*, *geh*, *spl*-Operon, *lip*, *ebhB*, *hsa*, *hla*, *hlb*, *hlgC*, *hlgB* konnte hier bei beiden getesteten Wachstumphasen eine deutliche Erhöhung in der Δ *arlR*-Mutante nachgewiesen werden (Dunman *et al.*, 2001; Novick, 2003b). Trotz erhöhter Virulenzfaktorexpression *in vitro* führte die Inaktivierung des *arl*-Locus zu einer attenuierten Virulenz. Daher wäre eine Analyse der Auswirkungen der *arl*-Inaktivierung unter *in vivo*-Bedingungen ein interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen.

5.3. Die Deletion von *purH* führt zu einer Attenuierung von *S. aureus* *in vivo*

Die Gene *putP* und *purH* kodieren für eine Prolinpermease und eine Komponente der *de novo*-Purinbiosynthese und konnten in dieser Arbeit erfolgreich deletiert werden (4.3). *In vitro* wurden keine Veränderungen des Phänotyps der Mutantenstämme im Vergleich zum isogenen Wildtypstamm bezüglich des Wachstums unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, Osmolarität), Adhärenz an Polystyren, Hämolyse sowie in der Internalisierungsrate durch 293T-Zellen in einem Zellkulturassay beobachtet. Um die Bedeutung der beiden Gene näher zu

untersuchen, wurden Experimente mit den hergestellten Mutanten unter *in vivo*-Bedingungen durchgeführt.

Die Deletion von *purH* in dem Stamm MA12 führte zu einer deutlichen Attenuierung *in vivo*. In einem Infektionsmodell in Ratten war die Kolonisierung der Leber und der Milz durch MA12 Δ *purH* um das 10³ bis 10⁴-fache im Vergleich zu MA12Wt reduziert. In den Organen Lunge, Herz und Nieren konnten keine Bakterien mehr nachgewiesen werden. Die stark verminderte Fähigkeit der Organbesiedelung ist auf die verringerte Verfügbarkeit von Purinen im Wirtsgewebe zurückzuführen, die zu der Annahme führten, dass die *de novo*-Purinbiosynthese einen essenziellen Stoffwechselweg *in vivo* darstellt (Shea *et al.*, 2000). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass *putP* ebenso wie *purH* für einen *in vivo*-Überlebensfaktor kodiert. Das Wachstum der *S. aureus putP*-Mutante war besonders in Organen mit niedriger Prolinkonzentration reduziert, wie in Milz und Leber der Maus (Schwan *et al.*, 1998; Schwan *et al.*, 2004). Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass für die Ermittlung der Rolle einiger Gene für die Virulenz eines Organismus die *in vitro*-Analysen nicht ausreichen, sondern zusätzliche *in vivo*-Experimente notwendig sind.

5.4. Essentialität der Gene *smpB* und *ssrA* in *S. aureus*

In dieser Arbeit gelang es trotz Anwendung von unterschiedlichen experimentellen Ansätzen nicht, die Gene *smpB* (SA0736) und *ssrA* (SAtmRNA01) zu inaktivieren und die Frage der Essentialität dieses Systems eindeutig zu klären. Der Versuch der Inaktivierung des Gens *smpB* durch Insertion einer *ermB*-Kassette verlief erfolglos, obwohl mehrere Tausend Klone getestet wurden. Erst nach wiederholten Integrationsversuchen der *ermB*-Kassette in das Gen *ssrA* und der Überprüfung von ebenfalls mehreren Tausend Klonen in den zwei verschiedenen *S. aureus*-Stämmen COL und MA12 konnte eine MA12*ssrA::ermB*-Mutante isoliert werden. Im Gegensatz zu *E. coli* und *B. subtilis* (Komine *et al.*, 1994; Muto *et al.*, 2000) konnte keine Beeinträchtigung des Wachstums unter verschiedenen Bedingungen, wie Temperatur (30°C, 37°C, 42°C, 45°C) und Osmolarität (1 M NaCl) festgestellt werden. Die Analyse der *ssrA*- und *ermB*-Transkripte mittels Northern-Blot zeigte, dass die beiden Gene ein Kotranskript bilden. Die Insertionsstelle der *ermB*-Kassette innerhalb der *ssrA*-Sequenz befindet sich in einem Bereich (+ 35, *SacI*-Schnittstelle), der nicht für die tRNA- oder mRNA-Funktion verantwortlich ist (Abb. 42). Inwieweit die Intergation

der *ermB*-Kassette die Bildung der Sekundärstruktur des funktionellen tmRNA-Moleküls beeinflusst, bleibt ungeklärt. Die korrekte Faltung des tmRNA-Moleküls und der damit verbundenen vollen Funktionalität bei integrierter *ermB*-Sequenz ist nicht auszuschließen.

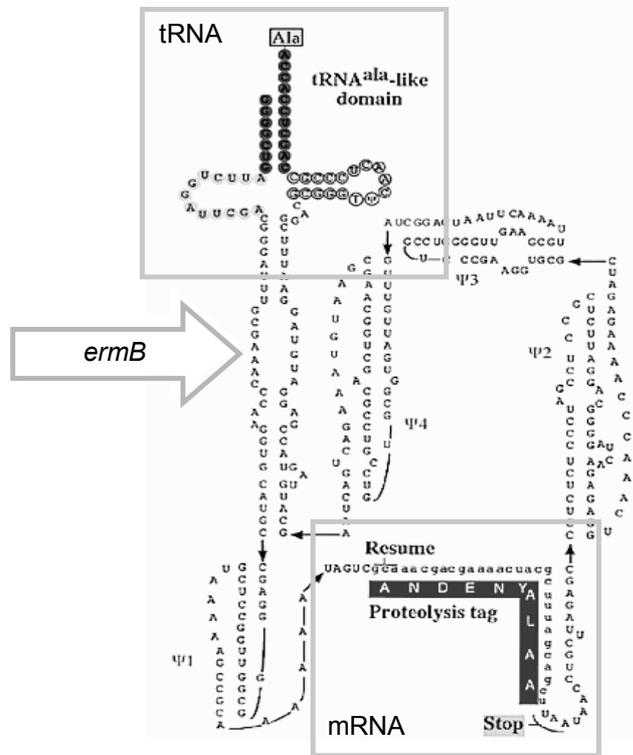


Abb. 42 Darstellung der Insertionstelle der *ermB*-Kassette (Pfeil) innerhalb der *ssrA*-Sequenz in *S. aureus* MA12*ssrA::ermB* (*SacI*-Schnittstelle, + 35), basierend auf einem Modell der tmRNA-Struktur in *E. coli* (Williams, 2002).

Die kontrollierte Expression der Gene *smpB* und *ssrA* mit Hilfe von konditionalen Systemen sollte Aufschluss über die potenzielle Essenzialität ermöglichen. Dazu sollten die wildtypischen *smpB*- und *ssrA*-Promotorbereiche durch ein regulierbares Promotorsystem (Xylose-Promotor/Operator-System) ausgetauscht werden (siehe 4.4.3.1). Trotz mehrfacher Wiederholung der Integration des Xylose-Promoters durch ein einfaches Crossover-Ereignis in den Upstreambereich des Gens *ssrA*, gelang es nicht, eine konditionale *PxyIRssrA*-Mutante zu isolieren. Dagegen konnte eine konditionale *PxyIRsmpB*-Mutante im *S. aureus*-Stamm 377 hergestellt werden. Die Zugabe von Glukose als Repressor oder Xylose als Induktor der *smpB*-Expression führte zu keiner Veränderung des Wachstums des Stammes 377*PxyIRsmpB* im Vergleich zum Wildtypstamm. Die Northern Blot-Analyse der *smpB*-Expression ergab, dass ohne die Zugabe einer Kohlenstoffquelle oder des Repressors Glukose kein Transkript nachweisbar war. Die Zugabe von Xylose führte zu einer deutlichen

Erhöhung des detektierbaren Transkriptes. Da das *smpB*-Transkript unter den gewählten Bedingungen nicht nachweisbar war, konnte die Repression durch die Zugabe von Glukose und die Eignung des konditionalen Expressionssystems nicht beurteilt werden. Allerdings wurde in anderen Arbeiten bereits eine hohe Basisaktivität des hier verwendeten Xylose-Systems beschrieben (Zhang *et al.*, 2000). Zusätzlich zeigte sich, dass die chromosomale Integration von *xylR* durch ein einfaches Crossover-Ereignis, aufgrund der Duplizierung des für die homologe Rekombination benötigten 5'-*smpB*-Fragmentes, instabil war. Der nicht veränderte Phänotyp der 377 *PxylR**smpB*-Mutante legt den Schluss nahe, dass das Gen *smpB* nicht essenziell in *S. aureus* ist. Jedoch bleibt die Frage der Essenzialität, aufgrund der nicht ausschließbaren Basisaktivität des Xylose-Promotors und der Instabilität der chromosomalen Integration offen.

In einem weiteren Ansatz wurde die konditionale Expression der Gene *smpB* und *ssrA* durch die kontrollierte Synthese der genspezifischen Antisense-RNA mit Hilfe des Xylose-Regulons verfolgt. Durch den Einsatz eines Expressionsplasmids, das das Xylose-Regulon und die komplementäre Gensequenz des zu hemmenden Gens beinhaltet, sollte die Translation (*smpB*) bzw. Funktionalität (*ssrA*) des Zielgen-Transkriptes inhibiert werden. Dabei hängt die Hemmung des wildtypischen Transkriptes von der bereits nachgewiesenen guten Induzierbarkeit durch Xylose ab (s. o.). Der Einsatz der gesamten komplementären *smpB-ssrA*-Sequenz führte bereits ohne die Zugabe einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle zu einer Wachstumsbeeinträchtigung. Die Zugabe von Xylose verstärkte den Effekt. Allerdings ließ sich die Wachstumshemmung durch die Zugabe von Glukose nicht wieder aufheben. Die Northern Blot-Analyse zeigte, dass ohne Zugabe des Substrates bereits eine Erhöhung der *smpB*- und *ssrA*-Transkriptmenge zu beobachten war, die durch die Zugabe von Glukose nicht erniedrigt werden konnte. Die Zugabe von Xylose induzierte die *smpB*- und *ssrA*-Expression. Die Ergebnisse der Eingrenzung des für die Hemmung verantwortlichen Bereichs innerhalb der *smpB-ssrA*-Sequenz waren nicht eindeutig. Tendenziell konnte ein Einfluss auf das Wachstum durch Bereiche erzielt werden, die die *smpB*-Sequenz enthalten. Die induzierte Expression der *smpB*-spezifischen Antisense-RNA allein führte zu keiner Wachstumshemmung. Daraus lässt sich schließen, dass entweder der gesamte Bereich benötigt wird oder dass mittels Antisense-RNA keine ausreichende Hemmung der Expression möglich ist. Der Erfolg der Antisense-RNA-Strategie hängt stark von der Abundanz und

Sekundärstruktur der individuellen Zielgen-RNA ab und ist daher nur bedingt einsetzbar (Case *et al.*, 1989; Forsyth *et al.*, 2002).

Mit den in dieser Arbeit eingesetzten Methoden konnte der essenzielle Charakter des SsrA-SmpB-Systems nicht eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings zeigen die Schwierigkeiten bei der Herstellung der Mutanten, dass eine Inaktivierung zumindest zu einem deutlichen Wachstumsnachteil führt. Unter Standard-Laborbedingungen ist die tmRNA in *B. subtilis* und *E. coli* nicht essenziell. *ssrA*- und *smpB*-Mutanten weisen nur geringe phänotypische Veränderungen auf, wie verlangsamtes Wachstum und Temperatursensitivität bei 45°C. Die Inaktivierung der tmRNA führte zu der Unterdrückung der Temperatursensitivität verschiedener *E. coli*-Mutanten. Der essenzielle Charakter des SsrA-SmpB-Systems wurde bislang für *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* und *M. pneumoniae* nachgewiesen (Hutchison *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000).

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdelnour, A., S. Arvidson, T. Bremell, C. Ryden and A. Tarkowski (1993).** The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun* 61: 3879-85.
- Abo, T., K. Ueda, T. Sunohara, K. Ogawa and H. Aiba (2002).** SsrA-mediated protein tagging in the presence of miscoding drugs and its physiological role in *Escherichia coli*. *Genes Cells* 7: 629-38.
- Adhya, S. and M. Gottesman (1981).** Promoter occlusion: transcription through a promoter may inhibit its activity. *Cell* 29: 939-944.
- Aizenman, E., H. Engelberg-Kulka and G. Glaser (1996).** An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6059-63.
- Alkema, W. B., B. Lenhard and W. W. Wasserman (2004).** Regulog analysis: detection of conserved regulatory networks across bacteria: application to *Staphylococcus aureus*. *Genome Res* 14: 1362-73.
- Alksne, L. E. and S. J. Projan (2000).** Bacterial virulence as a target for antimicrobial chemotherapy. *Curr Opin Biotechnol* 11: 625-36.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Ando, M., Y. C. Manabe, P. J. Converse, E. Miyazaki, R. Harrison, J. R. Murphy and W. R. Bishai (2003).** Characterization of the Role of the Divalent Metal Ion-Dependent Transcriptional Repressor MntR in the Virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 71: 2584-2590.
- Antelmann, H., S. Engelmann and R. Schmid (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., J. Bernhardt, R. Schmid, H. Mach, U. Völker and M. Hecker (1997).** First steps from a two-dimensional protein index towards a response-regulation map for *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* 18: 1451-1463.
- Arthur, M., P. Reynolds and P. Courvalin (1996).** Glycopeptide resistance in *enterococci*. *Trends Microbiol* 4: 401-7.
- Atkins, J. F. and R. F. Gesteland (1996).** A case for trans translation. *Nature* 379: 769-71.
- Autret, N., C. Raynaud, I. Dubail, P. Berche and A. Charbit (2003).** Identification of the *agr* Locus of *Listeria monocytogenes*: Role in Bacterial Virulence. *Infect Immun* 71: 4463-4471.
- Bae, J.-H. and K. J. Miller (1992).** Identification of two proline transport systems in *Staphylococcus aureus* and their possible roles in osmoregulation. *Appl Environ Microbiol* 58: 471-475.
- Baichoo, N., T. Wang, R. Ye and J. D. Helmann (2002).** Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* 45: 1613-29.
- Balaban, N., T. Goldkorn, Y. Gov, M. Hirshberg, N. Koyfman, H. R. Matthews, R. T. Nhan, B. Singh and O. Uziel (2001).** Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating Protein (TRAP). *J Biol Chem* 276: 2658-67.
- Barber, M. and M. Rozwadowska-Dowzenko (1948).** Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* ii: 641-644.
- Barcelona-Andres, B., A. Marina and V. Rubio (2002).** Gene Structure, Organization, Expression, and Potential Regulatory Mechanisms of Arginine Catabolism in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 184: 6289-6300.
- Bayer, A. S., S. N. Coulter, C. K. Stover and W. R. Schwan (1999).** Impact of the High-Affinity Proline Permease Gene (*putP*) on the Virulence of *Staphylococcus aureus* in Experimental Endocarditis. *Infect Immun* 67: 740-744.
- Bayles, K. W., C. A. Wesson, L. E. Liou, L. K. Fox, G. A. Bohach and W. R. Trumble (1998).** Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* 66: 336-42.

- Benton, B. M., J. P. Zhang, S. Bond, C. Pope, T. Christian, L. Lee, K. M. Winterberg, M. B. Schmid and J. M. Buysse (2004). Large-Scale Identification of Genes Required for Full Virulence of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **186**: 8478–8489.
- Bibikov, S. I., L. A. Barnes, Y. Gitin and J. S. Parkinson (2000). Domain organization and flavin adenine dinucleotide-binding determinants in the aerotaxis signal transducer Aer of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 5830–5835.
- Bischoff, M., J. M. Entenza and P. Giachino (2001). Influence of a functional *sigB* operon on the global regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **183**: 5171-9.
- Bischoff, M., P. Dunman, J. Kormanec, D. Macapagal, E. Murphy, W. Mounts, B. Berger-Bächi and S. Projan (2004). Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* sigmaB regulon. J Bacteriol **186**: 4085-99.
- Bisognano, C., W. L. Kelley, T. Estoppey, P. Francois, J. Schrenzel, D. Li, D. P. Lew, D. C. Hooper, A. L. Cheung and P. Vaudaux (2003). A RecA-LexA dependent pathway mediates ciprofloxacin-induced fibronectin binding in *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem: M309836200.
- Bohach, G. A., D. J. Fast, R. D. Nelson and P. M. Schlievert (1990). Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. Crit Rev Microbiol **17**: 251-72.
- Boyce, J. D., I. Wilkie, M. Harper, M. L. Paustian, V. Kapur and B. Adler (2002). Genomic scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within the natural chicken host. Infect Immun: 6871–6879.
- Brückner, R. (1992). A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Gene **122**: 187-192.
- Brückner, R. (1997a). Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. FEMS Microbiology Letters **151**: 1-8.
- Brückner, R. (1997b). Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. FEMS Microbiol Lett **151**: 1-8.
- Bsat, N., A. Herbig, L. Casillas-Martinez, P. Setlow and J. D. Helmann (1998). *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. Mol Microbiol **29**: 189-198.
- Bunce, C., L. Wheeler, G. Reed, J. Musser and N. Barg (1992). Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci. Infect Immun **60**: 2636-2640.
- Case, C. C., S. M. Roels, P. D. Jensen, J. Lee, N. Kleckner and R. W. Simons (1989). The unusual stability of the IS10 anti-sense RNA is critical for its function and is determined by the structure of its stem-domain. EMBO J **8**: 4297-4305.
- Cersini, A., A. M. Salvia and M. L. Bernardini (1998). Intracellular multiplication and virulence of *Shigella flexneri* auxotrophic mutants. Infect Immun **66**: 549-57.
- Cersini, A., M. C. Martino, I. Martini, G. Rossi and M. L. Bernardini (2003). Analysis of virulence and inflammatory potential of *Shigella flexneri* purine biosynthesis mutants. Infect Immun **71**: 7002-13.
- Cha, R., W. J. Brown and M. J. Rybak (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**: 3960-3.
- Chalker, A. F. and R. D. Lunsford (2002). Rational identification of new antibacterial drug targets that are essential for viability using a genomics-based approach. Pharmacol Ther **95**: 1-20.
- Chan, P. F. and S. J. Foster (1998). Role of SarA in Virulence Determinant Production and Environmental Signal Transduction in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **180**: 6232-6241.
- Chan, P. F., S. J. Foster, E. Ingham and M. O. Clements (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**: 6082-9.
- Chang, S., D. M. Sievert, J. C. Hageman, M. L. Boulton, F. C. Tenover, F. P. Downes, S. Shah, J. T. Rudrik, G. R. Pupp, W. J. Brown, D. Cardo and S. K. Fridkin (2003). Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med **348**: 1342-7.

- Chastanet, A., M. Prudhomme, J.-P. Claverys and T. Msadek (2001). Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* Genes and Their Role in Competence Development and Stress Survival. J Bacteriol **183**: 7295-7307.
- Chastanet, A., J. Fert and T. Msadek (2003). Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. **47**: 1061-1073.
- Chen, L. and J. D. Helmann (1995). *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps(PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene. Mol Microbiol **18**: 295-300.
- Cheo, D. L., K. W. Bayles and R. E. R. E. Yasbin (1991). Cloning and characterization of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **173**: 1696-1703.
- Cheung, A., K. Eberhardt, E. Chung, M. Yeaman, P. Sullam, M. Ramos and A. Bayer (1994). Diminished virulence of a *sar-lagr-* mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. J Clin Invest **95**: 1815-22.
- Cheung, A. L., Y. T. Chien and A. S. Bayer (1999). Hyperproduction of alpha-hemolysin in a sigB mutant is associated with elevated SarA expression in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun **67**: 1331-7.
- Cheung, A. L., A. S. Bayer, G. Zhang, H. Gresham and Y.-Q. Xiong (2004). Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunology and Medical Microbiology **40**: 1-9.
- Cheung, A. L., G. Zhang (2002). Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA Protein family. Frontiers in Bioscience **7**: d1825-1842.
- Chiang, S. L., J. J. Mekalanos and D. W. Holden (1999). *In vivo* genetic analysis of bacterial virulence. Annu Rev Microbiol **53**: 129-54.
- Collier, J., E. Binet and P. Bouloc (2002). Competition between SsrA tagging and translational termination at weak stop codons in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **45**: 745-54.
- Cortes, G., B. de Astorza, V. J. Benedi and S. Alberti (2002). Role of the *htrA* gene in *Klebsiella pneumoniae* virulence. Infect Immun **70**: 4772-6.
- Coulter, S. N., W. R. Schwan, E. Y. W. Ng, M. H. Langhorne, H. D. Ritchie, S. Westbrook-Wadman, W. O. Hufnagle, K. R. Folger, A. S. Bayer and C. K. Stover (1998). *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. Mol Microbiol **30**: 393-404.
- Cramton, S. E., M. Ulrich, F. Götz and G. Döring (2001). Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun **69**: 4079-4085.
- Cross, A. S., S. M. Opal, H. S. Warren, J. E. Palardy, K. Glaser, N. A. Parejo and A. K. Bhattacharjee (2001). Active immunization with a detoxified *Escherichia coli* J5 lipopolysaccharide group B meningococcal outer membrane protein complex vaccine protects animals from experimental sepsis. J Infect Dis **183**: 1079-1086.
- Cruz Ramos, H., T. Hoffmann, M. Marino, H. Nedjari, E. Presecan-Siedel, O. Dreesen, P. Glaser and D. Jahn (2000). Fermentative Metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and Regulation of Gene Expression. J Bacteriol **182**: 3072-3080.
- Csonka, L. N. and A. D. Hanson (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. Annu Rev Microbiol **45**: 569-606.
- de la Cruz, J. and A. Vioque (2001). Increased sensitivity to protein synthesis inhibitors in cells lacking tmRNA. Rna **7**: 1708-16.
- de Saizieu, A., U. Certa, J. Warrington, C. Gray, W. Keck and J. Mous (1998). Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. Nat Biotechnol **16**: 45-8.
- De Sousa, M. A. and H. De Lancastre (2004). Bridges from hospitals to the laboratories: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. FEMS Immunol Med Microbiol **40**: 101-111.
- Delgado-Nixon, V. M., G. Gonzalez and M. A. Gilles-Gonzalez (2000). Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. Biochemistry **39**: 2685-2691.
- Deora, R., T. Tseng and T. Misra (1997). Alternative transcription factor sigmaSB of *Staphylococcus aureus*: characterization and role in transcription of the global regulatory locus *sar*. J Bacteriol **179**: 6355-6359.

- Derre, I., G. Rapoport and T. Msadek (1999).** CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. Mol Microbiol **31**: 117-131.
- Derre, I., G. Rapoport and T. Msadek (2000).** The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37°C. Mol Microbiol **38**: 335-347.
- Deuerling, E., B. Paeslack and W. Schumann (1995).** The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is transiently induced after osmotic and temperature upshift. J Bacteriol: 4105–4112.
- Deutscher, J., J. Reizer, C. Fischer, A. Galinier, M. H. Saier, Jr. and M. Steinmetz (1994).** Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the *ptsH* gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **176**: 3336-3344.
- DiRita, V. J. and J. J. Mekalanos (1989).** Genetic regulation of bacterial virulence. Annu Rev Genet **23**: 455-82.
- Dong, Y., Y.-Y. M. Chen and R. A. Burne (2004).** Control of Expression of the Arginine Deiminase Operon of *Streptococcus gordonii* by CcpA and Flp. J Bacteriol **186**: 2511-2514.
- Dubrac, S. and T. Msadek (2004).** Identification of Genes Controlled by the Essential YycG/YycF Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **186**: 1175-1181.
- Dufour, A. and W. G. Haldenwang (1994).** Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). J Bacteriol **176**: 1813–1820.
- Duncan, J. L. and G. J. Cho (1972).** Production of staphylococcal alpha toxin. II. Glucose repression of toxin formation. Infect Immun **6**: 689-94.
- Dunman, P. M., E. Murphy, S. Haney, D. Palacios, G. Tucker-Kellogg, S. Wu, E. L. Brown, R. J. Zagursky, D. Shlaes and S. J. Projan (2001).** Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. J Bacteriol **183**: 7341-53.
- Durack, D. T. and P. B. Beeson (1972).** Experimental bacterial endocarditis. II. Survival of a bacteria in endocardial vegetations. Br J Exp Pathol **53**: 50-3.
- Duwat, P., S. D. Ehrlich and A. Gruss (1999).** Effects of metabolic flux on stress response pathways in *Lactococcus lactis*. Mol Microbiol **31**: 845-858.
- Ehrman, M. and T. Clausen (2004).** Proteolysis as a Regulatory Mechanism. Annu Rev Genet.
- Fabret, C. and J. A. Hoch (1998).** A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. J Bacteriol **180**: 6375-6383.
- Fattom, A. I., J. Sarwar, A. Ortiz and R. Naso (1996).** A *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge. Infect Immun **64**: 1659-65.
- Federle, M. J., K. S. McIver and J. R. Scott (1999).** A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A *streptococcus*. J Bacteriol **181**: 3649-57.
- Fedhila, S., T. Msadek, P. Nel and D. Lereclus (2002).** Distinct *clpP* Genes Control Specific Adaptive Responses in *Bacillus thuringiensis*. J Bacteriol **184**: 5554-5562.
- Fedtke, I., A. Kamps, B. Krismer and F. Götz (2002).** The Nitrate Reductase and Nitrite Reductase Operons and the *narT* Gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC. J Bacteriol **184**: 6624-6634.
- Ferretti, J. J., W. M. McShan, D. Ajdic, D. J. Savic, G. Savic, K. Lyon, C. Primeaux, S. Sezate, A. N. Suvorov, S. Kenton, H. S. Lai, S. P. Lin, Y. Qian, H. G. Jia, F. Z. Najar, Q. Ren, H. Zhu, L. Song, J. White, X. Yuan, S. W. Clifton, B. A. Roe and R. McLaughlin (2001).** Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 4658-63.
- Flashner, Y., E. Mamroud, A. Tidhar, R. Ber, M. Aftalion, D. Gur, S. Lazar, A. Zvi, T. Bino, N. Ariel, B. Velan, A. Shafferman and S. Cohen (2004).** Generation of *Yersinia pestis* attenuated strains by signature-tagged mutagenesis in search of novel vaccine candidates. Infect Immun **72**: 908-15.
- Flock, J.-I. and F. Brennan (1999).** Antibodies that block adherence of *Staphylococcus aureus* to fibronectin. Trends Microbiol **7**: 140-141.

- Flynn, J. M., S. B. Neher, Y. I. Kim, R. T. Sauer and T. A. Baker (2003). Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP Protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. Mol Cell **11**: 671-683.
- Forsyth, R. A., R. J. Haselbeck, K. L. Ohlsen, R. T. Yamamoto, H. Xu, J. D. Trawick, D. Wall, L. Wang, V. Brown-Driver, J. M. Froelich, K. G. C, P. King, M. McCarthy, C. Malone, B. Misiner, D. Robbins, Z. Tan, Z. Y. Zhu Zy, G. Carr, D. A. Mosca, C. Zamudio, J. G. Foulkes and J. W. Zyskind (2002). A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol **43**: 1387-400.
- Foster, T. J. (1991). Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus*. Vaccine **9**: 221-7.
- Foster, T. J. and M. Hook (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology **6**: 484-488.
- Fournier, B., R. Aras and D. C. Hooper (2000). Expression of the Multidrug Resistance Transporter NorA from *Staphylococcus aureus* Is Modified by a Two-Component Regulatory System. J Bacteriol **182**: 664-671.
- Fournier, B. and D. C. Hooper (2000). A New Two-Component Regulatory System Involved in Adhesion, Autolysis, and Extracellular Proteolytic Activity of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **182**: 3955-3964.
- Fournier, B., A. Klier and G. Rapoport (2001). The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol **41**: 247-261.
- Frank, E. G., D. G. Ennis, M. Gonzalez, A. S. Levine and R. Woodgate (1996). Regulation of SOS mutagenesis by proteolysis. Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 10291-10296.
- Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley, R. D. Fritchman, J. F. Weidman, K. V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, D. M. Saudek, C. A. Phillips, J. M. Merrick, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, K. F. Bott, P. C. Hu, T. S. Lucier, S. N. Peterson, H. O. Smith, C. A. Hutchison, 3rd and J. C. Venter (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. Science **270**: 397-403.
- Frees, D. and H. Ingmer (1999). ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. Mol Microbiol **31**: 79-87.
- Frees, D., P. Varmanen and H. Ingmer (2001). Inactivation of a gene that is highly conserved in Gram-positive bacteria stimulates degradation of non-native proteins and concomitantly increases stress tolerance in *Lactococcus lactis*. Mol Microbiol **41**: 93-103.
- Frees, D., S. N. A. Qazi, P. J. Hill and H. Ingmer (2003). Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. Mol Microbiol **48**: 1565-1578.
- Frees, D., A. Chastanet, S. Qazi, K. Sorensen, P. Hill, T. Msadek and H. Ingmer (2004). Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol.
- Frischmeyer, P. A., A. van Hoof, K. O'Donnell, A. L. Guerrerio, R. Parker and H. C. Dietz (2002). An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. Science: 2258-2261.
- Fujita, Y., Y. Miwa, A. Galinier and J. Deutscher (1995). Specific recognition of the *Bacillus subtilis* gnt cis-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. Mol Microbiol **17**: 953-960.
- Fukuchi, K., Y. Kasahara, K. Asai, K. Kobayashi, S. Moriya and N. Ogasawara (2000). The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. Microbiology **146**: 1573-1583.
- Fuller, T. E., M. J. Kennedy and D. E. Lowery (2000). Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. Microb Pathog: 25-38.
- Gaballa, A. and J. D. Helmann (1998). Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **180**: 5815-5821.

- Gaillot, O., E. Pellegrini, S. Bregenholt, S. Nair and P. Berche (2000).** The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol **35**: 1286-1294.
- Gaillot, O., S. Bregenholt, F. Jaubert, J. P. Di Santo and P. Berche (2001).** Stress-Induced ClpP Serine Protease of *Listeria monocytogenes* Is Essential for Induction of Listeriolysin O-Dependent Protective Immunity. Infect Immun **69**: 4938-4943.
- Galperin, M. Y. and E. V. Koonin (1999).** Searching for drug targets in microbial genomes. Curr Opin Biotechnol **10**: 571-8.
- Galperin, M. Y. (2004).** Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. Environ Microbiol **6**: 552-67.
- Gerth, U., E. Krüger, I. Derre, T. Msadek and M. Hecker (1998).** Stress induction of the *Bacillus subtilis* *clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. Mol Microbiol **28**: 787-802.
- Gertz, S., S. Engelmann, R. Schmid, K. Ohlsen, J. Hacker and M. Hecker (1999).** Regulation of sigmaB-dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two different *Staphylococcus aureus* strains. Mol Gen Genet **261**: 558-66.
- Gertz, S., S. Engelmann, R. Schmid, A.-K. Ziebandt, K. Tischler, C. Scharf, J. Hacker and M. Hecker (2000).** Characterization of the sigma B Regulon in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **182**: 6983-6991.
- Giachino, P., S. Engelmann and M. Bischoff (2001).** Sigma(B) activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **183**: 1843-52.
- Gillet, R. and B. Felden (2001).** Emerging views on tmRNA-mediated protein tagging and ribosome rescue. Mol Microbiol **42**: 879-85.
- Gladstone, G. P. (1937).** The nutrition of *Staphylococcus aureus*. nitrogen requirements. Br J Exp Pathol **19**: 208-226.
- Goerke, C., M. G. Bayer and C. Wolz (2001a).** Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR. Clin Diagn Lab Immunol **8**: 279-82.
- Goerke, C., U. Fluckiger, A. Steinhuber, W. Zimmerli and C. Wolz (2001b).** Impact of the regulatory loci *agr*, *sarA* and *sae* of *Staphylococcus aureus* on the induction of alpha-toxin during device-related infection resolved by direct quantitative transcript analysis. Mol Microbiol **40**: 1439-47.
- Gossringer, R., E. Kuster, A. Galinier, J. Deutscher and W. Hillen (1997).** Cooperative and non-cooperative DNA binding modes of catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* result from sensing two different signals. J Mol Biol **266**: 665-76.
- Gottesman, S. (1996).** Proteases and their targets in *Escherichia coli*. Annual Review of Genetics **30**: 465-506.
- Gottesman, S., S. Wickner and M. R. Maurizi (1997).** Protein quality control: triage by chaperones and proteases. Genes Dev **11**: 815-23.
- Gottesman, S., and M. R. Maurizi (1992).** Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. Microbiol Rev **56**: 592-621.
- Gottesman, S., E. Roche, Y. Zhou, and R. T. Sauer (1998).** The ClpXP and the ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. Genes Dev **12**: 1338-1347.
- Graham, J. E. and B. J. Wilkinson (1992).** *Staphylococcus aureus* osmoregulation: roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine. J Bacteriol **174**: 2711-6.
- Graumann, J., H. Lilie, X. Tang, K. A. Tucker, J. H. Hoffmann, J. Vijayalakshmi, M. Saper, J. C. Bardwell and U. Jakob (2001).** Activation of the redox-regulated molecular chaperone Hsp33--a two-step mechanism. Structure (Camb) **9**: 377-87.
- Gray, S. and M. Kehoe (1984).** Primary sequence of the a-toxin gene from *Staphylococcus aureus* Wood 46. Infect Immun **46**: 615-618.
- Green, J., B. Bennett, P. Jordan, E. T. Ralph, A. J. Thomson and J. R. Guest (1996).** Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*. Biochem J **316**: 887-892.

- Gu, Y., J. B. Hogenesch and C. A. Bradfield (2000).** The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. Annu Rev Pharm Tox **40**: 519–561.
- Hahn, J., J. Burghoorn and D. Dubnau (1998).** Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. EMBO J **17**: 6730-6738.
- Haima, P., D. van Sinderen, H. Schotting, S. Bron and G. Venema (1990).** Development of a β -galactosidase α -complementation system for molecular cloning in *Bacillus subtilis*. Gene **86**: 63-69.
- Handfield, M. and R. C. Levesque (1999).** Strategies for isolation of *in vivo* expressed genes from bacteria. FEMS Microbiol Rev **23**: 69-91.
- Harper, M., A. D. Cox, F. St Michael, I. W. Wilkie, J. D. Boyce and B. Adler (2004).** A heptosyltransferase mutant of *Pasteurella multocida* produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence. Infect Immun **72**: 3436-43.
- Hautefort, I., M. J. Proenca and J. C. Hinton (2003).** Single-copy green fluorescent protein gene fusions allow accurate measurement of *Salmonella* gene expression *in vitro* and during infection of mammalian cells. Appl Environ Microbiol **69**: 7480-91.
- Hayes, C. S., B. Bose and R. T. Sauer (2002a).** Stop codons preceded by rare arginine codons are efficient determinants of SsrA tagging in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 3440-5.
- Hayes, C. S., B. Bose and R. T. Sauer (2002b).** Proline residues at the C terminus of nascent chains induce SsrA tagging during translation termination. J Biol Chem **277**: 33825-32.
- Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack and F. Götz (1996).** Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol **20**: 1083-1091.
- Hengge, R. and B. Bukau (2003).** Proteolysis in prokaryotes: protein quality control and regulatory principles. Mol Microbiol **49**: 1451-1462.
- Hengge-Aronis, R. (2002).** Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the $\{\sigma\}$ S (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. Microbiol Mol Biol Rev **66**: 373-395.
- Henkin, T. M. (1996).** The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Lett **135**: 9-15.
- Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton and D. W. Holden (1995).** Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. Science **269**: 400-403.
- Herbig, A. F. and J. D. Helmann (2001).** Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. Mol Microbiol **41**: 849-59.
- Herman, C., D. Thevenet, P. Bouloc, G. C. Walker and R. D'Ari (1998).** Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). Genes Dev **12**: 1348-55.
- Hershberger, E., S. Donabedian, K. Konstantinou and M. J. Zervos (2004).** Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. Clin Infect Dis **38**: 92-8.
- Hill, P. J., A. Cockayne, P. Landers, J. A. Morrissey, C. M. Sims and P. Williams (1998).** SirR, a Novel Iron-Dependent Repressor in *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun **66**: 4123-4129.
- Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri and F. C. Tenover (1997).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother **40**: 135-6.
- Hoch, J. A. and K. I. Varughese (2001).** Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. J Bacteriol **183**: 4941-9.
- Hoffmann, J. H., K. Linke, P. C. F. Graf, H. Lilie and U. Jakob (2004).** Identification of a redox-regulated chaperone network. EMBO J **23**: 160–168.
- Homerova, D., M. Bischoff, A. Dumolin and J. Kormanec (2004).** Optimization of a two-plasmid system for the identification of promoters recognized by RNA polymerase

- containing *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor *sigmaB*. FEMS Microbiol Lett **232**: 173-9.
- Horsburgh, M. J., M. O. Clements, H. Crossley, E. Ingham and S. J. Foster (2001a)**. PerR Controls Oxidative Stress Resistance and Iron Storage Proteins and Is Required for Virulence in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun **69**: 3744-3754.
- Horsburgh, M. J., E. Ingham and S. J. Foster (2001b)**. In *Staphylococcus aureus*, Fur Is an Interactive Regulator with PerR, Contributes to Virulence, and Is Necessary for Oxidative Stress Resistance through Positive Regulation of Catalase and Iron Homeostasis. J Bacteriol **183**: 468-475.
- Horsburgh, M. J., J. L. Aish, I. J. White, L. Shaw, J. K. Lithgow and S. J. Foster (2002a)**. σ^B modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. J Bacteriol **184**: 5457-67.
- Horsburgh, M. J., S. J. Wharton, A. G. Cox, E. Ingham, S. Peacock and S. J. Foster (2002b)**. MntR modulates expression of the PerR regulon and superoxide resistance in *Staphylococcus aureus* through control of manganese uptake. Mol Microbiol **44**: 1269-1286.
- Howell, A., S. Dubrac, K. K. Andersen, D. Noone, J. Fert, T. Msadek and K. Devine (2003)**. Genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach. Mol Microbiol **49**: 1639-1655.
- Huang, C., M. C. Wolfgang, J. Withey, M. Koomey and D. I. Friedman (2000)**. Charged tmRNA but not tmRNA-mediated proteolysis is essential for *Neisseria gonorrhoeae* viability. Embo J **19**: 1098-107.
- Hueck, C. J., W. Hillen and M. H. J. Saier (1994)**. Analysis of a cis-active sequence mediating catabolite repression in gram-positive bacteria. Res Microbiol **145**: 503-18.
- Hussain, M., K. Becker, C. von Eiff, J. Schrenzel, G. Peters and M. Herrmann (2001)**. Identification and Characterization of a Novel 38.5-Kilodalton Cell Surface Protein of *Staphylococcus aureus* with Extended-Spectrum Binding Activity for Extracellular Matrix and Plasma Proteins. J Bacteriol **23**: 6778-6786.
- Hutchison, C. A., S. N. Peterson, S. R. Gill, R. T. Cline, O. White, C. M. Fraser, H. O. Smith and J. C. Venter (1999)**. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. Science **286**: 2165-9.
- Iandolo, J. J. (1989)**. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. Annu Rev Microbiol **43**: 375-402.
- Inoue, H., H. Iguchi, A. Kono and Y. Tsuruta (1999)**. Highly sensitive determination of N-terminal prolyl dipeptides, proline and hydroxyproline in urine by high-performance liquid chromatography using a new fluorescent labelling reagent, 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride. J Chromatogr B Biomed Sci Appl **724**: 221-30.
- Jakob, U., W. Muse, M. Eser and J. C. Bardwell (1999)**. Chaperone activity with a redox switch. Cell **96**: 341-352.
- Jakob, U., M. Eser and J. C. A. Bardwell (2000)**. Redox Switch of Hsp33 Has a Novel Zinc-binding Motif. J Biol Chem **275**: 38302-38310.
- Jarraud, S., M. A. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M. Bes, C. Mougel, J. Etienne, F. Vandenesch, M. Bonneville and G. Lina (2001)**. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol **166**: 669-77.
- Jenal, U. and T. Fuchs (1998)**. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. EMBO J **17**: 5658-5669.
- Jenal, U. and R. Hengge-Aronis (2003)**. Regulation by proteolysis in bacterial cells. Curr Opin Microbiol **6**: 163-72.
- Jentsch, S. (1996)**. When proteins receive deadly messages at birth. Science **271**: 955-6.
- Jevons, M.-P. (1961)**. Celbenin-resistant staphylococci. BMJ **1**: 124-125.
- Ji, G., R. Beavis and R. P. Novick (1997)**. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. Science **276**: 2027-30.

- Ji, Y., B. Zhang, S. F. Van Horn, P. Warren, G. Woodnutt, M. K. R. Burnham and M. Rosenberg (2001). Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science* **293**: 2266-2269.
- Ji, Y., D. Yin, B. Fox, D. J. Holmes, D. Payne and M. Rosenberg (2004). Validation of antibacterial mechanism of action using regulated antisense RNA expression in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* **231**: 177-184.
- Johnson, K., I. Charles, G. Dougan, D. Pickard, P. O'Gaora, G. Costa, T. Ali, I. Miller and C. Hormaeche (1991). The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Mol Microbiol* **5**: 401-7.
- Jones, B. D. and S. Falkow (1996). Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* **14**: 533-561.
- Jones, C. H., T. C. Bolken, K. F. Jones, G. O. Zeller and D. E. Hruby (2001). Conserved DegP protease in gram-positive bacteria is essential for thermal and oxidative tolerance and full virulence in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **69**: 5538-45.
- Josefsson, E., O. Hartford, L. O'Brien, J. M. Patti and T. Foster (2001). Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *J Infect Dis* **184**: 1572-80.
- Julio, S. M., D. M. Heithoff and M. J. Mahan (2000). *ssrA* (tmRNA) plays a role in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. *J Bacteriol* **182**: 1558-63.
- Karzai, A. W., M. M. Susskind and R. T. Sauer (1999). SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *Embo J* **18**: 3793-9.
- Karzai, A. W., E. D. Roche and R. T. Sauer (2000). The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Biol* **7**: 449-55.
- Katayama, Y., S. Gottesman, J. Pumphrey, S. Rudikoff, W. P. Clark and M. R. Maurizi (1988). The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Purification, cloning, and mutational analysis of the ATP-binding component. *J Biol Chem* **263**: 15226-36.
- Keiler, K. C. and R. T. Sauer (1996). Sequence determinants of C-terminal substrate recognition by the Tsp protease. *J Biol Chem* **271**: 2589-93.
- Keiler, K. C., P. R. Waller and R. T. Sauer (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* **271**: 990-3.
- Kiley, P. J. and H. Beinert (1998). Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 341-52.
- Kim, J. H. and G. H. Chambliss (1997). Contacts between *Bacillus subtilis* catabolite regulatory protein CcpA and *amyO* target site. *Nucleic Acids Res* **25**: 3490-6.
- Kim, J.-H., M. I. Voskuil and G. H. Chambliss (1998). NADP, corepressor for the *Bacillus* catabolite control protein CcpA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9590-9595.
- Kim, Y. R., S. E. Lee, C. M. Kim, S. Y. Kim, E. K. Shin, D. H. Shin, S. S. Chung, H. E. Choy, A. Progulsk-Fox, J. D. Hillman, M. Handfield and J. H. Rhee (2003). Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients. *Infect Immun* **71**: 5461-71.
- Klarsfeld, A. D., P. L. Goossens and P. Cossart (1994). Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Mol Microbiol* **13**: 585-97.
- Kleerebezem, M., L. E. N. Quadri, O. P. Kuipers and W. M. de Vos (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**: 895-904.
- Kleerebezem, M. and L. E. N. Quadri (2001). Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* **22**: 1579-96.
- Kloos, W. E. and D. W. Lambe (1991). *Staphylococcus*. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. A. Balows, W. J. Hausler jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg and H. J. Shadomy. Washington, D.C., USA, American Society for Microbiology: 222-237.

- Kock, H., U. Gerth and M. Hecker (2004).** MurAA, catalysing the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is a target of Clp-dependent proteolysis in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol **51**: 1087-1102.
- Komine, Y., M. Kitabatake, T. Yokogawa, K. Nishikawa and H. Inokuchi (1994).** A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 9223-7.
- Körner, H., H. J. Sofia and W. G. Zumft (2003).** Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. FEMS Microbiol Rev **27**: 559-92.
- Kreiswirth, B., N., S. Lofdahl, M. J. Betley, M. O'Reilly, P. M. Schlievert, M. S. Bergdoll, and R. P. Novick (1983).** The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. Nature (London) **305**: 709-712.
- Kresken, M. and D. Hafner (2001).** Ergebnisse der PEG-Resistenzstudie 2001.
- Krüger, E., D. Zühlke, E. Witt, H. Ludwig and M. Hecker (2001).** Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. EMBO J **20**: 852-863.
- Kullik, I., P. Giachino and T. Fuchs (1998a).** Deletion of the Alternative Sigma Factor sigma B in *Staphylococcus aureus* Reveals Its Function as a Global Regulator of Virulence Genes. J Bacteriol **180**: 4814-4820.
- Kullik, I., R. Jenni and B. Berger-Bächi (1998b).** Sequence of the putative alanine racemase operon in *Staphylococcus aureus*: insertional interruption of this operon reduces D-alanine substitution of lipoteichoic acid and autolysis. Gene **219**: 9-17.
- Kullik, I. I. and P. Giachino (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**: 151-9.
- Kwon, H.-Y., S.-W. Kim, M.-H. Choi, A. D. Ogunniyi, J. C. Paton, S.-H. Park, S.-N. Pyo and D.-K. Rhee (2003).** Effect of Heat Shock and Mutations in ClpL and ClpP on Virulence Gene Expression in *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun **71**: 3757-3765.
- Lammers, A., E. Kruijt, C. van de Kuijt, P. J. Nuijten and H. E. Smith (2000).** Identification of *Staphylococcus aureus* genes expressed during growth in milk: a useful model for selection of genes important in bovine mastitis? Microbiology **146 (Pt 4)**: 981-7.
- Lange, R., D. Fischer and R. Hengge-Aronis (1995).** Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of rpoS, the structural gene for the σ S subunit of RNA-polymerase in *Escherichia coli*. J Bacteriol **177**: 4676-4680.
- Lange, R., C. Wagner, A. de Saizieu, N. Flint, J. Molnos, M. Stieger, P. Caspers, M. Kamber, W. Keck and a. A. K. E. (1999).** Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. Gene **237**: 223-234.
- LaPlante, K. L. and M. J. Rybak (2004).** Daptomycin- a novel antibiotic against gram-positive pathogens. Expert. Opin. Pharmacother. **5**: 2321-2331.
- Lee, J. C., J. S. Park, S. E. Shepherd, V. Carey and A. Fattom (1997).** Protective efficacy of antibodies to the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide in a modified model of endocarditis in rats. Infect Immun **65**: 4146-51.
- Leichert, L. I. O., C. Scharf and M. Hecker (2003).** Global Characterization of Disulfide Stress in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **185**: 1967-1975.
- LeLoir, Y., F. Baron and M. Gautier (2003).** *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Gen. Mol. Res. **2**: 63-76.
- Levine, M. M., D. Herrington, J. R. Murphy, J. G. Morris, G. Losonsky, B. Tall, A. A. Lindberg, S. Svenson, S. Baqar, M. F. Edwards and B. A. D. Stocker (1987).** Safety, infectivity, immunogenicity, and in vivo stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541Ty and 543Ty, as live oral vaccines in humans. J Clin Investig **79**: 888-902.
- Lewis, P. J. and L. A. Babiuk (1999).** DNA vaccines: a review. Adv Virus Res **54**: 129-88.

- Lindsay, J. A. and S. J. Foster (1999).** Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. Mol Gen Genet **262**: 323-31.
- Lindsay, J. A. and S. J. Foster (2001).** zur: a Zn²⁺-responsive regulatory element of *Staphylococcus aureus*. Microbiology **147**: 1259-1266.
- Lipinska, B., M. Zylicz and C. Georgopoulos (1990).** The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. J Bacteriol **172**: 1791-7.
- Lowe, A. M., D. T. Beattie and R. L. Deresiewicz (1998).** Identification of novel staphylococcal virulence genes by *in vivo* expression technology. Mol Microbiol **27**: 967-976.
- Lundstrom, T. S. and J. D. Sobel (2004).** Antibiotics for gram-positive bacterial infections: vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and daptomycin. Infect. Dis. Clin. North Am. **18**: 651-668.
- Lyon, G. J., P. Mayville, T. W. Muir and R. P. Novick (2000).** Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, AgrC. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 13330-13335.
- Lyon, W. R. and M. G. Caparon (2004).** Role for serine protease HtrA (DegP) of *Streptococcus pyogenes* in the biogenesis of virulence factors SpeB and the hemolysin streptolysin S. Infect Immun **72**: 1618-25.
- Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge and R. Laufs (1996).** The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J Bacteriol **178**: 175-183.
- Maghnouj, A., A. A. Abu-Bakr, S. Baumberg, V. Stalon and C. Vander Wauven (2000).** Regulation of anaerobic arginine catabolism in *Bacillus licheniformis* by a protein of the Crp/Fnr family. FEMS Microbiol Lett **191**: 227-34.
- Mahan, M. J., J. M. Schlauch and J. J. Mekalanos (1993).** Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. Science **259**: 686-8.
- Mamo, W., M. Boden and J. I. Flock (1994).** Vaccination with *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins (FgBPs) reduces colonisation of *S. aureus* in a mouse mastitis model. FEMS Immunol Med Microbiol **10**: 47-53.
- Mani, N., P. Tobin, and R. K. Jayaswal (1993).** Isolation and characterization of autolysis-defective mutants of *Staphylococcus aureus* created by Tn917-lacZ mutagenesis. J Bacteriol **175**: 1493-1499.
- Manna, A. and A. L. Cheung (2001).** Characterization of *sarR*, a Modulator of *sar* Expression in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun **69**: 885-896.
- Manna, A. C., M. G. Bayer and A. L. Cheung (1998).** Transcriptional analysis of different promoters in the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **180**: 3828-36.
- Marino, M., H. Cruz Ramos, T. Hojmann, P. Glaser and D. Jahn (2001).** Modulation of anaerobic energy metabolism of *Bacillus subtilis* by *arfM* (*ywiD*). J Bacteriol **183**: 6815-6821.
- Martin, P. K., T. Li, D. Sun, D. P. Biek and M. B. Schmid (1999).** Role in Cell Permeability of an Essential Two-Component System in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **181**: 3666-3673.
- Maurizi, M. R. (1992).** Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. Experientia **48**: 178-201.
- Mayville, P., G. Ji, R. Beavis, H. Yang, M. Goger, R. P. Novick and T. W. Muir (1999).** Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 1218-1223.
- Mazmanian, S. K., G. Liu, E. R. Jensen, E. Lenoy and O. Schneewind (2000).** *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface Proteins and in the pathogenesis of animal infections. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 5510-5.
- McNamara, P. J. and J. J. Iandolo (1998).** Genetic Instability of the Global Regulator *agr* Explains the Phenotype of the *xpr* Mutation in *Staphylococcus aureus* KSI9051. J Bacteriol **180**: 2609-2615.

- Mei, J. M., F. Nourbakhsh, C. W. Ford and D. W. Holden (1997).** Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. Mol Microbiol **26**: 399-407.
- Miller, D., V. A. Urdaneta and A. Weltman (2002).** Public Health Dispatch: Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* --- Pennsylvania, 2002. MMWR **51**: 902.
- Miller, M. B. and B. L. Bassler (2001).** Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol **55**: 165-99.
- Miwa, Y., M. Saikawa and Y. Fujita (1994).** Possible function and some properties of the CcpA protein of *Bacillus subtilis*. Microbiology **140** (Pt 10): 2567-75.
- Miwa, Y., K. Nagura, S. Eguchi, H. Fukuda, J. Deutscher and Y. Fujita (1997).** Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *gnt* operon exerted by two catabolite-responsive elements. Mol Microbiol **23**: 1203-1213.
- Miwa, Y., A. Nakata, A. Ogiwara, M. Yamamoto and Y. Fujita (2000).** Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. Nucl Acids Res **28**: 1206-1210.
- Miyazaki, E., J. M. Chen, C. Ko and W. R. Bishai (1999).** The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (orf159) gene encodes an anti-sigma factor of SigB. J Bacteriol **181**: 2846-51.
- Miyoshi, A., I. Poquet, V. Azevedo, J. Commissaire, L. Bermudez-Humaran, E. Domakova, Y. Le Loir, S. C. Oliveira, A. Gruss and P. Langella (2002).** Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol **68**: 3141-6.
- Mogk, A. G. H., C. Scholz, L. Kim, F. X. Schmid, and W. Schumann. (1997).** The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. EMBO J **16**: 4579-4590.
- Moore, C. M., M. M. Nakano, T. Wang, R. W. Ye and J. D. Helmann (2004).** Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. J Bacteriol **186**: 4655-64.
- Mostertz, J., C. Scharf, M. Hecker and G. Homuth (2004).** Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. Microbiology **150**: 497-512.
- Motojima, K., I. Yamato and Y. Anraku (1978).** Proline transport carrier-defective mutants of *Escherichia coli* K-12: properties and mapping. J Bacteriol **136**: 5-9.
- Msadek, T., V. Dartois, F. Kunst, M.-L. Herbaud, F. Denizot and G. Rapoport (1998).** ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. Mol Microbiol **27**: 899-914.
- Musser, J. M., P. M. Schlievert, A. W. Chow, P. Ewan, B. N. Kreiswirth, V. T. Rosdahl, A. S. Naidu, W. Witte and R. K. Selander (1990).** A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 225-9.
- Muto, A., C. Ushida and H. Himeno (1998).** A bacterial RNA that functions as both a tRNA and an mRNA. Trends Biochem Sci **23**: 25-9.
- Muto, A., A. Fujihara, K. I. Ito, J. Matsuno, C. Ushida and H. Himeno (2000).** Requirement of transfer-messenger RNA for the growth of *Bacillus subtilis* under stresses. Genes Cells **5**: 627-35.
- Myers, R. S., D. Townsend and S. Maloy (1991).** Dissecting the molecular mechanism of ion-solute cotransport: substrate specificity mutations in the *putP* gene affect the kinetics of proline transport. J Membr Biol **121**: 201-14.
- Nakano, M., P. Zuber, P. Glaser, A. Danchin and F. Hulett (1996).** Two-component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of *fnr* upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **178**: 3796-3802.
- Nakano, M. M., Y. P. Dailly, P. Zuber and D. P. Clark (1997).** Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. J Bacteriol **179**: 6749-6755.
- Nakano, M. M., Y. Zhu, J. Liu, D. Y. Reyes, H. Yoshikawa and P. Zuber (2000).** Mutations conferring amino acid residue substitutions in the carboxy-terminal domain of RNA polymerase alpha can suppress *clpX* and *clpP* with respect to developmentally regulated transcription in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol **37**: 869-84.

- Nakano, M. M., F. Hajarizadeh, Y. Zhu and P. Zuber (2001).** Loss-of-function mutations in *yjbD* result in ClpX- and ClpP-independent competence development of *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol **42**: 383-394.
- Nakano, M. M. and Y. Zhu (2001).** Involvement of ResE phosphatase activity in down-regulation of ResD-controlled genes in *Bacillus subtilis* during aerobic growth. J Bacteriol **183**: 1938–1944.
- Nakano, M. M., S. Nakano and P. Zuber (2002a).** Spx (YjbD), a negative effector of competence in *Bacillus subtilis*, enhances ClpC-MecA-ComK interaction. Mol Microbiol **44**: 1341-1349.
- Nakano, S., G. Zheng, M. M. Nakano and P. Zuber (2002b).** Multiple Pathways of Spx (YjbD) Proteolysis in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **184**: 3664-3670.
- Nakano, S., E. Kuster-Schock, A. D. Grossman and P. Zuber (2003a).** Spx-dependent global transcriptional control is induced by thiol-specific oxidative stress in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 13603-13608.
- Nakano, S., M. M. Nakano, Y. Zhang, M. Leelakriangsak and P. Zuber (2003b).** A regulatory protein that interferes with activator-stimulated transcription in bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 4233-4238.
- Neher, S. B., J. M. Flynn, R. T. Sauer and T. A. Baker (2003).** Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. Genes Dev **17**: 1084-1089.
- Newbould, F. H. (1974).** Antibiotic treatment of experimental *Staphylococcus aureus* infections of the bovine mammary gland. Can J Comp Med **38**: 411-416.
- Ng, W. L., G. T. Robertson, K. M. Kazmierczak, J. Zhao, R. Gilmour and M. E. Winkler (2003).** Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6. **50**: 1647–1663.
- Nicholas, R. O., T. Li, D. McDevitt, A. Marra, P. Socoloski, P. L. Demarsh and D. R. Gentry (1999).** Isolation and characterization of a *sigB* deletion mutant of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun **67**: 3667-3669.
- Novak, R., B. Henriques, E. Charpentier, S. Normark and E. Tuomanen (1999).** Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. Nature **399**: 590-3.
- Novick, R. (2000). Pathogenicity factors and their regulation. Gram-positive Pathogens. V. A. Fischetti. Washington, D.C., American Society for Microbiology: 392-407.
- Novick, R. (2003a).** Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol **48**: 1429-1449.
- Novick, R. P. (1991).** Genetic systems in staphylococci. Methods Enzymol **204**: 587–636.
- Novick, R. P. (2003b).** Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol **48**: 1429-49.
- Oh, B. K. and D. Apirion (1991).** 10Sa RNA, a small stable RNA of *Escherichia coli*, is functional. Mol Gen Genet **229**: 52-6.
- Ohlsen, K. (2001).** Persönliche Mitteilung.
- O'Toole, G. A. and R. Kolter (1998).** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol **28**: 449-461.
- Otto, M. (2001).** *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator *agr* system. Peptides **22**: 1603-8.
- Pallen, M. J. and B. W. Wren (1997).** The HtrA family of serine proteases. Mol Microbiol **26**: 209-21.
- Palma, M. and A. L. Cheung (2001).** sigma(B) activity in *Staphylococcus aureus* is controlled by RsbU and an additional factor(s) during bacterial growth. Infect Immun **69**: 7858-65.
- Pan Q, G. D., Losick R (2001).** Self-reinforcing activation of a cell-specific transcription factor by proteolysis of an anti-sigma factor in *B. subtilis*. Mol Cell **8**: 873-883.
- Patti, J. M., B. L. Allen, M. J. McGavin and M. Hook (1994).** MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol: 585-617.
- Patzer, S. I. and K. Hantke (2001).** Dual repression by Fe²⁺-Fur and Mn²⁺-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn²⁺ transporter in *Escherichia coli*. J Bacteriol **183**: 4806-13.

- Pedersen, K., S. K. Christensen and K. Gerdes (2002).** Rapid induction and reversal of bacteriostatic conditions by controlled expression of toxins and antitoxins. Mol Microbiol **45**: 501–510.
- Pederson, K. J., S. Carlson and D. E. Pierson (1997).** The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulates *ail* gene expression in *Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol **26**: 99–107.
- Pellequer, J.-L., K. A. Wagner-Smith, S. A. Kay and E. D. Getzoff (1995).** Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 5884–5890.
- Perego, M. (1997).** A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 8612–7.
- Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res **29**: e45.
- Polissi, A., A. Pontiggia, G. Feger, M. Altieri, H. Mottl, L. Ferrari and D. Simon (1998).** Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun **66**: 5620–9.
- Poquet, I., V. Saint, E. Seznec, N. Simoes, A. Bolotin and A. Gruss (2000).** HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. Mol Microbiol **35**: 1042–51.
- Pourkomialian, B. and I. R. Booth (1994).** Glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*: evidence for feedback regulation of the activity of the two transport systems. Microbiology **140**: 3131–3138.
- Pragman, A. A., J. M. Yarwood, T. J. Tripp and P. M. Schlievert (2004).** Characterization of Virulence Factor Regulation by SrrAB, a Two-Component System in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **186**: 2430–2438.
- Projan, S. (2000). Antibiotic resistance in the Staphylococci. Gram-positive Pathogens. V. A. Fischetti. Washington, D.C., American Society for Microbiology: 463–470.
- Rachid, S., K. Ohlsen, U. Wallner, and J. Hacker (2000).** Alternative transcription factor σ^B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. J Bacteriol **182**: 6824–6826.
- Ratzkin, B., M. Grabnar and J. Roth (1978).** Regulation of the major proline permease gene of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol **133**: 737–43.
- Reeve, C. A., A. T. Bockman, and A. Matin (1984).** Role of protein degradation in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol **157**: 758–763.
- Rennermalm, A., Y. H. Li, L. Bohaufs, C. Jarstrand, A. Brauner, F. R. Brennan and J. I. Flock (2001).** Antibodies against a truncated *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein protect against dissemination of infection in the rat. Vaccine **19**: 3376–83.
- Reynolds, P. E. (1989).** Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **8**: 943–50.
- Robertson, G. T., W.-L. Ng, J. Foley, R. Gilmour and M. E. Winkler (2002).** Global Transcriptional Analysis of *clpP* Mutations of Type 2 *Streptococcus pneumoniae* and Their Effects on Physiology and Virulence. J Bacteriol **184**: 3508–3520.
- Robinson, D. A. and M. C. Enright (2004).** Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect **10**: 92–97.
- Roche, E. D. and R. T. Sauer (1999).** SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. Embo J **18**: 4579–89.
- Rohrer, S., K. Ehlert, M. Tschierske, H. Labischinski and B. Berger-Bächi (1999).** The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 9351–9360.
- Rudinger-Thirion, J., R. Giege and B. Felden (1999).** Aminoacylated tmRNA from *Escherichia coli* interacts with prokaryotic elongation factor Tu. Rna **5**: 989–92.
- Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, K. Bartscht and D. Mack (1999).** Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus*

- epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. Infect Immun **67**: 2627-2632.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989)**. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977)**. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A **74**: 5463-7.
- Savijoki, K., H. Ingmer, D. Frees, F. K. Vogensen, A. Palva and P. Varmanen (2003)**. Heat and DNA damage induction of the LexA-like regulator HdiR from *Lactococcus lactis* is mediated by RecA and ClpP. Mol Microbiol **50**: 609-621.
- Schauß, A. (2002)**. Molekularbiologische Charakterisierung putativer Targets in *Staphylococcus aureus*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Schennings, T., A. Heimdahl, K. Coster and J. I. Flock (1993)**. Immunization with fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. Microb Pathog **15**: 227-36.
- Schleifer, K. H. and U. Fischer (1982)**. Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. Int J Syst Bacteriol **32**: 153-156.
- Schneider, W. P., S. K. Ho, J. Christine, M. Yao, A. Marra and A. E. Hromockyj (2002)**. Virulence Gene Identification by Differential Fluorescence Induction Analysis of *Staphylococcus aureus* Gene Expression during Infection-Simulating Culture. Infect Immun **70**: 1326-1333.
- Schumann, W., M. Hecker and T. Msadek (2002). Regulation and function of heat-inducible genes in *Bacillus subtilis*. In: *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from Genes to Cells. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. M. Losick. Washington, DC, American Society for Microbiology Press: 359-368.
- Schwan, W. R., S. N. Coulter, E. Y. W. Ng, M. H. Langhorne, H. D. Ritchie, L. L. Brody, S. Westbrook-Wadman, A. S. Bayer, K. R. Folger and C. K. Stover (1998)**. Identification and Characterization of the PutP Proline Permease That Contributes to *In Vivo* Survival of *Staphylococcus aureus* in Animal Models. Infect Immun **66**: 567-572.
- Schwan, W. R., K. J. Wetzel, T. S. Gomez, M. A. Stiles, B. D. Beitlich and S. Grunwald (2004)**. Low-proline environments impair growth, proline transport and *in vivo* survival of *Staphylococcus aureus* strain-specific *putP* mutants. Microbiology **150**: 1055-1061.
- Shea, J. E., J. D. Santangelo and R. G. and Feldman (2000)**. Signature-tagged mutagenesis in the identification of virulence genes in pathogens. Curr Opin Microbiol **3**: 451-458.
- Shelburne, S. A. and J. M. Musser (2004)**. Virulence gene expression *in vivo*. Curr Opin Microbiol **7**: 283-9.
- Siddiqui, S. M., R. T. Sauer and T. A. Baker (2004)**. Role of the processing pore of the ClpX AAA+ ATPase in the recognition and engagement of specific protein substrates. Genes Dev **18**: 369-374.
- Sievert, D. M. and M. L. Boulton (2002)**. *Staphylococcus aureus* resistant to Vancomycin-United States, 2002. Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report **51**.
- Sizemore, C., B. Wieland, F. Götz and W. Hillen (1992)**. Regulation of *Staphylococcus xylosus* xylose utilization genes at molecular level. J Bacteriol **174**: 3042-3048.
- Stephenson, K. and J. A. Hoch (2001)**. PAS-A domain of phosphorelay sensor kinase A: a catalytic ATP-binding domain involved in the initiation of development in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 15251-15256.
- Stephenson, K. and J. A. Hoch (2002)**. Virulence- and antibiotic resistance-associated two-component signal transduction systems of Gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. Pharmacol Ther **93**: 293-305.
- Stephenson, K. and J. A. Hoch (2004)**. Developing inhibitors to selectively target two-component and phosphorelay signal transduction systems of pathogenic microorganisms. Curr Med Chem **11**: 765-73.
- Streker, K., C. Freiberg, H. Labischinski, J. Hacker and K. Ohlsen (2005)**. *Staphylococcus aureus* NfrA (SA0367) Is a Flavin Mononucleotide-Dependent NADPH Oxidase Involved in Oxidative Stress Response. J Bacteriol **187**: 2249-56.

- Sun, G., E. Sharkova, R. Chesnut, S. Birkey, M. Duggan, A. Sorokin, P. Pujic, S. Ehrlich and F. Hulett (1996). Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **178**: 1374-1385.
- Sunohara, T., T. Abo, T. Inada and H. Aiba (2002). The C-terminal amino acid sequence of nascent peptide is a major determinant of SsrA tagging at all three stop codons. Rna **8**: 1416-27.
- Taylor, B. L. and I. B. Zhulin (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. Micro Mol Biol Rev **63**: 479-506.
- Tenover, F. C., M. V. Lancaster, B. C. Hill, C. D. Steward, S. A. Stocker, G. A. Hancock, C. M. O'Hara, S. K. McAllister, N. C. Clark and K. Hiramatsu (1998). Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol **36**: 1020-7.
- Tenover, F. C., L. M. Weigel, P. C. Appelbaum, L. K. McDougal, J. Chaitram, S. McAllister, N. Clark, G. Killgore, C. M. O'Hara, L. Jevitt, J. B. Patel and B. Bozdogan (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother **48**: 275-80.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res **22**: 4673-4680.
- Throup, J. P., K. K. Koretke, A. P. Bryant, K. A. Ingraham, A. F. Chalker, Y. Ge, A. Marra, N. G. Wallis, J. R. Brown, D. J. Holmes, M. Rosenberg and M. K. R. Burnham (2000). A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol **35**: 566-576.
- Throup, J. P., F. Zappacosta, R. D. Lunsford, R. S. Annan, S. A. Carr, J. T. Lonsdale, A. P. Bryant, D. McDevitt, M. Rosenberg and M. K. R. Burnham (2001). The *srhSR* Gene Pair from *Staphylococcus aureus*: Genomic and Proteomic Approaches to the Identification and Characterization of Gene Function. Biochemistry **40**: 10392-10401.
- Tomoyasu, T., A. Takaya, E. Isogai and T. Yamamoto (2003). Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. Mol Microbiol **48**: 443-452.
- Tortosa, P. and D. Dubnau (1999). Competence for transformation: a matter of taste. Curr Opin Microbiol **2**: 588-92.
- Tortosa, P., L. Logsdon, B. Kraigher, Y. Itoh, I. Mandic-Mulec and D. Dubnau (2001). Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. J Bacteriol **183**: 451-60.
- Townsend, D. E. and B. J. Wilkinson (1992). Proline transport in *Staphylococcus aureus*: a high-affinity system and a low affinity system involved in osmoregulation. J Bacteriol **174**: 2702-2710.
- Uden, G. and J. Schirawski (1997). The O₂ responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions. Mol Microbiol **25**: 205-210.
- Utada, S., P. M. Dunman, D. Macapagal, E. Murphy, S. J. Projan, V. K. Singh, R. K. Jayaswal and B. J. Wilkinson (2003). Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. Microbiology **149**: 2719-32.
- Uziel, O., I. Borovok, R. Schreiber, G. Cohen and Y. Aharonowitz (2004). Transcriptional Regulation of the *Staphylococcus aureus* Thioredoxin and Thioredoxin Reductase Genes in Response to Oxygen and Disulfide Stress. J Bacteriol **186**: 326-334.
- Valdivia, R. H. and S. Falkow (1996). Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. Mol Microbiol **22**: 367-78.
- Valdivia, R. H. and S. Falkow (1997). Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. Science **277**: 2007-11.
- Vaudaux, P. E., F. A. Waldvogel, J. J. Morgenthaler and U. E. Nydegger (1984). Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of *Staphylococcus aureus* adherence. Infect Immun **45**: 768-774.

- Viala, J. and P. Mazodier (2002). ClpP-dependent degradation of PopR allows tightly regulated expression of the *clpP3 clpP4* operon in *Streptomyces lividans*. Mol Microbiol **44**: 633-643.
- Vioque, A. and J. de la Cruz (2003). Trans-translation and protein synthesis inhibitors. FEMS Microbiol Lett **218**: 9-14.
- Voelker, U., A. Voelker, B. Maul, M. Hecker, A. Dufour and W. G. Haldenwang (1995). Separate mechanisms activate sigma B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. J Bacteriol **177**: 3771-80.
- Völker, U., B. Maul and M. Hecker (1999). Expression of the σ^B -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **181**: 3942-3948.
- von Blohn, C., B. Kempf, R. M. Kappes and E. Bremer (1997). Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. Mol Microbiol **25**: 175-87.
- Wang, J., A. Mushegian, S. Lory and S. Jin (1996). Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by *in vivo* selection. Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 10434-9.
- Webb, C., M. Moreno, M. Wilmes-Riesenberg, R. Curtiss and J. W. Foster (1999). Effects of DksA and ClpP protease on sigma S production and virulence in *Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol **34**: 112-123.
- Weickert, M. J. and S. Adhya (1992). A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. J Biol Chem **267**: 15869-15874.
- Weigel, L. M., D. B. Clewell, S. R. Gill, N. C. Clark, L. K. McDougal, S. E. Flannagan, J. F. Kolonay, J. Shetty, G. E. Killgore and F. C. Tenover (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science **302**: 1569-71.
- Wengender, P. and K. Miller (1995). Identification of a PutP proline permease gene homolog from *Staphylococcus aureus* by expression cloning of the high-affinity proline transport system in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol **61**: 252-259.
- Wesson, C. A., L. E. Liou, K. M. Todd, G. A. Bohach, W. R. Trumble and K. W. Bayles (1998). *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. Infect Immun **66**: 5238-43.
- Wieland, K. P., B. Wieland and F. Götz (1995). A promoter-screening plasmid and xylose-inducible, glucose-repressible expression vectors from *Staphylococcus carnosus*. Gene **158**: 91-96.
- Williams, K. P. (2002). The tmRNA Website: invasion by an intron. Nucleic Acids Res **30**: 179-82.
- Williams, K. P. (2003). Traffic at the tmRNA Gene. J Bacteriol **185**: 1059-1070.
- Winterling, K. W., D. Chafin, J. J. Hayes, J. Sun, A. S. Levine, R. E. Yasbin and R. Woodgate (1998). The *Bacillus subtilis* DinR Binding Site: Redefinition of the Consensus Sequence. J Bacteriol **180**: 2201-2211.
- Withey, J. H. and D. I. Friedman (2002). The biological roles of transtranslation. Curr Opin Microbiol **5**: 154-159.
- Wolz, C., C. Goerke, R. Landmann, W. Zimmerli and U. Fluckiger (2002). Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus in vitro* and during device-related infection. Infect Immun **70**: 2758-62.
- Wood, J. M. (1988). Proline Porters Effect the Utilization of Proline as Nutrient or Osmoprotectant for Bacteria. J Membrane Biol **106**: 183-202.
- Wood, W. B. and B. D. Davis (1980). Host-parasite relations in bacterial infections. Microbiology. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen and H. S. Ginsberg. Cambridge, Mass: Harper and Row: 551-571.
- Wu, S., H. de Lencastre and A. Tomasz (1996). Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. J Bacteriol **178**: 6036-42.
- Xiong, A., V. K. Singh, G. Cabrera and R. K. Jayaswal (2000). Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, *fur*, from *Staphylococcus aureus*. Microbiology **146 (Pt 3)**: 659-68.

- Yamamoto, T., H. Sashinami, A. Takaya, T. Tomoyasu, H. Matsui, Y. Kikuchi, T. Hanawa, S. Kamiya and A. Nakane (2001).** Disruption of the Genes for ClpXP Protease in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Results in Persistent Infection in Mice, and Development of Persistence Requires Endogenous Gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor Alpha. Infect Immun **69**: 3164-3174.
- Yang, X., C. M. Kang, M. S. Brody and C. W. Price (1996).** Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. Genes Dev **10**: 2265–2275.
- Yarwood, J. M., J. K. McCormick, M. L. Paustian, V. Kapur and P. M. Schlievert (2002).** Repression of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator in Serum and *In Vivo*. J Bacteriol **184**: 1095-1101.
- Ye, R. W., W. Tao, L. Bedzyk, T. Young, M. Chen and L. Li (2000).** Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. J Bacteriol **182**: 4458-65.
- Yin, D. and Y. Ji (2002).** Genomic analysis using conditional phenotypes generated by antisense RNA. Curr Opin Microbiol **5**: 330-333.
- Zalkin, H. and P. Nysgaard (1996).** Biosynthesis of purine nucleotides. Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology. F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham et al. Washington, D.C, American Society for Microbiology: 561–579.
- Zhang, L., F. Fan, L. M. Palmer, M. A. Lonetto, C. Petit, L. L. Voelker, A. St John, B. Bankosky, M. Rosenberg and D. McDevitt (2000).** Regulated gene expression in *Staphylococcus aureus* for identifying conditional lethal phenotypes and antibiotic mode of action. Gene **19**: 297-305.
- Zhou, Y., and S. Gottesmann (1998).** Regulation of proteolysis of the stationary-phase sigma factor RpoS. J Bacteriol **180**: 1154-1158.
- Zuber, P. (2004).** Spx-RNA Polymerase interaction and Global Transcriptional Control during Oxidative Stress. J Bacteriol **186**: 1911-1918.
- Zuniga, M., C. Miralles Md Mdel and G. Perez-Martinez (2002).** The Product of *arcR*, the sixth gene of the *arc* operon of *Lactobacillus sakei*, is essential for expression of the arginine deiminase pathway. Appl Environ Microbiol **68**: 6051-8.

7. ANHANG

7.1. Microarray-Daten $\Delta clpP$ Tabelle 21 Ergebnisse der Transkriptomanalyse des Stammes 8325 $\Delta clpP$

N315-ORF	Gen	Beschreibung ¹	Wt/ $\Delta clpP$ ²	DNA-Motiv ³
in $\Delta clpP$ vermindert transkribiert:				
SA0010	<i>azlC</i>	HP, similar to amino acid permease	3.1	SigB
SAS001	-	CHP (putative membrane protein)	2.1	
SA0011	-	HP, similar to homoserine-o-acetyltransferase	3.2	
SA0022	-	HP, similar to 5'-nucleotidase (LPXTG)	3.2	
SA0088	-	HP	2.8	
SA0089	-	HP, similar to DNA helicase	3.3	
SA0106	<i>lctP</i>	lctP	9.2	
SA0128	<i>sodM</i>	superoxide dismutase	3.7	
SA0129	<i>sasD</i>	LPXTG-containing HP	4.5	YycF ^{Dp}
SA0143	<i>adhE</i>	alcohol-acetaldehyde dehydrogenase	6.0	Fnr
SA0144	<i>capA</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5A	5.6	
SA0145	<i>capB</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5B	4.6	
SA0146	<i>capC</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C	4.1	
SA0147	<i>capD</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5D	4.4	
SA0148	<i>capE</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E	3.3	
SA0149	<i>capF</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5F	3.2	
SA0150	<i>capG</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5G	2.6	
SA0151	<i>capH</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5H	2.6	
SA0152	<i>capI</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5I	2.5	
SA0153	<i>capJ</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5J	2.1	
SA0154	<i>capK</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5K	2.6	
SA0155	<i>capL</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5L	2.5	
SA0156	<i>capM</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5M	2.7	
SA0157	<i>capN</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5N	2.1	
SA0158	<i>capO</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O	3.0	
SA0159	<i>capP</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5P	2.1	
SA0184	-	CHP	2.9	SarA ^D , cre
SA0185	-	CHP (Predicted sugar phosphate isomerase)	2.7	
SA0186	-	HP, similar to sucrose phosphotransferase enzyme II	2.3	
SA0187	-	HP, similar to transcription regulator	2.2	
SA0218	<i>pflB</i>	Formate acetyltransferase	15.7	cre, Fnr
SA0219	<i>pflA</i>	Formate acetyltransferase activating enzyme	7.8	
SA0231	-	HP, similar to flavohemoprotein	2.1	
SA0232	<i>lctE</i>	L-lactate dehydrogenase	12.1	cre, Fnr
SA0241	-	HP, similar to 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase	2.2	
SA0242	-	HP, similar to xylitol dehydrogenase	2.1	
SA0250	<i>lytS</i>	two-component sensor histidine kinase	2.1	cre
SA0251	<i>lytR</i>	two-component response regulator	2.1	
SA0252	<i>lrgA</i>	holin-like protein LrgA	11.2	
SA0253	<i>lrgB</i>	holin-like protein LrgB	12.7	

Anhang

N315-ORF	Gen	Beschreibung¹	Wt/ $\Delta clpP^2$	DNA-Motiv³
SA0255	-	HP, similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme II, ABC component	3.2	
SA0256	<i>bgIA</i>	6-phospho-beta-glucosidase	2.1	
SA0286	-	CHP	2.0	SigB
SA0287	-	CHP	2.0	
SA0288	-	CHP	2.1	
SA0289	-	CHP	2.3	
SA0290	-	CHP	2.0	
SA0291	-	HP	2.7	
SA0292	-	HP	2.2	
SA0293	<i>nirC</i>	HP, similar to formate transporter NirC	4.4	Fnr
SA0295	-	HP, similar to outer membrane protein precursor	5.7	Fnr
SA0304	<i>nanA</i>	N-acetylneuraminate lyase subunit	2.9	cre
SA0309	<i>geh</i>	glycerol ester hydrolase	3.9	
SA0312	-	HP, similar to alkanal monooxygenase alpha chain	0.4	Fur
SA0322	-	HP, similar to transcription regulator (MarA family)	3.5	cre
SA0323	<i>svrA</i>	CHP (predicted membrane protein)	2.8	
SA0324	-	HP	n.d.*	
SA0330	-	HP, similar to ribosomal-protein-serine N-acetyltransferase	3.4	SigB
SA0359	-	CHP (uncharacterized membrane protein)	5.0	SigB ^{HB}
SA0360	-	CHP	2.3	SigB ^B
SA0373	<i>xprT</i>	xanthine phosphoribosyltransferase	3.8	
SA0374	<i>pbuX</i>	xanthine permease	4.1	
SA0375	<i>guaB</i>	inositol-monophosphate dehydrogenase	3.0	
SA0376	<i>guaA</i>	GMP synthase	3.2	
SA0395	-	HP	3.1	
SA0422	-	HP, similar to lactococcal lipoprotein	2.0	NreBC
SA0452	<i>veg</i>	VEG protein homologue	2.3	
SA0453	<i>ychB/ yabH</i>	HP, similar to 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	2.6	
SA0454	<i>purR</i>	pur operon repressor homologue	2.1	
SA0455	-	translation initiation inhibitor homologue	n.d.*	SigB ^{HB}
SA0456	<i>spoVG</i>	stage V sporulation protein G homologue	2.3	
SA0531	<i>proP</i>	proline/betaine transporter homologue	2.4	SigB
SA0553	-	CHP	2.2	
SA0554	-	CHP	2.4	
SA0555	-	CHP	2.1	
SA0562	<i>adh1</i>	alcohol dehydrogenase I	3.5	Fnr
SA0566	-	HP, similar to iron-binding protein	2.5	
SA0587	<i>mntC</i>	lipoprotein, Streptococcal adhesin PsaA homologue	2.5	
SA0588	<i>mntB</i>	CHP	3.9	
SA0589	<i>mntA</i>	HP, similar to ABC transporter ATP-binding protein	4.4	MntR
SA0616	<i>vraF</i>	ABC transporter ATP-binding protein	2.4	YycF
SA0617	<i>vraG</i>	ABC transporter permease	2.1	
SA0641	<i>rat/ mgrA</i>	CHP, similar to transcriptional regulator	3.8	Fnr
SA0645	-	CHP	2.9	
SA0646	-	HP, similar to deoxyribodipyrimidine photolyase	2.2	
SA0663	-	HP	2.1	

Anhang

N315-ORF	Gen	Beschreibung¹	Wt/ $\Delta clpP^2$	DNA-Motiv³
SA0681	-	HP, similar to multidrug resistance protein(Csb29)	2.4	SigB ^{GB}
SA0682	-	HP, similar to di-tripeptide ABC transporter	3.1	YycF ^{Dp}
SA0685	<i>nrdI</i>	NrdI protein involved in ribonucleotide reductase function	2.9	
SA0686	<i>nrdE</i>	ribonucleoside diphosphate reductase major subunit	1.9	
SA0687	<i>nrdF</i>	ribonucleoside-diphosphate reductase minor subunit	n.r.	
SA0721	-	CHP	2.2	SigB ^B
SA0723	<i>clpP</i>	<i>clpP</i>	n.d.	CtsR
SA0739	-	CHP	2.2	
SA0746	<i>nuc</i>	staphylococcal nuclease	5.0	
SA0752	-	HP	4.1	SigB ^{HB}
SA0754	-	HP, similar to lactococcal prophage ps3 protein 05	2.1	cre
SA0755	-	HP, similar to general stress protein 170	2.8	SigB ^B
SA0769	-	ABC transporter ATP-binding protein homologue	8.5	
SA0770	-	CHP (ABC-type metal ion transport system, permease component)	6.0	
SA0771	-	CHP	4.4	
SA0772	-	CHP, likely paralogue of Csb8	3.4	SigB ^{GHB}
SA0816	-	HP, similar to polyribonucleotide nucleotidyltransferase	2.6	
SA0820	<i>glpQ</i>	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	4.4	cre
SA0841	-	HP, similar to cell surface protein Map-w	2.3	
SA0842	<i>fabH</i>	FabH	5.0	
SA0845	<i>oppB</i>	oligopeptide transport system permease protein	8.8	
SA0846	<i>oppC</i>	HP, similar to oligopeptide transport system permease protein OppC	10.7	
SA0847	<i>oppD</i>	oligopeptide transport system ATP-binding protein OppD homologue	9.8	
SA0848	<i>oppF</i>	oligopeptide transport system ATP-binding protein OppF homologue	10.9	cre
SA0849	<i>oppA</i>	HP, similar to peptide binding protein OppA	6.0	
SA0856	<i>spX</i>	CHP (Arsenate reductase and related proteins, glutaredoxin family)	4.9	
SA0870	-	CHP (predicted permease)	2.3	
SA0901	<i>sspA</i>	serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase	4.1	
SA0910	<i>qoxD</i>	HP, similar to quinol oxidase polypeptide IV QoxD	2.3	
SA0911	<i>qoxC</i>	Quinol oxidase polypeptide III QoxC	2.2	
SA0912	<i>qoxB</i>	Quinol oxidase polypeptide I QoxB	2.6	
SA0913	<i>qoxA</i>	HP, similar to quinol oxidase polypeptide II QoxA	2.4	YycF ^{Dp}
SA0914	<i>chiB</i>	HP, similar to chitinase B	2.8	PerR
SA0929	-	CHP	2.1	
SA0963	<i>pycA</i>	pyruvate carboxylase	3.7	
SA0994	<i>sdhC</i>	succinate dehydrogenase cytochrome b-558	2.9	
SA0995	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	2.3	cre
SA0996	<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein subunit	1.9	
SA1007	<i>hla</i>	Alpha-Hemolysin precursor	3.8	SarA ^D , cre
SA1052	<i>gmk</i>	guanylate kinase homolog	2.4	
SA1053	-	CHP	2.2	
SA1056	-	HP	2.2	
SA1168	-	HP	2.1	
SA1226	<i>asd</i>	aspartate semialdehyde dehydrogenase	5.1	

Anhang

N315-ORF	Gen	Beschreibung ¹	Wt/ $\Delta clpP^2$	DNA-Motiv ³
SA1227	<i>dapA</i>	dihydrodipicolinate synthase	2.5	
SA1228	<i>dapB</i>	dihydrodipicolinate reductase	6.1	
SA1229	<i>dapD</i>	tetrahydrodipicolinate acetyltransferase	4.2	
SA1230	-	hippurate hydrolase	2.1	
SA1231	-	HP, similar to alanine racemase	4.0	
SA1246	<i>arlS</i>	putative protein histidine kinase ArlS	2.1	
SA1248	<i>arlR</i>	putative response regulator ArlR	3.6	
SA1272	<i>ald</i>	alanine dehydrogenase	3.8	Fnr
SA1432	-	CHP/Nramp homolog	6.5	
SA1433	-	CHP	5.8	
SA1434	-	acetyl-CoA carboxylase, accC homolog	5.9	
SA1435	-	HP, similar to acetyl-CoA carboxylase, accB homolog	5.8	
SA1436	-	CHP	5.4	
SA1437	-	CHP	3.2	MntR
SA1509	-	CHP (Predicted transcriptional regulator, consists of a Zn-ribbon and ATP-cone domains)	2.4	
SA1546	-	HP	2.3	
SA1555	<i>acuA</i>	acetoin dehydrogenase homolog	2.1	cre
SA1556	<i>acuC</i>	acetoin utilization protein	2.1	
SA1627	<i>spIF</i>	serine protease SpIF	n.d.*	
SA1628	<i>spID</i>	serine protease SpID	3.6	
SA1629	<i>spIC</i>	serine protease SpIC	7.7	
SA1630	<i>spIB</i>	serine protease SpIB	3.6	cre
SA1631	<i>spIA</i>	serine protease SpIA	n.r.	SarA ^D
SA1673	-	CHP (Uncharacterized Fe-S protein)	2.1	
SA1692	-	CHP (putative intracellular protease/amidase) (Csb3)	2.7	SigB ^{G99}
SA1697	-	HP, similar to protein-tyrosine phosphatase	2.3	SigB ^B
SA1699	-	HP, similar to transporter	2.4	SigB ^B
SA1709	<i>ftnA-</i>	HP, similar to ferritin	3.1	PerR
SA1725	-	Staphopain, Cysteine Proteinase	3.4	
SA1726	-	HP	2.5	
SA1730	-	nitric-oxide synthase homolog	2.0	
SA1734	-	pyrazinamidase/nicotinamidase homolog	2.9	
SA1744	-	CHP	2.2	
SA1745	-	HP, similar to ABC transporter, ATP-binding protein	2.3	
SA1746	-	HP	2.1	
SA1747	-	HP, similar to ABC transporter, ATP-binding protein	n.d.*	
SA1748	-	HP, similar to transcription regulator, GntR family	2.6	
SA1756	<i>lytA</i>	truncated amidase	5.8	
SA1757	<i>lytA</i>	truncated amidase	16.9	
SA1801	-	anti repressor	4.3	
SA1810	<i>int</i>	integrase	4.8	
SA1812	-	HP, similar to synergohymenotropic toxin precursor - <i>Staphylococcus intermedius</i>	n.d.*	
SA1813	-	HP, similar to leukocidin chain lukM precursor	4.3	Fnr
SA1842	<i>agrB</i>	accessory gene regulator B	n.d.*	
SAS066	<i>agrD</i>	AgrD protein	n.d.*	
SA1843	<i>agrC</i>	accessory gene regulator C	2.4	
SA1844	<i>agrA</i>	accessory gene regulator A	1.9	SarA ^D

Anhang

N315-ORF	Gen	Beschreibung¹	Wt/ $\Delta clpP^2$	DNA-Motiv³
SA1869	<i>sigB</i>	sigma factor B	4.1	
SA1870	<i>rsbW</i>	anti-sigmaB factor	4.5	
SA1871	<i>rsbV</i>	anti-sigmaB factor antagonist	n.d.*	SigB ^{f, g, i, l}
SA1872	<i>rsbU</i>	sigmaB regulation protein RsbU	4.2	
SA1873	-	CHP	3.3	cre
SA1927	<i>fbaA</i>	fructose-bisphosphate aldolase	2.4	cre
SA1944	-	HP	3.0	
SA1945	-	HP, similar to mannose-6 phosphate isomerase pmi	3.3	YycF ^{Dp}
SA1946	-	CHP (Csb9)	2.9	SigB ^{GHB}
SA1961	-	HP, similar to transcription antiterminator BglG family	2.6	SigB ^B
SA1962	<i>mtIA</i>	PTS system, mannitol specific IIA component	3.2	
SA1963	<i>mtID</i>	mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	3.4	
SA1984	<i>asp23</i>	alkaline shock protein 23, ASP23	2.9	SigB ^{Hbb, d, f, h, j}
SA1985	-	HP	3.1	
SA1986	-	HP	3.7	SigB ^{Bf}
SA2089	<i>sarR</i>	staphylococcal accessory regulator A homolog	2.3	
SA2102	-	formate dehydrogenase homolog	2.4	SigB ^B
SA2108	-	HP, similar to transcription regulator, RpiR family	2.0	
SA2119	-	HP, similar to dehydrogenase (Csb28)	2.3	SigB ^{GB}
SA2122	<i>hutU</i>	urocanate hydratase	2.9	SarA ^D
SA2127	-	HP, similar to ribose 5-phosphate isomerase (rpi)	2.9	
SA2133	-	CHP	4.1	
SA2137	-	HP, similar to divalent cation transport	2.6	
SA2142	-	HP, similar to multidrug resistance protein	5.8	
SA2143	-	CHP	5.9	
SA2156	-	L-lactate permease lctP homolog	5.5	cre, Fnr
SA2158	-	HP, similar to TpgX protein	2.4	(SigB ^B)
SA2170	-	HP, similar to general stress protein 26 (Csb19)	2.1	SigB ^G
SA2176	<i>narK</i>	nitrite extrusion protein	3.6	Fnr, NreBC
SA2179	<i>nreC</i>	HP, similar to RR-NreC	2.4	
SA2180	<i>nreB</i>	HP, similar to HK-NreB	3.2	
SA2181	<i>nreA</i>	HP	3.1	
SA2182	<i>narI</i>	nitrate reductase gamma chain	2.1	
SA2183	<i>narJ</i>	HP, similar to nitrate reductase delta chain	n.d.	
SA2184	<i>narH</i>	nitrate reductase beta chain narH	n.d.	
SA2185	<i>narG</i>	respiratory nitrate reductase alpha chain	4.6	Fnr, NreBC
SA2186	<i>nasF</i>	uroporphyrin-III C-methyl transferase	n.d.	
SA2187	<i>nasE</i>	assimilatory nitrite reductase	2.2	
SA2188	<i>nasD</i>	nitrite reductase	7.7	
SA2189	<i>nirR</i>	HP, similar to NirR	10.1	Fnr, NreBC
SA2191	-	HP, similar to NirC	3.7	
SA2197	-	CHP (Protein-disulfide isomerase)	2.1	
SA2198	-	HP, (dsbA)	2.6	
SA2206	<i>sbi</i>	IgG-binding protein SBI	4.3	
SA2243	-	HP, similar to ABC transporter (ATP-binding protein)	2.6	

Anhang

N315-ORF	Gen	Beschreibung¹	Wt/ $\Delta clpP^2$	DNA-Motiv³
SA2247	-	CHP	2.7	
SA2261	-	HP, similar to efflux pump	3.8	
SA2262	-	CHP (Csb7)	2.1	SigB ^{GB} , YycF ^{DP}
SA2268	-	HP	17.8	Fnr
SA2302	<i>stbC</i>	HP, similar to ABC transporter	30.2	
SA2303	<i>smpC</i>	HP, similar to membrane spanning protein	19.5	
SA2328	<i>cidB</i>	CHP (putative effector of murein hydrolase, LrgB)	2.6	
SA2329	<i>cidA</i>	CHP	n.d.	
SA2339	-	HP, similar to antibiotic transport-associated protein	5.8	
SA2346	-	HP, similar to D-specific D-2-hydroxyacid dehydrogenase ddh homolog	2.4	
SA2347	-	HP, similar to aspartate aminotransferase	2.5	
SA2352	-	HP	2.5	SigB ^B
SA2400	<i>mgo2</i>	malate:quinone oxidoreductase	2.1	
SA2411	<i>citM</i>	HP, similar to magnesium citrate secondary transporter	2.4	cre
SA2424	<i>arcR</i>	HP, similar to transcription regulator Crp/Fnr family protein	n.r.	
SA2425	<i>arcC</i>	carbamate kinase	n.r.	
SA2426	<i>arcD</i>	arginine/ornithine antiporter	n.r.	
SA2427	<i>arcB</i>	ornithine transcarbamoylase	n.d.	
SA2428	<i>arcA</i>	arginine deiminase	3.4	cre, Fnr
SA2430	<i>aur</i>	zinc metalloproteinase aureolysin	18.8	SarA ^D , Fnr
SA2459	<i>icaA</i>	intercellular adhesion protein A	4.3	
SA2460	<i>icaD</i>	intercellular adhesion protein D	9.0	
SA2461	<i>icaB</i>	intercellular adhesion protein B	2.0	
SA2462	<i>icaC</i>	intercellular adhesion protein C	2.9	
SA2463	<i>lip</i>	triacylglycerol lipase precursor	3.7	SarA ^D , cre
SA2496	-	HP	2.4	
in $\Delta clpP$ erhöht transkribiert:				
SA0017	<i>vicR</i>	response regulator	0.5	Fnr
SA0018	<i>vicK</i>	two-component sensor histidine kinase	0.4	
SA0083	-	CHP	0.4	
SA0133	<i>dra</i>	deoxyribose-phosphate aldolase	0.5	
SA0162	<i>aldA</i>	aldehyde dehydrogenase homologue	0.3	cre, Fur
SA0175	-	CHP	0.4	Fnr
SA0205	-	HP, similar to lysostaphin precursor	0.4	
SA0207	-	HP, similar to maltose/maltodextrin-binding protein	0.5	
SA0229	-	HP, similar to nickel ABC transp. nickel-binding	0.4	
SA0230	-	conserved HP	n.d.*	PerR
SA0263	-	HP, similar to proton antiporter efflux pump	0.5	Fur
SA0264	-	HP, similar to penicillin amidase (EC 3.5.1.11) V	0.5	
SA0265	<i>lytM</i>	peptidoglycan hydrolase	0.2	(SigB ^B), YycF ^{De}
SA0298	-	HP, similar to regulatory protein PfoR	0.5	PerR
SA0315	-	HP (NAD-dependent protein deacetylases, SIR2 family)	0.4	
SA0316	-	HP, similar to lipoate-protein ligase	0.5	
SA0365	<i>ahpF</i>	alkyl hydroperoxide reductase subunit F	0.4	
SA0366	<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxide reductase subunit C	0.3	PerR,

Anhang

N315-ORF	Gen	Beschreibung ¹	Wt/ $\Delta clpP^2$	DNA-Motiv ³
				LexA
SA0367	<i>ywcG</i>	HP, similar to nitro/flavin reductase	0.3	PerR
SA0380	-	CHP	0.5	
SA0381	-	CHP	0.5	
SA0418	<i>cysM</i>	cysteine synthase homologue	0.5	
SA0419	<i>metB</i>	cystathionine gamma-synthase	0.4	
SA0469	<i>ftsH</i>	cell-division protein	0.4	MntR
SA0470	-	heat-shock protein HSP33 homologue	0.4	
SA0480	<i>ctsR</i>	transcription repressor of class III stress genes	0.3	CtsR
SA0481	-	CHP (Uncharacterized protein with conserved CXXC pairs)	0.1	
SA0482	-	HP, similar to creatine kinase	0.1	
SA0483	<i>clpC</i>	endopeptidase	0.1	
SA0573	<i>sarA</i>	staphylococcal accessory regulator A (Csb35)	0.4	SigB ^{GBa, b, c, e,}
SA0605	-	HP, similar to dihydroxyacetone kinase	0.5	
SA0606	-	CHP (Dihydroxyacetone kinase)	0.4	
SA0607	-	CHP	0.4	
SA0674	-	HP, similar to anion-binding protein	0.5	YycF ^{Dp}
SA0691	<i>sstD</i>	lipoprotein, similar to ferrichrome ABC transporter	0.3	
SA0714	<i>uvrA</i>	exinuclease ABC subunit A	0.4	LexA
SA0719	<i>trxB</i>	thioredoxine reductase	0.4	PerR
SA0724	-	HP, similar to cell-division inhibitor (Predicted nucleoside-diphosphate sugar epimerase)	0.02	(SigB ^B)
SA0742	<i>clfA</i>	fibrinogen-binding protein A, clumping factor (LPXTG)	0.3	SigB ^{HB}
SA0835	<i>clpB</i>	ClpB	0.05	CtsR
SA0857	-	<i>mecA</i>	0.5	
SA0858	-	HP, similar to transcription factor	0.3	
SA0859	-	thimet oligopeptidase homologue	0.4	
SA0891	-	HP, similar to ferrichrome ABC transporter	0.5	PerR, LexA
SA0903	-	CHP	0.3	
SA0937	<i>cydA</i>	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit 1 homolog	0.3	
SA0938	<i>cydB</i>	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II homolog	0.2	
SA0956	<i>mntH</i>	HP, similar to Mn ²⁺ -transport protein	0.5	MntR
SA0990	-	DNA-dependent DNA polymerase beta chain	0.4	
SA0991	<i>mutS2</i>	MutS-like protein	0.5	
SA0992	<i>trxA</i>	thioredoxin	0.5	
SA0993	<i>uvrC</i>	excinuclease ABC subunit C	0.5	LexA
SA1037	-	CHP	0.5	
SA1041	<i>pyrR</i>	pyrimidine operon repressor chainA	0.5	
SA1042	<i>pyrP</i>	uracil permease	0.4	
SA1043	<i>pyrB</i>	aspartate transcarbamoylase chain A	0.4	
SA1044	<i>pyrC</i>	dihydroorotase	0.4	
SA1045	<i>pyrAA</i>	carbamoyl-phosphate synthase small chain	0.4	
SA1046	<i>pyrAB</i>	carbamoyl-phosphate synthase large chain	0.5	
SA1047	<i>pyrF</i>	orotidine-5-phosphate decarboxylase	0.5	
SA1048	<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	0.4	
SA1080	<i>ffh</i>	signal recognition particle homolog	0.5	
SA1098	<i>codY</i>	transcription pleiotropic repressor CodY	0.5	

Anhang

N315-ORF	Gen	Beschreibung¹	Wt/ $\Delta clpP^2$	DNA-Motiv³
SA1127	<i>cinA</i>		0.4	
SA1128	<i>recA</i>	RecA protein	0.4	LexA
SA1139	<i>glpP</i>	glycerol uptake operon antiterminator regulatory protein	0.5	
SA1154	-	CHP (Threonine aldolase)	0.4	
SA1173	-	CHP	0.4	Fur
SA1174	<i>lexA</i>	SOS regulatory LexA protein	0.4	LexA
SA1180	-	HP, similar to exonuclease SbcD	0.5	LexA
SA1181	-	HP, similar to exonuclease SbcC	0.5	
SA1191	<i>glcT</i>	transcription antiterminator	0.4	
SA1196	<i>umuC</i>	HP, similar to DNA-damage repair protein	0.5	LexA
SA1198	-	HP, similar to glucanase	0.5	
SA1221	-	thioredoxin reductase	0.3	YycF ^{De}
SA1238	-	HP, similar to tellurite resistance protein	0.5	
SA1241	-	HP, similar to nitric-oxide reductase	0.5	
SA1267	<i>ebhA</i>	HP, similar to streptococcal adhesin emb	n.d.	
SA1268	<i>ebhB</i>	HP, similar to streptococcal adhesin emb	0.5	PerR
SA1282	<i>ssaA</i>	secretory antigen precursor SsaA homolog	0.5	
SA1305	<i>hu</i>	DNA-binding protein II	0.4	YycF ^{De}
SA1311	-	HP, similar to thioredoxin reductase homolog	0.3	
SA1312	<i>ebpS</i>	elastin binding protein	0.4	YycF ^{De}
SA1336	-	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0.5	
SA1343	-	HP, similar to tripeptidase	0.4	
SA1349	-	dihydrolipoamide dehydrogenase	0.5	
SA1365	-	glycine dehydrogenase subunit 2 homolog	0.4	
SA1366	-	glycine dehydrogenase subunit 1	0.4	
SA1367	-	aminomethyltransferase	0.4	SigB, cre
SA1407	-	CHP	0.3	PerR
SA1408	<i>dnaJ</i>	DnaJ protein	0.3	
SA1409	<i>dnaK</i>	DnaK protein	0.3	
SA1410	<i>grpE</i>	GrpE protein	0.4	
SA1411	<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcriptional repressor	0.4	CtsR, HrcA
SA1451	-	CHP (Coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase and related flavin-dependent oxidoreductases)	0.4	
SA1465	<i>tgt</i>	tRNA-guanine transglycosylase	0.5	
SA1498	<i>clpX</i>	protease ClpX	0.4	
SA1510	<i>gapB</i>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 2	0.5	
SA1517	<i>citC</i>	isocitrate dehydrogenase	0.4	
SA1518	<i>citZ</i>	citrate synthase II	0.3	
SA1534	-	CHP	0.4	
SA1549	-	HP, similar to heat-shock protein HtrA	0.5	
SA1554	<i>acsA</i>	acetyl-CoA synthetase	0.5	
SA1609	<i>pckA</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	0.4	
SA1617	-	HP, similar latent nuclear antigen	0.1	PerR
SA1618	-	CHP	0.1	
SA1619	-	HP	0.3	
SA1620	-	HP	n.d.*	
SA1621	-	HP	0.4	

Anhang

N315-ORF	Gen	Beschreibung¹	Wt/ $\Delta clpP^2$	DNA-Motiv³
SA1654	-	HP, similar to ABC transporter <i>ecsB</i>	0.5	
SA1655	-	ABC transporter <i>ecsA</i> homolog	0.4	
SA1811	<i>hIb</i>	truncated beta-hemolysin	0.4	
SA1836	<i>groEL</i>	GroEL protein	0.4	
SA1837	<i>groES</i>	GroES protein	n.d.*	CtsR, HrcA
SA1893	-	lipoprotein precursor	0.5	
SA1894	<i>thiE</i>	Chain B, thiamin phosphate synthase	0.4	
SA1895	<i>thiM</i>	hydroxyethyl thiazole kinase	0.5	
SA1896	<i>thiD</i>	phosphomethylpyrimidine kinase	0.4	
SA1897	-	HP, similar to transcriptional activator <i>TenA</i>	0.3	cre, PerR
SA1898	-	HP, similar to <i>SceD</i> precursor	0.5	(SigB ^B), YycF ^{Dp}
SA1937	-	CHP	0.5	
SA1938	<i>pdp</i>	pyrimidine nucleoside phosphorylase	0.5	cre
SA1939	-	deoxyribose-phosphate aldolase	0.5	cre
SA1964	<i>fmtB</i>	FmtB protein (<i>mrp</i>) (LPXTG)	0.4	
SA1979	-	HP, similar to ferrichrome ABC transporter	0.5	Fur
SA1980	-	CHP	0.3	(SigB ^B)
SA1981	-	CHP	0.3	(SigB ^B)
SA1982	<i>feoB2</i>	HP, similar to transporter	0.4	Fur
SA1990	-	putative DNA-binding / electrontransport <i>qorA</i>	0.5	
SA1991	<i>lacG</i>	6-phospho-beta-galactosidase	0.5	
SA1992	<i>lacE</i>	PTS system, lactose-specific IIBC component	0.5	
SA1993	<i>lacF</i>	PTS system, lactose-specific IIA component	0.3	
SA1994	<i>lacD</i>	tagatose 1,6-diphosphate aldolase	0.3	
SA1995	<i>lacC</i>	tagatose-6-phosphate kinase	0.3	
SA1996	<i>lacB</i>	galactose-6-phosphate isomerase <i>LacB</i> subunit	0.3	
SA1997	<i>lacA</i>	galactose-6-phosphate isomerase <i>LacA</i> subunit	0.4	
SA2001	-	HP, similar to oxidoreductase	0.5	Fur
SA2053	-	glucose uptake protein homolog	0.4	
SA2056	-	HP, similar to acriflavin resistance protein	0.4	
SA2057	<i>fmhB</i>	FmhB protein	0.5	
SA2075	<i>narQ</i>	<i>narQ</i>	0.3	
SA2081	-	HP, similar to urea transporter	0.2	
SA2082	<i>ureA</i>	urease gamma subunit	0.1	
SA2083	<i>ureB</i>	urease beta subunit	0.1	
SA2084	<i>ureC</i>	urease alpha subunit	0.1	
SA2085	<i>ureE</i>	urease accessory protein <i>UreE</i>	0.1	
SA2086	<i>ureF</i>	urease accessory protein <i>UreF</i>	0.1	
SA2087	<i>ureG</i>	urease accessory protein <i>UreG</i>	0.1	
SA2088	<i>ureD</i>	urease accessory protein <i>UreD</i>	0.2	
SA2093	<i>ssaA</i>	secretory antigen precursor <i>SsaA</i> homolog	0.2	YycF ^{De}
SA2097	-	HP, similar to secretory antigen precursor <i>SsaA</i>	0.4	YycF
SA2160	-	CHP	0.5	
SA2161	-	HP, attachment to host cells and virulence	0.4	
SA2162	-	HP, similar to thioredoxin reductase	0.4	Fur
SA2218	-	HP	0.1	
SA2234	<i>opuCD</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter	0.3	

Anhang

N315-ORF	Gen	Beschreibung ¹	Wt/ $\Delta clpP^2$	DNA-Motiv ³
SA2235	<i>opuCC</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter	0.2	
SA2236	<i>opuCB</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter	0.3	
SA2237	<i>opuCA</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter	0.4	
SA2238	-	CHP	0.5	
SA2266	-	HP, similar to oxidoreductase	0.5	
SA2285	<i>aap</i>	HP, similar to accumulation-associated protein	0.3	YycF
SA2286	<i>sarT</i>	SarA homolog	0.5	
SA2296	-	HP, similar to transcriptional regulator, MerR family	0.5	
SA2304	<i>fbp</i>	fructose-bisphosphatase	0.4	cre
SA2311	-	HP, similar to NAD(P)H-flavin oxidoreductase	0.5	Fnr
SA2316	<i>srtA</i>	sortase	0.5	
SA2318	-	HP, similar to L-serine dehydratase	0.2	
SA2319	-	HP, similar to beta-subunit of L-serine dehydratase	0.4	
SA2320	-	HP, similar to regulatory protein PfoR	0.3	cre
SA2332	-	HP, similar to secretory antigen precursor SsaA	0.4	
SA2337	<i>feoB</i>	ferrous iron transport protein B homolog	0.3	Fur
SA2344	<i>copA</i>	copper-transporting ATPase CopA	0.4	
SA2345	-	HP, similar to mercuric ion-binding protein	0.4	
SA2353	-	HP, similar to secretory antigen precursor SsaA	0.4	YycF, Fur
SA2356	<i>isaA</i>	immunodominant antigen A	0.5	YycF ^{Dp}
SA2370	-	HP, similar to thioredoxin reductase	0.3	
SA2371	-	CHP(COG2159, Predicted metal-dependent hydrolase of the TIM-barrel fold)	0.5	
SA2372	-	HP(COG0596: Predicted hydrolases or acyltransferases)	0.5	
SA2373	-	HP	0.5	Fnr
SA2375	-	HP, similar to dihydroorotate dehydrogenase	0.4	LexA
SA2378	-	CHP	0.3	SarA ^D
SA2399	<i>fda</i>	fructose-bisphosphate aldolase homolog	0.5	Fur
SA2417	-	HP, similar to two-component sensor histidine kinase	0.4	
SA2418	-	HP, similar to two-component response regulator	0.5	
SA2423	<i>clfB</i>	Clumping factor B (LPXTG)	0.4	
SA2431	<i>isaB</i>	immunodominant antigen B	0.4	
SA2432	-	CHP	0.4	
SA2440	-	HP	0.5	
SA2441	-	HP, similar to lipopolysaccharide biosynthesis p.	0.5	
SA2442	-	preprotein translocase secA homolog	0.4	
SA2443	-	HP	0.3	
SA2444	-	HP	0.3	
SA2445	-	HP	0.3	
SA2446	-	HP, similar to preprotein translocase secY	0.3	
SA2447	<i>hsa/sasA</i>	HP, similar to streptococcal hemagglutinin protein (LPXTG)	0.3	(SigB ^B), cre, YycF ^{De}
SA2456	-	capsular polysaccharide biosynthesis, CapB	0.5	
SA2473	-	HP	0.4	LexA
SA2481	-	CHP (Predicted sulfurtransferase)	0.3	YycF ^{Dp}
SA2489	-	HP, similar to high-affinity nickel-transport protein	0.2	(SigB ^B)

1: CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. 2: Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante: >2 in der $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und

Anhang

<0.5 in der Mutante erhöht exprimiert. 3: Weitere potenzielle Regulatoren aufgrund von konservierten DNA-Motiv: Siehe 4.1.2.

7.2. Microarray-Daten $\Delta arlR$

Tabelle 22 Ergebnisse der Transkriptomanalyse des Stammes 8325 $\Delta arlR$

<i>S. aureus</i> -N315			Wt/ $\Delta arlR^2$	
ORF	Gen	Beschreibung ¹	OD1	OD3
OD1 und OD3 erhöht transkribiert:				
SA0008	<i>hutH</i>	histidine ammonia-lyase	0.4	0.4
SA0172	-	HP, similar to integral membrane protein LmrP	0.3	0.2
SA0173	-	HP, similar to surfactin synthetase	0.2	0.1
SA0174	-	CHP	0.3	0.1
SA0184	-	CHP	0.2	0.5
SA0185	-	CHP (Predicted sugar phosphate isomerase)	0.2	0.5
SA0232	<i>lctE</i>	L-lactate dehydrogenase	0.5	0.4
SA0309	<i>geh</i>	glycerol ester hydrolase	0.5	0.4
SA0320	-	HP, similar to PTS fructose-specific enzyme IIBC component	0.4	0.3
SAS014	-	HP	0.2	0.1
SA0599	-	ATP-binding cassette transporter A	0.2	0.1
SA0891	-	HP, similar to ferrichrome ABC transporter	0.4	0.2
SA1007	<i>hla</i>	Alpha-Hemolysin precursor	0.1	0.1
SA1018	-	CHP	0.4	0.3
SA1091	<i>fmhC</i>	FmhC protein	0.5	0.1
SA1154	-	CHP (Threonine aldolase)	0.3	0.2
SA1617	-	HP, similar to latent nuclear antigen [Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus]	0.1	0.3
SA1618	-	CHP	0.1	0.3
SA1744	-	CHP	0.1	0.4
SA1745	-	HP, similar to ABC transporter, ATP-binding protein	0.1	0.5
SA1746	-	HP	0.1	0.4
SA1748	-	HP, similar to transcription regulator, GntR family	0.1	0.4
SA1752	<i>hly</i>	truncated beta-hemolysin	0.2	0.0
SA1843	<i>agrC</i>	accessory gene regulator C	0.1	0.1
SA1844	<i>agrA</i>	accessory gene regulator A	0.3	0.2
SA1883	<i>kdpE</i>	KDP operon transcriptional regulatory protein KdpE	0.4	0.3
SA1985	-	HP	0.4	0.4
SA1986	-	HP	0.4	0.3
SA2082	<i>ureA</i>	urease gamma subunit	0.2	0.1
SA2083	<i>ureB</i>	urease beta subunit	0.2	0.1
SA2084	<i>ureC</i>	urease alpha subunit	0.2	0.2
SA2086	<i>ureF</i>	urease accessory protein UreF	0.2	0.4
SA2218	-	HP	0.3	0.2
SA2312	<i>ddh</i>	D-specific D-2-hydroxyacid dehydrogenase	0.3	0.2
SA2318	-	HP, similar to L-serine dehydratase	0.2	0.2
SA2319	-	HP, similar to beta-subunit of L-serine dehydratas	0.3	0.2
SA2320	-	HP, similar to regulatory protein pfoR	0.2	0.2
SA2337	<i>feoB</i>	ferrous iron transport protein B homolog	0.3	0.1
SA2447	<i>hsa/sasA</i>	HP, similar to streptococcal hemagglutinin protein	0.2	0.3
SA2463	<i>lip</i>	triacylglycerol lipase precursor	0.1	0.2
bei OD1 erhöht und bei OD3 nicht reguliert:				
SA0186	-	HP, similar to sucrose phosphotransferase enzyme II	0.3	n.r.
SA0187	-	HP, similar to transcription regulator	0.2	n.r.

Anhang

S. aureus-N315			Wt/ΔarlR²	
ORF	Gen	Beschreibung¹	OD1	OD3
SA0225	-	HP, similar to glutaryl-CoA dehydrogenase	0.5	n.r.
SA0252	<i>lrgA</i>	holin-like protein LrgA	0.5	n.r.
SA0253	<i>lrgB</i>	holin-like protein LrgB	0.5	n.r.
SA0260	-	HP, similar to ribose transporter RbsU	0.5	n.r.
SA0304	<i>nanA</i>	N-acetylneuraminate lyase subunit	0.4	n.r.
SA0318	-	HP, similar to transport protein SgaT	0.5	n.r.
SA0519	<i>sdrC</i>	Ser-Asp rich fibrinogen-binding, bone sialoprotein-binding protein	0.4	n.r.
SA0742	<i>clfA</i>	fibrinogen-binding protein A, clumping factor	0.5	n.r.
SA0996	<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein subunit	0.5	n.r.
SA1585	-	proline dehydrogenase homolog	0.3	n.r.
SA2087	<i>ureG</i>	urease accessory protein UreG	0.3	n.r.
SA2088	<i>ureD</i>	urease accessory protein UreD	0.5	n.r.
SA2226	<i>SA</i>	truncated HP, similar to ABC transporter	0.5	n.r.
SA2227	<i>SA</i>	Truncated HP, similar to D-serine/D-alanine/glycine transporter	0.5	n.r.
SA2285	<i>aap</i>	HP, similar to accumulation-associated protein	0.5	n.r.
SA2423	<i>clfB</i>	Clumping factor B	0.4	n.r.
SA2440	-	HP	0.5	n.r.
SA2441	-	HP, similar to lipopolysaccharide biosynthesis protein	0.5	n.r.
SA2442	-	preprotein translocase secA homolog	0.4	n.r.
SA2443	-	HP	0.3	n.r.
SA2444	-	HP	0.3	n.r.
SA2445	-	HP	0.3	n.r.
SA2446	<i>secY</i>	HP, similar to preprotein translocase secY	0.3	n.r.
bei OD1 nicht reguliert und bei OD3 erhöht transkribiert:				
SA0011	-	HP, similar to homoserine-o-acetyltransferase	n.r.	0.4
SA0079	-	CHP	n.r.	0.4
SA0082	-	CHP	n.r.	0.2
SA0083	-	CHP	n.r.	0.4
SA0084	-	HP, similar to homo sapiens CGI-44 protein, PRO1975 protein	n.r.	0.4
SA0114	-	CHP	n.r.	0.4
SA0135	-	HP, similar to phosphonates transport permease	n.r.	0.5
SA0331	-	CHP	n.r.	0.4
SA0332	-	CHP	n.r.	0.4
SAS011	-	HP	n.r.	0.2
SA0410	-	CHP	n.r.	0.3
SA0434	-	HP, similar to trehalose operon transcriptional repressor	n.r.	0.5
SA0498	<i>rpL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	n.r.	0.5
SA0541	-	HP, similar to cationic amino acid transporter	n.r.	0.5
SA0550	-	CHP	n.r.	0.5
SA0570	-	HP	n.r.	0.5
SA0577	-	HP, similar to FimE recombinase	n.r.	0.4
SA0579	-	HP, similar to Na ⁺ /H ⁺ antiporter	n.r.	0.4
SA0580	-	HP, similar to Na ⁺ /H ⁺ antiporter	n.r.	0.4
SA0581	-	MnhD homologue, similar to Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit~ORFID:SA0581	n.r.	0.4
SA0583	-	HP, similar to Na ⁺ /H ⁺ antiporter	n.r.	0.4
SA0584	-	CHP	n.r.	0.4
SA0653	-	HP, similar to transcription repressor of fructose operon	n.r.	0.5

Anhang

S. aureus-N315			Wt/ΔarlR²	
ORF	Gen	Beschreibung¹	OD1	OD3
SA0654	<i>fruB</i>	fructose 1-phosphate kinase	n.r.	0.5
SA0655	<i>fruA</i>	fructose specific permease	n.r.	0.5
SA0690	-	HP, similar to ferrichrome ABC transporter ATP-binding protein	n.r.	0.3
SA0695	-	HP	n.r.	0.5
SA0706	-	HP, similar to comF operon protein 3	n.r.	0.3
SA0733	<i>secG</i>	probable protein-export membrane protein	n.r.	0.5
SA0734	-	carboxyesterase precursor homologue	n.r.	0.4
SA0735	<i>rnr</i>	ribonuclease R	n.r.	0.4
SA0752	-	HP	n.r.	0.4
SAS020	-	HP, similar to phosphoglycerate mutase	n.r.	0.4
SA0755	-	HP, similar to general stress protein 170	n.r.	0.4
SA0882	<i>comK</i>	HP, similar to competence transcription factor	n.r.	0.2
SA0900	<i>sspB</i>	cysteine protease precursor	n.r.	0.3
SA0914	<i>chiB</i>	HP, similar to chitinase B	n.r.	0.5
SA0928	-	HP, similar to cation ABC transporter	n.r.	0.4
SA1010	-	HP, similar to exotoxin 4	n.r.	0.4
SA1020	-	CHP	n.r.	0.3
SA1071	-	CHP	n.r.	0.2
SA1144	<i>miaA</i>	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase	n.r.	0.4
SA1164	<i>dhoM</i>	homoserine dehydrogenase	n.r.	0.4
SA1165	<i>thrC</i>	threonine synthase	n.r.	0.4
SA1166	<i>thrB</i>	homoserine kinase homolog	n.r.	0.5
SA1212	<i>opp-2D</i>	oligopeptide transport ATPase	n.r.	0.5
SA1214	<i>opp-2B</i>	oligopeptide transporter membrane permease domain	n.r.	0.4
SA1246	<i>arlS</i>	putative protein histidine kinase ArlS	n.r.	0.2
SA1267	<i>ebhA</i>	HP, similar to streptococcal adhesin emb	n.r.	0.0
SA1269	-	Blt-like protein	n.r.	0.4
SA1275	-	CHP	n.r.	0.3
SA1282	<i>recU</i>	recombination protein U homolog	n.r.	0.5
SA1591	<i>arsR</i>	arsenical resistance operon repressor homolog	n.r.	0.4
SA1725	-	Staphopain, Cysteine Proteinase	n.r.	0.4
SA1861	<i>ilvC</i>	alpha-keto-beta-hydroxylacil reductoisomerase	n.r.	0.3
SA1863	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	n.r.	0.3
SA1864	<i>leuC</i>	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	n.r.	0.3
SA1879	<i>kdpC</i>	probable potassium-transporting ATPase C chain	n.r.	0.1
SA1881	<i>kdpA</i>	probable potassium-transporting ATPase A chain	n.r.	0.1
SA1941	<i>dps</i>	general stress protein 20U	n.r.	0.5
SA1984	<i>asp23</i>	alkaline shock protein 23, ASP23	n.r.	0.4
SA1987	-	glycine betaine transporter opuD homolog	n.r.	0.5
SA2008	<i>alsS</i>	alpha-acetolactate synthase	n.r.	0.5
SA2017	<i>rpIM</i>	50S ribosomal protein L13	n.r.	0.5
SA2029	<i>rpIO</i>	50S ribosomal protein L15	n.r.	0.5
SA2033	<i>rpIF</i>	50S ribosomal protein L6	n.r.	0.5
SA2034	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	n.r.	0.5
SA2036	<i>rpIX</i>	50S ribosomal protein L24	n.r.	0.5
SA2045	<i>rpIW</i>	50S ribosomal protein L23	n.r.	0.5
SA2062	<i>sarV</i>	HP	n.r.	0.1

Anhang

S. aureus-N315			Wt/$\Delta arlR^2$	
ORF	Gen	Beschreibung¹	OD1	OD3
SA2085	<i>ureE</i>	urease accessory protein UreE	n.r.	0.2
SA2089	<i>sarR</i>	staphylococcal accessory regulator A homolog	n.r.	0.4
SA2091	-	HP	n.r.	0.4
SA2104	-	HP, similar to suppressor protein suhB	n.r.	0.4
SA2108	-	HP, similar to transcription regulator, RpiR family	n.r.	0.2
SA2121	<i>hutI</i>	imidazolonepropionase	n.r.	0.2
SA2179	-	HP, similar to response regulators of two-component regulatory	n.r.	0.3
SA2180	-	HP, similar to two component sensor histidine kinase	n.r.	0.3
SA2181	-	HP	n.r.	0.3
SA2182	<i>narI</i>	nitrate reductase gamma chain	n.r.	0.3
SA2187	<i>nasE</i>	assimilatory nitrite reductase	n.r.	0.4
SA2188	<i>nasD</i>	nitrite reductase	n.r.	0.4
SA2238	-	CHP	n.r.	0.4
SA2240	-	HP, similar to para-nitrobenzyl esterase chain A	n.r.	0.4
SA2260	<i>fabG</i>	HP, similar to glucose 1-dehydrogenase	n.r.	0.3
SA2290	<i>fnbB</i>	fibronectin-binding protein homolog	n.r.	0.2
SA2291	<i>fnb</i>	fibronectin-binding protein homolog	n.r.	0.3
SA2308	-	HP, similar to transcription regulator MarR family	n.r.	0.4
SA2327	-	HP, similar to pyruvate oxidase	n.r.	0.3
SA2328	<i>cidA</i>	CHP	n.r.	0.5
SA2331	-	HP	n.r.	0.4
SA2403	-	CHP	n.r.	0.5
SA2414	<i>gpxA</i>	HP, similar to glutathione peroxidase	n.r.	0.4
OD1 und OD3 vermindert transkribiert:				
SA0021	-	CHP	2.3	2.4
SA0088	-	HP	2.1	2.9
SA0106	<i>lctP</i>	lctP	3.5	7.9
SA0128	<i>sodM</i>	superoxide dismutase	2.9	5.5
SA0269	-	HP	2.2	5.3
SA0295	-	HP, similar to outer membrane protein precursor	2.3	5.6
SA0330	-	HP, similar to ribosomal-protein-serine N-acetyltransferase	2.0	2.0
SA0509	-	CHP	2.6	6.9
SA0529	-	CHP	2.0	2.5
SA0566	-	HP, similar to iron-binding protein	2.2	2.5
SA0592	<i>tagA</i>	teichoic acid biosynthesis protein	2.2	2.5
SA0641	<i>rat/mgrA</i>	CHP, similar to transcriptional regulator	3.2	2.3
SA0841	-	HP, similar to cell surface protein Map-w	3.7	5.5
SA0856	<i>spx</i>	CHP (Arsenate reductase and related proteins, glutaredoxin family)	4.0	3.0
SA0893	-	CHP	2.1	3.7
SA0897	-	HP, similar to prolyl aminopeptidase	2.0	2.3
SA1056	-	HP	2.3	10.3
SA1321	-	HP	2.1	6.1
SA1969	-	HP, similar to ATP-binding Mrp-like protein	2.7	2.7
SA2001	-	HP, similar to oxidoreductase, aldo/keto reductase family	2.4	4.4
SA2132	-	HP, similar to ABC transporter (ATP-binding protein)	2.2	6.3
SA2133	-	CHP	2.4	4.2
SA2193	-	CHP	2.6	2.0

Anhang

S. aureus-N315			Wt/ΔarlR²	
ORF	Gen	Beschreibung¹	OD1	OD3
SA2247	-	CHP	2.3	3.1
SA2302	<i>stbC</i>	HP, similar to ABC transporter	10.6	15.8
SA2303	<i>smcC</i>	HP, similar to membrane spanning protein	13.0	10.1
SA2355	-	CHP	2.2	3.5
SA2356	<i>isaA</i>	immunodominant antigen A	2.6	2.7
SA2399	<i>fda</i>	fructose-bisphosphate aldolase homolog	3.3	3.5
SA2430	<i>aur</i>	zinc metalloproteinase aureolysin	4.6	2.2
bei OD1 vermindert und OD3 nicht reguliert:				
SAS007	-	HP	2.5	n.r.
SA0255	-	HP, similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme II, ABC component	2.3	n.r.
SA0291	-	HP	2.0	n.r.
SA0526	-	CHP	2.1	n.r.
SA0531	<i>proP</i>	proline/betaine transporter homologue	2.3	n.r.
SA0639	-	HP, similar to ABC transporter required for expression of cytochrome bd	2.3	n.r.
SA0651	-	HP	2.3	n.r.
SA0685	<i>nrdI</i>	NrdI protein involved in ribonucleotide reductase function	2.7	n.r.
SA0711	-	CHP	2.2	n.r.
SA0721	-	CHP	2.6	n.r.
SA0728	<i>pgk</i>	phosphoglycerate kinase	2.4	n.r.
SA0770	-	CHP (ABC-type metal ion transport system, permease component)	2.1	n.r.
SA0847	<i>oppD</i>	oligopeptide transport system ATP-binding protein OppD homologue	2.0	n.r.
SA0863	-	CHP	2.3	n.r.
SA1052	<i>gmk</i>	guanylate kinase homolog	2.2	n.r.
SA1130	-	CHP	2.1	n.r.
SA1168	-	HP	2.1	n.r.
SA1521	<i>pfk</i>	6-phosphofruktokinase	2.5	n.r.
SA1602	-	HP	4.2	n.r.
SA1933	-	HP	2.1	n.r.
SA2325	-	CHP	2.1	n.r.
SA2390	<i>panD</i>	aspartate 1-decarboxylase	2.0	n.r.
SA2434	-	fructose phosphotransferase system enzyme fruA homolog	4.6	n.r.
SA2435	<i>pmi</i>	mannose-6-phosphate isomerase	3.5	n.r.
bei OD1 nicht reguliert und OD3 vermindert transkribiert:				
SA0078	-	HP	n.r.	2.0
SA0089	-	HP, similar to DNA helicase	n.r.	2.2
SA0121	-	HP	n.r.	2.7
SA0165	-	HP, similar to alpha-helical coiled-coil protein SrpF	n.r.	3.4
SA0180	-	HP, similar to branched-chain amino acid transport system carrier protein	n.r.	2.8
SA0182	-	HP, similar to indole-3-pyruvate decarboxylase	n.r.	5.6
SA0207	-	HP, similar to maltose/maltodextrin-binding protein	n.r.	2.2
SA0209	-	maltose/maltodextrin transport permease homologue	n.r.	2.8
SA0210	-	HP, similar to NADH-dependent dehydrogenase	n.r.	2.4
SA0211	-	HP, similar to NADH-dependent dehydrogenase	n.r.	2.5
SA0217	-	HP, similar to periplasmic-iron-binding protein BitC	n.r.	2.1
SA0231	<i>hmp</i>	HP, similar to flavohemoprotein	n.r.	3.6
SA0266	-	CHP	n.r.	2.1
SA0267	-	HP	n.r.	2.7

Anhang

S. aureus-N315			Wt/ΔarlR²	
ORF	Gen	Beschreibung¹	OD1	OD3
SA0271	-	CHP	n.r.	4.8
SA0272	-	HP, similar to transmembrane protein Tmp7	n.r.	5.4
SA0275	-	CHP	n.r.	5.1
SA0276	-	CHP, similar to diarrheal toxin	n.r.	6.3
SA0277	-	HP	n.r.	4.4
SA0279	-	HP	n.r.	7.0
SA0280	-	HP	n.r.	2.7
SA0281	-	CHP	n.r.	3.8
SA0290	-	CHP	n.r.	2.1
SA0292	-	HP	n.r.	3.7
SA0298	-	HP, similar to regulatory protein PfoR	n.r.	2.5
SA0367	<i>ywcG/ nfrA</i>	HP, similar to nitro/flavin reductase	n.r.	2.2
SA0372	-	HP	n.r.	2.3
SA0373	<i>xprT</i>	xanthine phosphoribosyltransferase	n.r.	3.6
SA0374	<i>pbuX</i>	xanthine permease	n.r.	3.5
SA0375	<i>guaB</i>	inositol-monophosphate dehydrogenase	n.r.	3.0
SA0376	<i>guaA</i>	GMP synthase	n.r.	2.7
SA0391	<i>hsdM</i>	probable type I site-specific deoxyribonuclease LldI chain hsdM	n.r.	2.3
SA0392	<i>hsdS</i>	probable restriction modification system specificity subunit	n.r.	2.1
SA0406	-	HP	n.r.	3.0
SA0407	-	CHP	n.r.	3.2
SA0418	<i>cysM</i>	cysteine synthase homologue	n.r.	3.3
SA0419	<i>metB</i>	cystathionine gamma-synthase	n.r.	2.3
SA0422	-	HP, similar to lactococcal lipoprotein	n.r.	3.3
SA0428	-	CHP	n.r.	2.6
SA0471	<i>cysK</i>	cysteine synthase (o-acetylserine sulfhydrylase) homologue	n.r.	4.2
SA0472	<i>folP</i>	dihydropteroate synthase chain A synthetase	n.r.	2.4
SA0477	-	CHP	n.r.	2.2
SA0478	-	CHP	n.r.	2.1
SA0479	<i>nupC</i>	pyrimidine nucleoside transport protein	n.r.	2.8
SA0480	<i>ctsR</i>	transcription repressor of class III stress genes homologue	n.r.	4.0
SA0488	<i>cysS</i>	cysteinyl-tRNA synthetase	n.r.	2.1
SA0508	-	HP, similar to glycine C-acetyltransferase	n.r.	3.1
SA0511	-	HP, similar to UDP-glucose 4-epimerase related protein	n.r.	2.8
SA0512	<i>ilvE</i>	branched-chain amino acid aminotransferase homologue	n.r.	2.5
SA0513	-	CHP	n.r.	2.2
SA0514	-	HP, similar to deoxypurine kinase	n.r.	2.0
SA0517	-	CHP	n.r.	2.6
SA0528	-	HP, similar to hexulose-6-phosphate synthase (csb4)	n.r.	2.0
SA0537	<i>thiD</i>	HP, similar to phosphomethylpyrimidine kinase, thiD homologue	n.r.	2.4
SA0544	-	CHP	n.r.	3.2
SA0557	-	HP, similar to oxidoreductase, ion channel	n.r.	2.7
SA0558	-	CHP	n.r.	2.3
SA0559	-	CHP	n.r.	2.2
SA0605	-	HP, similar to dihydroxyacetone kinase	n.r.	2.1
SA0656	<i>nagA</i>	probable N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	n.r.	2.6
SA0677	-	HP, similar to choline transport ATP-binding protein	n.r.	3.4

Anhang

S. aureus-N315			Wt/ΔarlR²	
ORF	Gen	Beschreibung¹	OD1	OD3
SA0678	-	HP, similar to choline transporter	n.r.	2.2
SA0707	-	CHP	n.r.	2.8
SA0719	<i>trxB</i>	thioredoxine reductase	n.r.	2.0
SA0738	-	HP	n.r.	2.9
SA0739	-	CHP	n.r.	5.0
SA0746	<i>nuc</i>	staphylococcal nuclease	n.r.	3.6
SA0758	-	HP, similar to thioredoxin	n.r.	2.2
SA0759	-	HP, similar to arsenate reductase	n.r.	3.9
SA0760	-	glycine cleavage system protein H homologue	n.r.	2.8
SA0769	-	ABC transporter ATP-binding protein homologue~ORFID:SA0769	n.r.	2.1
SA0781	-	HP, similar to 2-nitropropane dioxygenase	n.r.	2.9
SA0790	-	HP, similar to N-acetyl-glucosamine catabolism homologue	n.r.	2.1
SA0793	<i>dltA</i>	D-alanine-D-alanyl carrier protein ligase	n.r.	3.5
SA0794	<i>dltB</i>	DltB membrane protein	n.r.	3.5
SA0796	<i>dltD</i>	poly D-alanine transfer protein	n.r.	2.8
SA0804	-	CHP	n.r.	2.2
SA0815	-	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase homologue	n.r.	2.2
SA0817	-	HP, similar to NADH-dependent flavin oxidoreductase	n.r.	2.4
SA0818	<i>rocD</i>	ornithine aminotransferase	n.r.	2.1
SA0820	<i>glpQ</i>	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	n.r.	4.2
SA0823	<i>pgi</i>	glucose-6-phosphate isomerase A	n.r.	3.0
SA0829	-	HP, similar to 5-oxo-1,2,5-tricarboxylic-3-penten acid decarboxylase	n.r.	2.2
SA0831	<i>cdr</i>	coenzyme A disulfide reductase	n.r.	2.7
SA0833	-	CHP	n.r.	2.2
SA0843	<i>fab</i>	3-oxoacyl- synthase	n.r.	2.2
SA0845	<i>oppB</i>	oligopeptide transport system permease protein	n.r.	2.6
SA0855	<i>trpS</i>	tryptophanyl-tRNA synthetase	n.r.	3.5
SA0857	<i>mecA</i>	HP, similar to negative regulator of genetic competence MecA	n.r.	2.2
SA0859	-	thimet oligopeptidase homologue	n.r.	5.6
SA0861	-	CHP	n.r.	2.2
SA0873	-	CHP	n.r.	2.1
SA0878	-	toxic anion resistance protein homologue	n.r.	2.1
SA0941	-	CHP	n.r.	2.1
SA0957	-	CHP	n.r.	2.5
SA0963	<i>pycA</i>	pyruvate carboxylase	n.r.	2.3
SA1019	-	CHP	n.r.	2.0
SA1024	<i>pbpA</i>	penicillin-binding protein 1	n.r.	2.3
SA1025	<i>mraY</i>	phospho-N-muramic acid-pentapeptide translocase	n.r.	2.8
SA1026	<i>murD</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	n.r.	2.4
SA1027	<i>div1b</i>	cell division protein, FtsQ homolog	n.r.	2.0
SA1100	-	elongation factor TS	n.r.	3.5
SA1101	<i>smbA</i>	uridylate kinase	n.r.	4.8
SA1102	<i>frf</i>	ribosome recycling factor	n.r.	4.1
SA1120	-	HP, similar to transcription regulator GntR family	n.r.	2.4
SA1121	-	HP, similar to processing proteinase homolog	n.r.	4.1
SA1123	-	HP, similar to 3-oxoacyl- acyl-carrier protein reductase homolog ymfl	n.r.	2.4
SA1127	<i>cinA</i>	competence-damage inducible protein cinA	n.r.	2.2

Anhang

S. aureus-N315			Wt/ΔarlR²	
ORF	Gen	Beschreibung¹	OD1	OD3
SA1128	<i>recA</i>	RecA protein	n.r.	2.5
SA1132	-	HP, similar to 2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase, beta subunit	n.r.	2.1
SA1137	<i>mutS</i>	DNA mismatch repair protein	n.r.	2.0
SA1138	<i>mutL</i>	DNA mismatch repair protein	n.r.	2.0
SA1140	<i>glpF</i>	glycerol uptake facilitator	n.r.	3.1
SA1141	<i>glpK</i>	glycerol kinase	n.r.	2.5
SA1146	<i>bsaA</i>	glutathione peroxidase	n.r.	2.2
SA1155	-	cardiolipin synthetase homolog	n.r.	2.4
SA1169	-	gamma-aminobutyrate permease	n.r.	2.4
SA1170	<i>katA</i>	Catalase	n.r.	2.5
SAS042	<i>rpmG</i>	50S ribosomal protein L33	n.r.	2.0
SA1184	<i>citB</i>	aconitate hydratase	n.r.	2.1
SA1191	<i>glcT</i>	transcription antiterminator	n.r.	2.1
SA1192	-	CHP (Predicted permease)	n.r.	2.2
SA1193	<i>fmtC</i>	oxacillin resistance-related FmtC protein	n.r.	3.1
SAS044	-	4-oxalocrotonate tautomerase	n.r.	2.1
SA1206	<i>femA</i>	factor essential for expression of methicillin resistance	n.r.	2.6
SA1207	<i>femB</i>	FemB protein	n.r.	2.4
SA1216	<i>pepF</i>	HP, similar to oligoendopeptidase	n.r.	5.7
SA1239	<i>braB</i>	branched-chain amino acid carrier protein	n.r.	2.7
SA1240	-	CHP	n.r.	2.2
SA1245	<i>odhA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1	n.r.	2.1
SA1257	-	peptide methionine sulfoxide reductase	n.r.	2.1
SA1289	-	HP, similar to bifunctional biotin ligase/biotin operon repressor	n.r.	2.0
SA1293	-	CHP	n.r.	2.1
SA1301	<i>ndk</i>	nucleoside diphosphate kinase	n.r.	2.6
SA1302	<i>gerCC</i>	heptaprenyl diphosphate syntase component II	n.r.	2.3
SA1320	-	HP	n.r.	3.5
SA1334	-	HP, similar to pyrroline-5-carboxylate reductase	n.r.	2.4
SA1336	-	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	n.r.	2.3
SA1360	-	Xaa-Pro dipeptidase	n.r.	2.7
SA1365	-	glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 2 homolog	n.r.	6.8
SA1366	-	glycine dehydrogenase subunit 1	n.r.	9.5
SA1367	-	aminomethyltransferase	n.r.	13.4
SA1393	-	CHP	n.r.	2.4
SA1405	-	CHP	n.r.	2.0
SA1444	-	CHP	n.r.	2.0
SA1446	<i>alaS</i>	alanyl-tRNA synthetase	n.r.	2.2
SA1448	-	CHP	n.r.	2.7
SA1456	<i>aspS</i>	aspartyl-tRNA synthetase	n.r.	2.5
SA1457	<i>hisS</i>	histidyl-tRNA synthetase	n.r.	2.9
SA1458	<i>lytH</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	n.r.	3.7
SA1459	-	CHP	n.r.	2.0
SA1498	<i>clpX</i>	protease ClpX	n.r.	2.2
SA1517	<i>citC</i>	isocitrate dehydrogenase	n.r.	2.0
SA1518	<i>citZ</i>	citrate synthase II	n.r.	2.0
SA1530	-	Xaa-Pro dipeptidase homolog	n.r.	2.0

Anhang

S. aureus-N315			Wt/ΔarlR²	
ORF	Gen	Beschreibung¹	OD1	OD3
SA1533	<i>ackA</i>	acetate kinase homolog	n.r.	2.3
SA1534	-	CHP	n.r.	3.5
SA1535	-	HP, similar to thioredoxin peroxidase	n.r.	3.5
SA1549	-	HP, similar to heat-shock protein HtrA	n.r.	3.2
SA1553	<i>fts</i>	formyltetrahydrofolate synthetase	n.r.	6.6
SA1555	<i>acuA</i>	acetoin dehydrogenase homolog	n.r.	2.0
SA1556	<i>acuC</i>	acetoin utilization protein	n.r.	2.0
SA1572	-	Xaa-His dipeptidase homolog	n.r.	2.4
SA1579	<i>leuS</i>	leucyl-tRNA synthetase	n.r.	2.2
SA1599	-	HP, similar to transaldolase	n.r.	5.6
SA1606	-	plant metabolite dehydrogenase homolog	n.r.	4.3
SA1611	-	CHP	n.r.	2.5
SA1612	-	CHP	n.r.	2.7
SA1615	<i>menE</i>	O-succinylbenzoic acid-CoA ligase	n.r.	2.3
SA1626	-	type I restriction enzyme EcoR124II M PROTEIN homolog [Pathogenicity island SaPI _n 3]	n.r.	2.1
SA1653	<i>TRAP</i>	signal transduction protein TRAP	n.r.	2.4
SA1655	-	ABC transporter <i>ecsA</i> homolog	n.r.	2.3
SA1669	<i>citG</i>	fumarate hydratase, class-II	n.r.	2.7
SA1679	-	HP, similar to D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	n.r.	2.6
SA1680	-	CHP, bacterioferritin comigratory protein	n.r.	2.7
SA1690	-	CHP	n.r.	2.7
SA1704	<i>map</i>	methionyl aminopeptidase map	n.r.	2.9
SA1715	-	glutamyl-tRNA _{Gln} amidotransferase subunit B	n.r.	2.3
SA1716	-	glutamyl-tRNA _{Gln} amidotransferase subunit A	n.r.	2.3
SA1732	-	HP, similar to sodium-dependent transporter	n.r.	3.2
SA1736	<i>aldH</i>	aldehyde dehydrogenase	n.r.	3.1
SA1741	-	CHP	n.r.	2.1
SA1742	-	HP	n.r.	2.6
SA1743	-	HP	n.r.	2.8
SA1850	-	CHP	n.r.	2.6
SA1852	<i>vga</i>	hypothetical ABC transporter ATP-binding protein	n.r.	2.0
SA1853	-	HP, similar to DNA mismatch repair protein MutS	n.r.	2.1
SA1856	-	HP, similar to glycoprotein endopeptidase	n.r.	2.1
SA1947	<i>czrA</i>	repressor protein	n.r.	4.0
SA1948	<i>czrB</i>	cation-efflux system membrane protein homolog	n.r.	4.4
SA1968	<i>arg</i>	arginase	n.r.	3.4
SA1990	-	CHP	n.r.	2.4
SA1994	<i>lacD</i>	tagatose 1,6-diphosphate aldolase	n.r.	2.0
SA2049	-	HP	n.r.	2.3
SA2052	-	CHP	n.r.	2.2
SA2075	<i>narQ</i>	<i>narQ</i>	n.r.	3.1
SA2080	-	HP, similar to butyryl-CoA dehydrogenase	n.r.	3.1
SA2097	-	HP, similar to secretory antigen precursor SsaA	n.r.	3.1
SA2106	-	HP, similar to protein of pXO2-46	n.r.	3.0
SA2109	-	HP, similar to transport protein	n.r.	2.1
SA2112	-	HP, similar to sodium-dependent transporter	n.r.	2.1
SA2118	-	HP	n.r.	2.1

Anhang

S. aureus-N315			Wt/$\Delta arlR^2$	
ORF	Gen	Beschreibung¹	OD1	OD3
SA2125	<i>hutG</i>	HP, similar to formiminoglutamase	n.r.	2.4
SA2126	-	HP	n.r.	2.2
SA2127	-	HP, similar to ribose 5-phosphate isomerase (<i>rpi</i>)	n.r.	2.3
SA2131	-	CHP	n.r.	2.9
SA2135	<i>gltS</i>	HP, similar to sodium/glutamate symporter	n.r.	2.0
SA2140	-	HP, similar to esterase	n.r.	2.4
SA2155	-	HP, similar to malate:quinone oxidoreductase	n.r.	2.2
SA2158	-	HP, similar to TpgX protein	n.r.	2.1
SA2159	-	HP, similar to transcription repressor of sporulation, septation and degradation <i>paiA</i>	n.r.	2.2
SA2160	-	CHP	n.r.	2.6
SA2200	-	HP, similar to ABC transporter, ATP binding subunit	n.r.	4.6
SA2201	-	HP, similar to ABC transporter, permease protein	n.r.	3.1
SA2202	-	HP, similar to ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein	n.r.	4.3
SA2232	-	HP, similar to 2-dehydropantoate 2-reductase	n.r.	2.3
SA2254	<i>opp-1B</i>	oligopeptide transporter putative membrane permease domain	n.r.	2.1
SA2261	-	HP, similar to efflux pump	n.r.	4.2
SA2265	-	HP	n.r.	2.3
SA2266	-	HP, similar to oxidoreductase	n.r.	2.3
SA2272	-	HP	n.r.	2.4
SA2275	-	HP	n.r.	2.0
SA2279	-	HP, similar to phosphomannomutase	n.r.	2.3
SA2304	<i>fbp</i>	fructose-bisphosphatase	n.r.	2.8
SA2311	-	HP, similar to NAD(P)H-flavin oxidoreductase	n.r.	4.3
SA2322	-	CHP	n.r.	2.8
SA2323	-	CHP	n.r.	2.1
SA2341	<i>rocA</i>	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	n.r.	2.5
SA2342	-	HP, similar to O-acetyltransferase	n.r.	2.4
SA2395	-	L-lactate dehydrogenase	n.r.	2.9
SA2402	-	acetate-CoA ligase	n.r.	2.7
SA2411	<i>citM</i>	HP, similar to magnesium citrate secondary transporter	n.r.	3.3
SA2412	-	HP, similar to uroporphyrin-III C-methyltransferase	n.r.	2.2
SA2431	<i>isaB</i>	immunodominant antigen B	n.r.	2.1
SA2466	-	HP, similar to phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase	n.r.	2.3
SA2480	<i>drp35</i>	Drp35	n.r.	2.2
bei OD1 vermindert und bei OD3 erhöht transkribiert:				
SA0162	<i>aldA</i>	aldehyde dehydrogenase homologue	0.4	4.2
SA0112	-	HP, similar to cysteine synthase	3.2	0.4
SA0113	<i>ocd</i>	HP, similar to ornithine cyclodeaminase	2.9	0.3
SA2081	-	HP, similar to urea transporter	3.1	0.3
SA2142	-	HP, similar to multidrug resistance protein	2.2	0.5
SA2143	-	CHP	2.3	0.5

1: CHP: konserviertes hypothetisches Protein, HP: hypothetisches Protein. **2:** Signalquotient Wildtyp/ $\Delta clpP$ -Mutante: >2 in der $\Delta arlR$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert exprimiert und <0.5 in der Mutante erhöht exprimiert.

7.3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	'copy'-DNA
CFU	Colony forming unit
Cm	Chloramphenicol
d. h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Erythromycin
<i>et al.</i>	,et alteri' (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare (1 kb=1000 Bp)
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Mol
m	milli- (10^{-3}); Meter
MCS	<u>M</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MLS-Antibiotika	Macrolid-Lincosamid-Streptogramin Antibiotika

Anhang

MOI	Multiplicity of Infection (Bakterien pro Zelle)
mRNA	„messenger“-RNA
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> -Stamm
n	nano-(10 ⁻⁹)
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen(‘open reading frame‘)
Ori	Replikationsstartpunkt
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	pH-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA Polymerase-Komplex
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur, reverse Transkription
s	Sekunde
s. o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
t	Zeit
Tab.	Tabelle
Target	engl.: Ziel, hier Zielgen
U	Unit
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	„volume per volume“, Volumenanteile
vs.	„versus“, gegen
W	Watt
w/v	„weight per volume“, Gewichts- pro Volumenanteile
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-b-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

7.4. Publikationen und Präsentationen

Agerer, F., A. Michel, K. Ohlsen and C. R. Hauck (2003). Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. J Biol Chem **278**: 42524-31.

Agerer, F., A. Michel, S. Lux, M. Rohde, K. Ohlsen and C. R. Hauck (2005). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalization. J Cell Sci **118**: 2189-200.

Antje Michel, Jörg Hacker, Knut Ohlsen. Analysis of the regulatory impact of the *Staphylococcus aureus* ArlS-ArlR two-component system using DNA microarrays.

55th DGHM Meeting, 09/28-10/01/2003, Dresden, Germany

Antje Michel, Susanne Engelmann, Michael Hecker, Jörg Hacker, and Knut Ohlsen. The ArlS-ArlR two-component system regulates virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*.

Functional Genomics: "From Bacteria to Man", 09/07-09/10/2003, Greifswald, Germany