

**Molekulare und funktionelle Charakterisierung der Serin/Threonin-
Proteinkinase Stk und -Proteinphosphatase Stp
von *Staphylococcus aureus***

**Molecular and functional characterization of the serine/threonine
protein kinase Stk and protein phosphatase Stp
of *Staphylococcus aureus***



**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences, Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infection and Immunity**

vorgelegt von

Marcel Jarick

aus Cottbus

Institut für Molekulare Infektionsbiologie

Würzburg 2018



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Betreuer: PD Dr. Knut Ohlsen

2. Betreuerin: PD Dr. Wilma Ziebuhr

3. Betreuerin: Prof. Dr. Susanne Engelmann

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Danksagung

Ich danke allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, vor allem danke ich:

- PD Dr. Knut Ohlsen für seine kompetente Anleitung, das entgegengebrachte Vertrauen und die harmonische Zusammenarbeit
- PD Dr. Wilma Ziebuhr für wissenschaftliche Diskussionen und Betreuung dieser Arbeit
- Prof. Dr. Susanne Engelmann für wissenschaftliche Diskussionen und Betreuung dieser Arbeit
- Unseren Kooperationspartnern aus dem Rudolf-Virchow-Zentrum in Würzburg Prof. Dr. Andreas Schlosser und Mirco Steger
- Unseren Kooperationspartnern an der Universität Greifswald Prof. Dr. Michael Lalk und Daniel Schultz
- Unserer Kooperationspartnerin an der Universität Tübingen und Hohenheim Dr. Ute Bertsche
- Unseren Kooperationspartnern aus dem Biozentrum in Würzburg: Prof. Dr. Christian Stigloher, Prof. Dr. Dandekar und Dr. Chunguang Liang
- Unseren Kooperationspartnern aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie in Würzburg: Prof. Dr. Konrad Förstner
- Dr. Tobias Hertlein und Liane Dreher für die gute Zusammenarbeit, Unterstützung und Freundschaft
- Den Studentinnen und Studenten, die mich im Rahmen von Bachelor- und Masterarbeiten bei meinem Projekt unterstützt haben, vor allem aber Julian Kranz, Sonja Vella und Christian Schenk
- Den Kollegen aus der AG Ohlsen, AG Ziebuhr und AG Lopez für die nette Arbeitsatmosphäre, ganz besonders aber Betty, Ben und Charly für ihre Unterstützung und Freundschaft.

Einen ganz besonderen Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und insbesondere meiner Ehefrau Katja Jarick für ihre Liebe, Verständnis und moralischen Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

I. Zusammenfassung

Staphylococcus aureus ist ein Kommensale, der die menschliche Haut und Schleimhaut der Nase und des Rachens besiedelt. Der Keim verursacht aufgrund zahlreicher Virulenzfaktoren leichte aber auch schwere Infektionen wie Pneumonie, Endokarditis oder Sepsis. Die Behandlung von *S. aureus*-Infektionen gestaltet sich heutzutage schwierig, da der Keim Resistenzen gegen verschiedenste Antibiotika ausgebildet hat. Zur Bekämpfung dieser Resistenzen werden neue Antibiotika benötigt, die u.a. mit der Zellphysiologie und der Zellwandwandsynthese der Bakterien interferieren.

Die Zellphysiologie und Zellwandsynthese wird abhängig von der Wachstumsphase und Umwelteinflüssen in den Bakterien streng reguliert. Neben den Zweikomponentensystemen sind Serin/Threonin-Proteinkinasen und -Phosphatasen wesentliche Sensoren und Regulatoren der Bakterien. Durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung bewirken diese beiden Systeme eine Hemmung oder Aktivierung der entsprechenden Zielproteine. Dadurch kann sich die Bakterienzelle an innere und äußere Reize anpassen. In dieser Arbeit wurde die konservierte Serin/Threonin-Proteinkinase Stk und die Serin/Threonin-Phosphatase Stp von *S. aureus* untersucht. Die beiden Proteine Stk und Stp haben einen großen Einfluss auf die Signalweiterleitung, den zentralen Metabolismus, die Stressantwort, die Antibiotikaresistenz und die Virulenz von *S. aureus*.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird dargelegt, dass Stk und Stp in der bakteriellen Membran lokalisiert sind, dort miteinander interagieren und antagonistisch Zielproteine phosphorylieren bzw. dephosphorylieren. Die Deletion der Phosphatase Stp bewirkt, dass zahlreiche Proteine in der Zelle permanent phosphoryliert und daher vermutlich nur noch eingeschränkt funktionstüchtig sind. Die ausbleibende Dephosphorylierung der Proteine in der *stp*-Mutante hat einen dramatischen Effekt auf die Zellwandsynthese und die Virulenz von *S. aureus*. So hat die *stp*-Mutante eine verdickte Zellwand und ist weniger virulent als die *stk*-Mutante und der Wildtypstamm. Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmals eine Erklärung präsentiert, die die strukturellen Besonderheiten von Stk und deren Auswirkung auf die Zellwandsynthese zusammenführt: In der *stp*-Mutante akkumulieren Zellwandvorläufer in der Zelle, da vermutlich die entsprechenden Zellwandsyntheseproteine durch Stk-vermittelte Phosphorylierung gehemmt werden. Die Proteine FemXAB nehmen eine zentrale Rolle in der Zellwandsynthese ein, indem sie die Pentaglycin-Interpeptidbrücke des Zellwandvorläufers Pentaglycin-Lipid II synthetisieren. Stk wird durch die Bindung seiner extrazellulären Domänen an Pentaglycin-Lipid II aktiviert. In der vorliegenden Arbeit konnte FemX als *in vitro* Substrat von Stk und Stp identifiziert werden. Die permanente Phosphorylierung von FemX in der *stp*-Mutante führt zur verminderten Synthese der Pentaglycin-Brücken am Lipid II und infolgedessen zum Einbau von unvollständigen Muropeptiden in

den neuen Peptidoglycanstrang. Diese strukturelle Veränderung führt zur Verdickung der Zellwand und folglich zur verminderten Empfindlichkeit gegenüber der Glycyl-Glycinpeptidase Lysostaphin. Neben FemX interagiert Stk mit weiteren Zellwandsyntheseproteinen wie FemAB und einigen Zellteilungsproteinen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Stk das Vorkommen seines extrazellulären Liganden Lipid II detektiert und dementsprechend die Zellwandsynthese über FemX reguliert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde anhand verschiedener *Omics*-Techniken die *stk*-, *stp*- und *stk/stp*-Mutante im Vergleich zum *S. aureus* NewmanHG Wildtyp charakterisiert. Dabei zeigten sich teilweise große Unterschiede zwischen der *stp*-Mutante und den anderen Stämmen. Mit diesen Untersuchungen konnten Ergebnisse aus anderen Studien bestätigt und mit weiteren Daten untermauert werden. So lässt sich die verminderte Virulenz der *stp*-Mutante mit der reduzierten Expression und Sekretion von Toxinen wie Hämolysinen und Leukozidinen erklären. Dies führt zu einer verminderten Hämolyse von Erythrozyten und einer verminderten Immunantwort gegen diese Toxine im Infektionsversuch. Stk und Stp phosphorylieren bzw. dephosphorylieren Transkriptionsfaktoren und Antwortregulatoren von Zweikomponentensystemen, was zu der veränderten Expression und Sekretion der Virulenzfaktoren führt. Die Analyse der Mutanten offenbart, dass Stk ein negativer und Stp ein positiver Regulator der Virulenz in *S. aureus* ist. Außerdem regulieren Stk und Stp zentrale Aspekte des Metabolismus in *S. aureus*. So ist die Konzentration an Nukleotidtriphosphaten in der *stp*-Mutante reduziert, was auf eine verminderte Expression der Gene der Pyrimidinsynthese zurückzuführen ist. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass Stk und Stp wesentliche Aspekte der Zellphysiologie wie die Zellwandsynthese, den zentralen Metabolismus und die Virulenz von *S. aureus* regulieren.

II. Summary

Staphylococcus aureus is a commensal that inhabits the human skin and mucosa. *S. aureus* causes a large variety of nosocomial and community-acquired infections. Nowadays, it is difficult to treat *S. aureus* infections because this bacterium has acquired resistance to multiple drugs. Therefore, there is a need for new antimicrobial drugs against *S. aureus*. The most promising strategy to combat antibiotic resistance is to find novel antibiotics which interfere with the cell physiology and cell wall synthesis pathway.

The cell physiology and cell wall synthesis is tightly regulated depending on the bacterial growth phase and environmental influences. In addition to the two-component systems, serine/threonine protein kinases are essential sensors and regulators of bacteria. By phosphorylation and dephosphorylation, these systems cause inhibition or activation of the corresponding target proteins. This allows the bacterial cell to adapt to internal and external stimuli. In this work, the conserved serine/threonine protein kinase Stk and the phosphatase Stp in *S. aureus* were investigated. The two proteins Stk and Stp influence signal transduction, central metabolism, stress response, antibiotic resistance and virulence of *S. aureus*.

In the first part of this work it is shown that Stk and Stp are localized in the bacterial membrane, where they interact with each other and phosphorylate or dephosphorylate target proteins antagonistically. The deletion of the phosphatase Stp leads to numerous proteins in the cell being permanently phosphorylated, which renders them partially unfunctional. The lack of protein dephosphorylation in the *stp* mutant has a dramatic effect on cell wall synthesis and virulence of *S. aureus*. Thus, the *stp* mutant has a thickened cell wall and is less virulent than the *stk* mutant and the wild-type strain. This work brings together the structural characteristics of Stk and their effect on cell wall synthesis for the first time. In the *stp* mutant, cell wall precursors accumulate in the cell, presumably because the corresponding cell wall synthesis proteins are inhibited by Stk-mediated phosphorylation. The proteins FemXAB play a key role in cell wall synthesis by synthesizing the pentaglycine interpeptide bridge of the final cell wall precursor pentaglycine lipid II. The pentaglycine lipid II is bound by the extracellular domains of Stk, thereby activating Stk. In the present work, FemX was identified as an *in vitro* substrate of Stk and Stp. The permanent phosphorylation of FemX in the *stp* mutant leads to inhibited synthesis of the pentaglycine bridges on the lipid II and consequently to the incorporation of incomplete muropeptides into the new peptidoglycan strand. This structural change leads to thickening of the cell wall and consequently reduced sensitivity to the glycyl-glycine peptidase lysostaphin. In addition to FemX, Stk interacts with other cell wall synthesis proteins such as FemAB and some cell division

proteins. These results illustrate that Stk detects the presence of its extracellular ligand lipid II. This leads to an inhibition of FemX and a downregulation of the cell wall synthesis pathway.

In the second part of this work, the *stk*, *stp* and *stk/stp* mutants were characterized by different *omics*-techniques in comparison to the *S. aureus* NewmanHG wild-type. There were some major differences between the *stp* mutant and the other strains. With these investigations, results from other studies were confirmed and substantiated with further data. Thus, the reduced virulence of the *stp* mutant can be explained by the reduced expression and secretion of toxins such as hemolysins and leukocidines. This leads to a reduced hemolysis of erythrocytes and a reduced immune response to these toxins in the infection experiment. Stk and Stp phosphorylate or dephosphorylate transcription factors and response regulators of two-component systems resulting in altered expression and secretion of virulence factors. Analysis of the mutants reveals that Stk is a negative and Stp is a positive regulator of virulence in *S. aureus*. In addition, Stk and Stp regulate central aspects of *S. aureus* metabolism. Thus, the concentration of nucleotide triphosphates in the *stp* mutant is reduced, which is due to a reduced expression of the genes of pyrimidine synthesis. From these results it becomes clear that Stk and Stp regulate essential aspects of cell physiology such as cell wall synthesis, central and virulence in *S. aureus*. This study of the function of Stk and Stp contributes significantly to the understanding of regulatory processes by phosphorylation in the bacterial cell.

III. Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	I
II.	Summary.....	III
III.	Inhaltsverzeichnis.....	V
1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> als Pathogen.....	1
1.2	Resistenzentwicklung in <i>S. aureus</i>	2
1.3	Signaltransduktionssysteme in <i>S. aureus</i>	3
1.4	Proteinkinasen und Phosphatasen in Bakterien.....	4
1.4.1	Proteinkinasen.....	4
1.4.2	Proteinphosphatasen.....	8
1.5	Serin/Threonin Proteinkinase Stk und -Phosphatase Stp in <i>S. aureus</i>	9
1.5.1	Aufbau von Stk.....	10
1.5.2	Mechanismus der Stk-Aktivierung.....	11
1.5.3	Aufbau von Serin/Threonin-Phosphatasen.....	13
1.5.4	Phosphoproteom von <i>S. aureus</i>	13
1.5.5	Stk und Stp regulieren die Zellphysiologie und Virulenz in <i>S. aureus</i>	14
1.6	Peptidoglycan-Synthese in <i>S. aureus</i>	18
1.7	Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	19
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	21
2	Material.....	22
2.1	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme.....	22
2.2	Kits.....	22
2.3	Medien.....	22
2.4	Antibiotika.....	23
2.5	Puffer und Lösungen.....	23
2.6	Bakterienstämme.....	24
2.7	Oligonukleotide.....	24
2.8	Plasmide.....	25
2.9	Antikörper.....	26
2.10	Geräte.....	26
2.11	Software.....	26
2.12	Datenbanken.....	26

3	Methoden.....	27
3.1	Anzucht und Stammhaltung.....	27
3.2	Arbeiten mit DNA.....	27
3.2.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. aureus</i>	27
3.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	28
3.2.3	Bakterienlysate für die Kolonie-PCR.....	28
3.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	29
3.2.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	29
3.2.6	Horizontale Gelelektrophorese.....	29
3.2.7	Aufreinigung von DNA.....	30
3.2.8	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	30
3.2.9	Restriktionsspaltung von DNA.....	30
3.2.10	Ligation von DNA.....	30
3.2.11	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
3.2.12	Transformation von <i>E. coli</i>	31
3.2.13	DNA-Sequenzierung.....	31
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	32
3.3.1	Herstellung monoklonaler Stk-Antikörper.....	32
3.3.2	Herstellung von <i>E. coli</i> - und <i>S. aureus</i> -Lysaten.....	32
3.3.3	Zellfraktionierung aus <i>S. aureus</i> Gesamtzelllysat.....	33
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
3.3.5	Färbung der Gele.....	35
3.3.6	Western Blot.....	35
3.3.7	Blaue Nativ-Gelelektrophorese (BN-PAGE).....	36
3.3.8	Herstellung rekombinanter Proteine.....	37
3.3.9	<i>In vitro</i> Kinase-/Phosphatase-Assay.....	40
3.4	Transkriptom-Analyse der <i>S. aureus</i> -Stämme mittels RNA-Seq.....	41
3.4.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	41
3.4.2	RNA-Sequenzierung der <i>S. aureus</i> -Stämme.....	41
3.5	Proteom-Analysen der <i>S. aureus</i> -Stämme.....	42
3.5.1	Isolierung der Proteine aus den <i>S. aureus</i> -Lysaten.....	42
3.5.2	Aufarbeitung der Proben für die Massenspektrometrie.....	43
3.6	Sekretom-Analysen.....	43
3.7	Interaktom-Analyse mittels Immunpräzipitation.....	44
3.7.1	Probengewinnung.....	45

3.7.2	Immunpräzipitation.....	45
3.8	Metabolom-Analyse	46
3.9	<i>Staph Toxin</i> -Proteinarray.....	46
3.9.1	Mausinfektionsmodel.....	47
3.9.2	Evaluierung der Antikörperantwort	47
3.10	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	48
3.11	Lysostaphin-Empfindlichkeitstest.....	48
3.12	Muropeptide-Analyse.....	49
3.13	Bakterielles Zwei-Hybrid-System (B2H).....	49
3.13.1	Semiquantitative Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen mittels Spot-Assays 50	
3.13.2	Quantifizierung von Protein-Protein-Interaktionen mittels β -Galaktosidase-Assays ...	50
3.14	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	51
4	Ergebnisse.....	52
4.1	Charakterisierung von Stk und Stp	52
4.1.1	Herstellung und Charakterisierung der α Stk-Antikörper	52
4.1.2	Native Konformation von Stk	54
4.1.3	Zelluläre Lokalisation von Stk und Stp.....	54
4.1.4	In <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stp akkumulieren Phosphoproteine.....	55
4.2	Stk und Stp regulieren Zellwandbiosyntheseenzyme	58
4.2.1	Die Zellwand von <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stp ist deutlich dicker.....	58
4.2.2	Die Zusammensetzung der Muropeptide stp-Mutante ist verändert.....	59
4.2.3	<i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stp ist resistenter gegenüber Lysostaphin	61
4.2.4	Stk und Stp beeinflussen die Konzentration von PGN-Verläufermetaboliten	61
4.2.5	Stk interagiert mit Zellwandsynthese- und Zellteilungsproteinen.....	63
4.2.6	FemX wird <i>in vitro</i> durch Stk phosphoryliert und durch Stp dephosphoryliert	66
4.2.7	stk- und stk/stp-Mutanten sind empfindlicher gegenüber zellwandaktiven Antibiotika 68	
4.3	Vergleichende Analysen der <i>S. aureus</i> NewmanHG Stämme	69
4.3.1	Transkriptom-Analyse der <i>S. aureus</i> Stämme	69
4.3.2	Proteom-Analyse der <i>S. aureus</i> Stämme.....	75
4.3.3	Interaktom von Stk	80
4.3.4	Sekretom-Analyse der <i>S. aureus</i> Stämme	82
4.3.5	Mutanten-spezifische Antikörperantwort im murinen Infektionsmodell.....	85
4.3.6	Stk und Stp beeinflussen die Hämolyse.....	86

4.3.7	Metabolom-Analysen der <i>S. aureus</i> -Stämme	87
4.3.8	Analyse von Protein-Protein-Interaktion mittels bakteriellem Zwei-Hybrid-Systems ..	91
5	Diskussion.....	95
5.1	Molekulare Charakterisierung von Stk und Stp.....	95
5.1.1	Charakterisierung des monoklonalen Stk-Antikörpers	95
5.1.2	Stk und Stp sind in der Zellmembran lokalisiert.....	96
5.1.3	In der <i>stp</i> -Mutante akkumulieren phosphorylierte Proteine.....	97
5.1.4	Charakterisierung des <i>stp/stk</i> -Operons	99
5.2	Stk und Stp regulieren die Zellwandsynthese in <i>S. aureus</i>	100
5.2.1	Die <i>stp</i> -Mutante hat eine dickere Zellwand	100
5.2.2	In der <i>stp</i> -Mutante akkumulieren Muropeptide mit unvollständigen Interpeptid- brücken	100
5.2.3	Die <i>stp</i> -Mutante ist resistenter gegenüber Lysostaphin	102
5.2.4	Stk interagiert mit FemAB und phosphoryliert FemX	102
5.2.5	Stk und Stp regulieren die Zellwandsynthese und Zellteilung	104
5.2.6	Modell: Stk und Stp reguliert die Zellwandsynthese via FemX	106
5.2.7	Stk und Stp regulieren die Zweikomponentensysteme der Zellwandsynthese	107
5.3	Stk und Stp beeinflussen Virulenz in <i>S. aureus</i>	110
5.4	Stk und Stp beeinflussen den Metabolismus in <i>S. aureus</i>	113
5.4.1	Die <i>stk</i> - und <i>stp</i> -Deletionen haben einen Einfluss auf die Pyrimidinsynthese.....	113
5.4.2	Die <i>stk</i> - und <i>stp</i> -Deletionen haben einen Einfluss auf den Cystein- und Methionin- Stoffwechsel	114
5.4.3	Die <i>stk</i> - und <i>stp</i> -Deletionen beeinflussen die Eisenaufnahmesysteme	115
5.5	Fazit	117
6	Literaturverzeichnis.....	118
7	Anhang.....	129
7.1	Analyse der Muropeptide und deren Quervernetzung.....	129
7.2	Tabellen der Transkriptom-Analyse	129
7.3	Tabellen der Proteom-Analyse	136
7.4	Tabelle der Interaktom-Analyse	139
7.5	Tabelle der Sekretom-Analyse	140
7.6	Tabelle der B2H-Oligonukleotide	141
7.7	Tabelle der B2H-Plasmide	143
IV.	Abbildungsverzeichnis.....	X
V.	Tabellenverzeichnis	XII

Inhaltsverzeichnis

VI.	Abkürzungsverzeichnis	XIII
VII.	Lebenslauf	XIV
VIII.	Eidesstattlich Erklärung	XVI

1 Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus* als Pathogen

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein grampositives, fakultativ anaerobes und unbewegliches Bakterium, das erstmals 1881 von Alexander Ogston entdeckt und 1884 von Rosenbach näher beschrieben wurde [1]. Aufgrund des traubenförmigen Wachstums der kugelförmigen Einzelzellen wurden diese Bakterien (griechisch: *staphylé* = Traube, *kókkos* = Kern) als *Staphylococcus* bezeichnet. Das goldgelbe Wachstum auf Nährmedien verlieh dem Bakterium seine Artbezeichnung *S. aureus* (lateinisch: *aureus* = golden). Die Größe des Bakteriums liegt üblicherweise zwischen 0,8 und 1,2 µm. Bis heute sind über 30 unterschiedliche Staphylokokken-Spezies bekannt, wobei *S. aureus* und *S. epidermidis* die am besten charakterisierten Arten sind. *S. aureus* ist Katalase- und Koagulase-positiv und kann anhand dieser Eigenschaften von anderen grampositiven Bakterien sowie innerhalb der Gattung *Staphylococcus* taxonomisch unterschieden werden [2].

S. aureus ist ein Kommensale, der die Haut und Schleimhaut in Nase und Rachen der Menschen und Tiere besiedelt. Studien haben gezeigt, dass 20 % der Bevölkerung persistierende Träger und 30 % kurzzeitige Träger von *S. aureus* sind, während die restlichen 50 % der Bevölkerung nicht besiedelt sind. Bei Infektionen werden oft Träger von *S. aureus* mit demselben Stamm infiziert mit dem sie besiedelt sind [3]. Das Bakterium besitzt eine hohe Tenazität und Anpassungsfähigkeit, sodass es weitgehend tolerant gegenüber Austrocknung und anderen physikalischen Noxen ist. Die vorrangige Nische der Bakterien ist das feuchte Epithel des Nasenvorhofs [4]. *S. aureus* kann durch eine Vielzahl an Virulenzfaktoren verschiedene Infektionen mit unterschiedlicher Pathogenese hervorrufen. Diese Infektionen lassen sich in drei Gruppen einteilen: (1) Nach dem Eindringen über die Haut oder Schleimhaut entstehen lokale, mit Eiterbildung einhergehende Infektionen wie Furunkel, Wundinfektionen, Sinusitis, *Otitis media* oder Mastitis. (2) Beim Eindringen in tiefere Gewebeschichten kann *S. aureus* invasive, systemische Infektionen wie Osteomyelitis, Pneumonie, Endokarditis oder Sepsis verursachen. *S. aureus* kann auch Biofilme ausbilden, die als Herde für systemische Infektionen dienen können. (3) Lebensmittelintoxikationen kommen nach der Einnahme von Speisen zustande, die mit *S. aureus*-Toxinen wie beispielsweise Enterotoxinen kontaminiert sind. Diese Vergiftungen können zu Übelkeit, Erbrechen und massiven Durchfall führen. Darüber hinaus kann *S. aureus* weitere Toxikosen wie das *Toxic-Shock-Syndrom*, *Staphylococcal-Scaled-Skin-Syndrom* und großblasiges *Impetigo* hervorrufen [5].

1.2 Resistenzentwicklung in *S. aureus*

Aufgrund seiner genetischen Variabilität hat *S. aureus* durch horizontalen Gentransfer und natürliche Selektion zahlreiche Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika ausgebildet. Vor der Einführung des von Alexander Fleming entdeckten Penicillins lag die Mortalität von systemischen *S. aureus*-Infektionen bei fast 80 % [6]. Penicilline sind antibakterielle Substanzen, die als sekundäre Stoffwechselprodukte von verschiedenen Pilzen gebildet werden. Sie interferieren mit der bakteriellen Zellwandsynthese, indem sie Transpeptidasen blockieren. Zwei Jahre nach der Einführung von Penicillin zur Behandlung von Infektionen Anfang der 1940er Jahre traten erste resistente *S. aureus*-Stämme auf. Fünf Jahre später waren 80 % aller klinischen *S. aureus*-Isolate resistent gegenüber Penicillin [7]. In den späten 1950er Jahren wurde das semisynthetische Antibiotikum Methicillin entwickelt und 10 Jahre später wurden erste Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme (MRSA) identifiziert [8]. Die Ausbrüche von Resistenzen verschiedenster Antibiotika erfolgten in Wellen und seit den 1980er Jahren tauchen weltweit neue *S. aureus*-Stämme mit verschiedenen Resistenzen auf [9, 10]. MRSA-Infektionen verursachen längere Krankenhausaufenthalte und höhere Mortalitätsraten als Infektionen mit Methicillin-sensitiven *S. aureus* (MSSA) [11]. MRSA-Stämme produzieren das alternative Penicillin-bindende Protein Pbp2a, welches eine verringerte Affinität zu β -Lactam-Antibiotika hat. Das Protein ist durch das *mecA*-Gen codiert, welches sich auf einem mobilen genetischen Element, der *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) befindet. Die Aufnahme und der Einbau der mobilen genetischen Elemente ins bakterielle Chromosom empfindlicher Stämme führen zur Resistenzausbildung in diesen Stämmen [12]. Die Resistenzraten und die Prävalenz von MRSA bleiben in Deutschland und Europa seit Jahren auf einem stabilen Niveau. Abgesehen von Risikogruppen liegt die Prävalenz von MRSA seit vielen Jahren stabil bei etwa 1 %. Die Resistenzraten für MRSA auf Intensiv- und Normalstationen lag im Jahr 2016 bei 16 % und im ambulanten Bereich bei 10 % aller getesteten *S. aureus*-Stämme [13]. MRSA ist nicht mehr nur ein nosokomialer Erreger (HA-MRSA). In den 1980er Jahren wurden erste MRSA-Stämme beschrieben, die auch in der Allgemeinbevölkerung vorkamen (CA-MRSA). Diese Stämme waren normalerweise mit Haut- und Weichteilinfektionen assoziiert und verursachten nun auch schwere gesundheitsgefährdende Infektionen [14]. CA-MRSA-Stämme sind genetisch von HA-MRSA verschieden, da sie erstens aufgrund einer verkürzten Version von SCC*mec* weniger resistent gegenüber nicht- β -Lactam-Antibiotika sind und zweitens oft das Zytotoxin Panton-Valentine-Leukozidin produzieren [9, 10]. CA-MRSA können auch nosokomiale Ausbrüche verursachen [15]. Die Besiedelung und Infektion mit MRSA ist sowohl für den Menschen als auch für Tiere beschrieben worden. Es können terrestrische und aquatische Tiere, aber auch Haus- und Nutztiere mit MRSA besiedelt sein (LA-MRSA). Die MRSA-Prävalenz in Nutztierhaltungsbetrieben liegt in der Hähnchen-, Puten- und Schweinhaltung bei jeweils 25 %, 40 % und 70 %. Daher sind nutztier-

exponierte Menschen deutlich häufiger mit MRSA besiedelt als die Allgemeinbevölkerung. So weisen Landwirte in der Geflügel- oder Rinderhaltung eine MRSA-Prävalenz von jeweils 37 % und in der Schweinhaltung von 77 – 86 % auf [16]. Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass Nutz- und Haustiere ein permanentes Reservoir für humane MRSA-Infektion darstellen können. Ernsthafte MRSA-Infektionen erfordern eine strenge Isolation im Krankenhaus und eine antibiotische Therapie, die gegen den Infektionsstamm gerichtet ist. Bei *S. aureus*-Stämmen mit multiplen Resistenzen wird in besonders kritischen Krankheitsfällen auf Reserveantibiotika wie Vancomycin zurückgegriffen. Aufgrund zunehmender Benutzung von Vancomycin haben sich Vancomycin-intermediäre (VISA) und Vancomycin-resistente *S. aureus*-Stämme (VRSA) in vielen Teilen der Welt etabliert [10, 17, 18]. Gegen Vancomycin-resistente MRSA sind nur noch wenige Antibiotika wie Tigazyklin und Daptomycin wirksam. Die rasche Resistenzentwicklung von Staphylokokken gegen verschiedene Antibiotikaklassen erfordert die Entwicklung neuer Antibiotika. Neue Antibiotika sollten sich gegen bakterielle Strukturen richten, die keine Ähnlichkeiten zu humanen Strukturen haben, aber eine hohe Ähnlichkeit innerhalb der pathogenen Bakterien aufweisen. Darüber hinaus sollten die Antibiotika bakterielle Strukturen angreifen, die für die Physiologie und Virulenz der pathogenen Bakterien essentiell sind. Mögliche Angriffsziele für neue Antibiotika sind dabei Enzyme der Replikation, Transkription, Translation, Zellwandsynthese und der Zellteilung. Außerdem eignen sich Antibiotika, die mit der Signaltransduktion der Bakterienzelle interferieren und so die Physiologie der Bakterienzelle aus dem Gleichgewicht bringen.

1.3 Signaltransduktionssysteme in *S. aureus*

Bakterien reagieren auf eine Vielzahl von Umweltreizen; wie Temperatur- und pH-Wert-Veränderungen, bakterielle Zelldichte, Sauerstoff- und Nährstoffverfügbarkeit. Die Bakterien besitzen dazu spezifische Signaltransduktionssysteme, welche Reize mittels Sensoren detektieren und diese an die Effektoren weiterleiten. Unter den bakteriellen Signaltransduktionssystemen sind die Zweikomponentensysteme von grundlegender Bedeutung. Diese bestehen in der Regel aus einer spezifischen Sensorkinase und einem Antwortregulator. Die Sensorkinase wird durch ein spezifisches Signal aktiviert und phosphoryliert sich infolgedessen selbst an einem Histidinrest. Das Phosphat wird anschließend autokatalytisch an ein Aspartat des Antwortregulators übertragen, der dadurch aktiviert wird. Der aktive Antwortregulator verändert in der Regel die Genexpression, sodass die Bakterienzelle auf den entsprechenden Umweltreiz reagieren kann. Nach dem Abklingen des Umweltreizes wird der Antwortregulator durch seine intrinsische Phosphatase-Aktivität oder durch eine zelluläre Phosphatase dephosphoryliert und somit der inaktive Ausgangszustand des Zweikomponentensystems wiederhergestellt. *S. aureus* besitzt 16 Zweikomponentensysteme, von denen lediglich WalRK essentiell für das Wachstum der Staphylokokken ist [19]. Die Zweikomponentensysteme

regulieren viele zelluläre Prozesse. So wird beispielsweise die Expression von zahlreiche Virulenzfaktoren durch die Zweikomponentensysteme AgrCA, SaeRS, SrrAB und ArlRS reguliert. VraSR, GraRS und WalRK detektieren Zellwandstress und koordinieren die Zellwandsynthese und Zellteilung [19]. Neben den Zweikomponentensystemen wurde mit den Serin/Threonin-Proteinkinasen (STPK) und Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (STPP) eine weitere Klasse von Signaltransduktionssystemen in Bakterien entdeckt, welche auf Grundlage von reversiblen Phosphorylierungen zelluläre Prozesse regulieren. So werden zahlreiche Prozesse in *S. aureus* durch die Serin/Threonin-Proteinkinase Stk und Serin/Threonin-Proteinphosphatase Stp reguliert. Beide Proteine werden gesondert in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben. Neben Stk und Stp regulieren in *S. aureus* noch weitere Proteinkinasen und Proteinphosphatasen wichtige physiologische Prozesse in der Bakterienzelle. So wird beispielsweise bei Stress und Nährstoffmangel die Aktivität des alternativen Sigma-Faktors B (SigB) durch die Kinase RsbW und Phosphatase RsbU reguliert [20]. Die Hpr Kinase/Phosphatase (HprK) ist ein bifunktionelles Enzym, welches sowohl die Kinase- als auch die Phosphatase-Aktivität in sich vereint. Das Protein wird bei einer hohen intrazellulären Glukosekonzentration durch den allosterischen Aktivator Fruktose-1,6-Biphosphat aktiviert. Die aktive HprK phosphoryliert PtsH (Hpr) an einem Serinrest und reguliert somit den Kohlenstoffmetabolismus und die Zuckeraufnahme in die Bakterienzellen [21].

1.4 Proteinkinasen und Phosphatasen in Bakterien

Das Überleben von Organismen hängt von der raschen Antwort und Anpassung an die sich ständig ändernde Umwelt ab. Diese Anpassung erfolgt über die Wahrnehmung und Weiterleitung von externen und internen Umweltreizen. Proteinkinasen und Proteinphosphatasen spielen durch die reversible Phosphorylierung wichtiger Zielproteine eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion. Darüber hinaus regulieren sie die Aktivität von Enzymen und Transkriptionsfaktoren. Kinasen übertragen ein Phosphat von einem Donor wie ATP auf eine bestimmte Aminosäure im Substratprotein. Kinasen können Proteine an den Aminosäuren Serin (Ser), Threonin (Thr), Cystein, Tyrosin, Histidin, Aspartat, Glutamat oder Argininen phosphorylieren. Die Phosphorylierung bewirkt beim Substratprotein eine Ladungs- oder Konformationsänderung, was zur Inhibition, Aktivierung oder subzellulären Lokalisationsänderung des Substratproteins führen kann [22]. Phosphatasen stellen die Antagonisten der Kinasen dar. Sie hydrolysieren den an die Aminosäuren gebundenen Phosphatrest und stellen somit den Ausgangszustand der Substratproteine wieder her.

1.4.1 Proteinkinasen

Es wurde lange Zeit angenommen, dass Phosphorylierungen durch Proteinkinasen nur in Eukaryoten vorkommen [23] und in Prokaryoten lediglich die Histidin- und Aspartat-Reste von Zweikomponenten-

systemen phosphoryliert werden. Im Jahre 1969 wurde von Kuo und Greengard erstmalig die Aktivität einer Proteinkinase in Bakterien beschrieben. Die Autoren beschrieben die Phosphorylierung von Histonen in *Escherichia coli* [24]. Zehn Jahre später wurde in *E. coli* die Isocitratdehydrogenase als erstes phosphoryliertes Substrat von Granak und Reeves nachgewiesen [25]. Die Isocitratdehydrogenase-Kinase/Phosphatase wurde 1982 von LaPorte und Koshland aufgereinigt und als erste bakterielle Proteinkinase charakterisiert [26]. Die erste bakterielle STPK (Pkn1), deren katalytische Domäne eine hohen Sequenzhomologie zu eukaryotischen STPK aufwies, wurde 1991 von Munoz-Dorado *et al.* in *Myxococcus xanthus* identifiziert. Die STPK Pkn1 wird unmittelbar vor der Sporenbildung exprimiert und unterliegt einer Ser- und Thr-Autophosphorylierung [27]. Infolge von Genomanalysen wurde deutlich, dass STPKs und STPPs eine wichtige Rolle in der Zellphysiologie zahlreicher Bakterien spielen.

In der Literatur werden aufgrund der Erstbeschreibung in Eukaryoten alle Hanks-Typ-STPKs aus allen drei Domänen des Lebens als eukaryotische STPKs (eSTK) bezeichnet [23]. Neuere phylogenetische Untersuchungen legen jedoch nahe, dass die alle STPKs vom Hanks-Typ den letzten gemeinsamen Vorfahren (*last universal common ancestor*, LUCA) als gemeinsamen Ursprung haben. Die Hanks-Typ-STPKs sind in allen drei Domänen des Lebens konserviert und ein horizontaler Gentransfer der STPKs zwischen den Domänen konnte ausgeschlossen werden [28]. Daher wird in dieser Arbeit dem Vorschlag von Stancik *et al.* gefolgt und stets auf die allgemeine Bezeichnung STPK anstatt eSTK zurückgegriffen [28].

In Bakterien kommen verschiedenen Typen von Proteinkinasen vor. Es werden STPK, Tyrosin-Kinasen, multifunktionelle Kinasen und neuerdings auch Arginin-Kinasen unterschieden [29]. Die STPK werden in den nachfolgenden Abschnitten gesondert behandelt. Multifunktionale Kinasen phosphorylieren sowohl Proteine als auch Metaboliten. Neben den multifunktionalen Kinasen entwickelten sich die Bakterien Tyrosin-Kinasen (BY-Kinasen), die keine Ähnlichkeiten mit den eukaryotischen Tyrosin-Kinasen aufweisen. Die BY-Kinasen kommen in der Mehrzahl aller sequenzierten bakteriellen Genome vor. Sie regulieren wesentliche Aspekte der bakteriellen Physiologie wie die Produktion von Exopolysacchariden, DNA-Metabolismus, Stressantwort und die Virulenz [30]. Das CapB-Protein ist ein typischer Vertreter der BY-Kinasen in *S. aureus*. Ferner besitzen Bakterien Arginin-Kinasen. In Staphylokokken kommt die Arginin-Kinase McsB vor, welche Argininreste von Substratproteinen phosphoryliert. Die Proteintyrosin-Phosphatasen A und B (PtpA und PtpB) dephosphorylieren diese Arginin-Phosphorylierung wieder. In einer aktuellen Studie von Junker *et al.* wurden 207 Arginin-Phosphorylierungen in einer *ptpB*-Mutante detektiert. Die entsprechenden Substrate waren in viele zelluläre Prozesse wie dem Energiestoffwechsel, Proteinsynthese, Virulenz, Transkription- und Stressregulation involviert [31].

STPK sind weit verbreitet in Eukaryoten, Bakterien und Archaeen und weisen hohe Homologien untereinander auf. Es konnten STPKs in gramnegative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Myxococcus xanthus* sowie vielen grampositiven Bakterien wie Staphylokokken, Streptokokken, Enterokokken und Mykobakterien identifiziert werden. *Mycobacteria*, *Myxococcus*, *Corynebacterium* und *Listeria* codieren mehrere STPKs und STPPs, während Staphylokokken und Streptokokken jeweils eine STPK und eine STPP codieren. So codiert beispielsweise *M. tuberculosis* 11 verschiedene STPKs (PknA-L) aber nur eine STPP (PstP) [32]. Die verschiedenen mykobakteriellen STPKs besitzen alle eine N-terminale Kinase-Domäne sowie C-terminale Domänen, die sich untereinander unterscheiden [33]. Die beiden Kinasen PknG und PknK sind zytoplasmatische Proteine, während die anderen mykobakteriellen STPKs aufgrund der Transmembrandomänen wahrscheinlich als Rezeptoren fungieren [34, 35]. Die am besten charakterisierte STPK ist die membranständige PASTA-(*penicillin binding protein and Ser/Thr kinase associated*)-STPK PknB von *M. tuberculosis*. PknB reguliert viele Aspekte der mykobakteriellen Physiologie und ist wichtig für das Wachstum und das Überleben im Wirt. Die Kinase ist ein wesentlicher Bestandteil von Signaltransduktionsprozessen in Mykobakterien, welche das Zellwachstum, die Bakterienform und die Zellteilung aufgrund der Phosphorylierung zahlreicher Zielproteine wie GarA, GlmU, PbpA, FhaA/B, MviN und RseA reguliert [29]. PknB ist essentiell für das mykobakterielle Wachstum und eine Deletion von *pknB* führt zu einer anomalen Zellmorphologie, letztlich zum Zelltod und damit zur vollständigen Entfernung des Pathogens im Mausinfektionsmodell [36]. PknB besteht aus einer zytoplasmatischen Kinasedomäne, die durch eine Transmembrandomäne mit den vier extrazellulären PASTA-Domänen verbunden ist. Die Struktur der Kinasedomäne und der PASTA-Domänen wurde anhand zahlreicher Studien mittels Röntgenstrahlen- und Kernspinalysen charakterisiert. Darüber hinaus wurde in vielen Studien die Interaktion der PASTA-Domänen mit den Liganden (Muropeptide) und der Dimerisierungmechanismus der Kinase- und PASTA-Domänen durch Strukturanalysen und Computersimulationen näher untersucht. In diesen Studien wurde außerdem der Aktivierungsmechanismus der Kinase durch Autophosphorylierung tiefgreifend untersucht [37, 38]. Aufgrund des großen Einflusses von PknB auf das mykobakterielle Wachstum wurden zahlreiche Kinaseinhibitoren wie Indolocarbazole, Mitoxantrone und Aminopyrimidine zur Bekämpfung von Mykobakterien entwickelt [39].

Von den drei STPKs in *Bacillus subtilis* besitzt nur PrkC drei extrazelluläre PASTA-Domänen. Mit diesen PASTA-Domänen bindet PrkC Muropeptide, welche in *Bacilli* als Signal zur Sporenkeimung wirken. Da *prkC*-Mutanten nicht in der Lage sind, aus der Spore zu keimen, wird PrkC eine Schlüsselrolle in der Sporulation und der Biofilmbildung von *Bacilli* zugesprochen [40]. Darüber hinaus reguliert PrkC die Morphogenese und koordiniert neben der Zellwandsynthese verschiedene Aspekte des Zellzyklus und der Zellteilung in *Bacilli* [41]. Ebenso wie das mykobakterielle PknB besitzt die STPK von

Streptococcus pneumoniae StkP vier PASTA-Domänen, welche die Lokalisation der Kinase am Septum vermitteln. StkP phosphoryliert Zellteilungs- und Zellwandsynthesepoteine, sodass die Kinase eine wichtige Funktion in der Organisation und Koordination der Zellteilung einnimmt [41]. In *Enterococcus faecalis* induziert die PASTA-Kinase IreK eine intrinsische Cephalosporin-Resistenz und detektiert Zellwandstress über die PASTA-Domänen [42]. PrkA, die PASTA-STPK des intrazellulären Pathogens *Listeria monocytogenes*, reguliert das Wachstum in den Wirtszellen. So vermittelt PrkA das Wachstum mit zytosolischen Kohlenstoffquellen, die intrazelluläre Replikation und verhindert die Entstehung des Inflammasoms und trägt so maßgeblich zur Virulenz im Mausmodell der Listeriose bei. Darüber hinaus bewirkt PrkA eine Resistenz gegenüber Zellwandstress und ist somit ein wesentlicher Bestandteil der Zellwandhomöostase [43]. Die PASTA-STPK PpkA trägt zur Virulenz des gramnegativen Pathogens *Pseudomonas aeruginosa* bei. Die *ppkA*-Mutante produziert weniger Biofilm und Pyocyanin, ist weniger tolerant gegenüber oxidativen und osmotischen Stress, und somit weniger virulent im Infektionsmodell [44]. Das grampositive Bodenbakterium *Streptomyces coelicolor* codiert mehr als 30 STPKs und 55 STPPs. Die Kinasedomänen der STPKs sind jeweils mit verschiedenen zusätzlichen Domänen verbunden, wobei lediglich drei STPKs PASTA-Domänen besitzen [45]. Die Membrankinase Pkai ist in einem Cluster mit fünf weiteren STPKs codiert und kontrolliert die Sporulation durch die Unterdrückung der vorzeitigen Vernetzung der Zellwand [45]. Das ebenfalls grampositive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* codiert vier STPKs (PknA, PknB, PnkG und PknL) und die STPP Ppp. PknB und PknL sind Membranproteine, die vier bzw. fünf extrazelluläre PASTA-Domänen besitzen. Die STPKs sind nicht essentiell und sind in der Zellmorphogenese und Zellteilung involviert [46].

Tabelle 1: Übersicht von PASTA-STPKs und STPPs sowie deren Substrate in ausgewählten Bakterien

Basierend auf den Übersichtsartikel von Janczarek *et al.* sind in der Tabelle einige STPPs und STPKs mit PASTA-Domänen aus verschiedenen Bakterienspezies und deren Substrate aufgeführt [29].

Spezies	STPK/STPP	Substrate
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PknB/PtsP	FadD, KasA/B, MaB, EmbR, GroEL, GlmU, PBPA, PknA, RsHA, SigH, GarA
<i>Staphylococcus aureus</i>	Stk/Stp	MgrA, SarA, SarZ, PurA, HU, CcpA, VraR, WalR, GraR, SpoVG, Eno, Pta, Efp, RplL, FdA
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	StkP/PhpP	DivIA, FtsZ, PpaC, RitC, MurC, ComD, RR06, RpoD,
<i>Bacillus subtilis</i>	PrkC/PrpC	CpgA, AlsD, Icd, YvcK, GpsB, YwjH, GlnA, Hpr, WalR, AbrA/B, YkwC, EF-G, EF-Tu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PpkA/PppA	Fha1, H1

Für die Archaeen als dritte Domäne des Lebens konnten dank Genomanalysen ebenfalls STPKs und STPPs in zahlreichen Spezies identifiziert werden. Einige Archaeen besitzen 10 oder mehr STPKs, aber selten mehr als 2 STPPs. So codiert beispielsweise das Genom von *Sulfolobus solfataricus* 10 STPKs und entsprechende Phosphoproteom-Analysen identifizierten 1318 verschiedene Phosphopeptide von 540

verschiedenen Proteinen. Es wurden Phosphorylierungen vorrangig an metabolischen Enzymen, aber auch an Transkriptionsfaktoren, DNA-Bindeproteinen, Translationsproteinen und Transportern gefunden [47, 48]. Diese Ausführungen zeigen, dass STPKs und STPPs zahlreiche physiologische Prozesse in allen drei Domänen des Lebens regulieren.

1.4.2 Proteinphosphatasen

Proteinphosphatasen sind die Antagonisten der Proteinkinasen und hydrolysieren die Phosphatreste von Serinen, Threoninen und Tyrosinen. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen stellen wesentliche Komponenten der Signalweiterleitung dar. Im Gegensatz zu den energiereichen und damit labilen Phosphorsäureamidaten (Histidin) bzw. Acylphosphaten (Aspartat) der Zweikomponentensysteme sind Phosphatester an Serin, Threonin und Tyrosin deutlich stabiler, sodass diese phosphorylierten Aminosäuren eine spezifische Phosphatase zur Abspaltung des Phosphats benötigen.

Die bakteriellen Phosphatasen werden in vier verschiedene Hauptklassen eingeteilt; in konventionelle und niedermolekulare Proteintyrosin-Phosphatasen, sowie Phosphoprotein-Phosphatasen, als auch metallabhängige Phosphatasen [30]. Bakterielle STPPs gehören zu den Phosphoprotein- und metallabhängigen Phosphatasen. Dualspezifische Phosphoprotein-Phosphatasen besitzen drei konservierte Motive und sind oft ebenfalls in der Lage, neben Histidin-, Aspartat- auch Serin-, Threonin- und Tyrosinreste zu dephosphorylieren [22]. Die STPPs sind hoch konserviert in allen drei Domänen des Lebens und meist in einem gemeinsamen Operon mit einer STPK codiert [39]. Die physiologischen Funktionen der STPPs sind im Gegensatz zu den STPKs noch nicht gut verstanden. Die STPP PhpP ist essentiell für das Überleben von *S. pneumoniae* und kann nur deletiert werden, wenn auch die STPK StkP deletiert wird. Dies deutet auf eine strenge Kontrolle der Aktivität von StkP durch PhpP. Beide Proteine interagieren an der Zellmembran miteinander [49]. StkP und PhpP sind ein funktionell gekoppeltes Paar, da PhpP autophosphoryliertes StkP wieder dephosphoryliert [50]. Die Dephosphorylierung der Kinase konnte auch für Mykobakterien, Staphylokokken und Bacilli nachgewiesen werden [22]. STPP-Deletionen beeinflussen in verschiedenen Bakterien die Zellteilung und das Zellwachstum [22]. Die Deletion von Stp führt zu einer erhöhten Lysostaphinresistenz und zu Zellwanddefekten in *S. aureus* [51]. Eine *prpC*-Mutante in *B. subtilis* verursacht Defekte in der Sporenbildung und in der Ausbildung eines Biofilms [52]. Viele Zielproteine von PrpC wie EF-Tu, EF-G und CpgA sind entscheidend an der Translation beteiligt [53]. Eine Deletion von Pph1 von *M. xanthus* verursacht Defekte im späten vegetativen Wachstum und in der Ausbildung von Sporen [22]. Darüber hinaus sind STPPs wesentliche Regulatoren der Virulenz. Eine Deletion von *stp* in *L. monocytogenes* und *S. aureus* verhindert das Wachstum im Mausinfektionsmodell [54, 55]. In *P. aeruginosa* regulieren die Kinase und Phosphatase PpkA und PppA antagonistisch die Sekretion von Virulenzfaktoren über ein Typ-VI-

Sekretionssystem [56]. STPKs und STPPs regulieren antagonistisch viele physiologische Prozesse und die Virulenz in zahlreicher Bakterien [29, 57].

1.5 Serin/Threonin Proteinkinase Stk und -Phosphatase Stp in *S. aureus*

Stk wurde erstmals 1999 in einer Studie von De Lencastre *et al.* erwähnt, in der mittels Transposonmutagenese von MRSA nach Faktoren gesucht wurde, die eine Methicillin-Resistenz vermitteln [58]. Im Jahre 2007 konnten erstmals *in vivo* Phosphorylierungen in MRSA nachgewiesen werden. Es wurden neun Proteine detektiert, die durch Stk phosphoryliert wurden [59]. In nachfolgenden Studien wurde die 3D-Struktur von Stk bestimmt, die entsprechenden Mutanten charakterisiert und zahlreiche Zielproteine von Stk identifiziert, welche in den folgenden Abschnitten näher beschreiben werden.

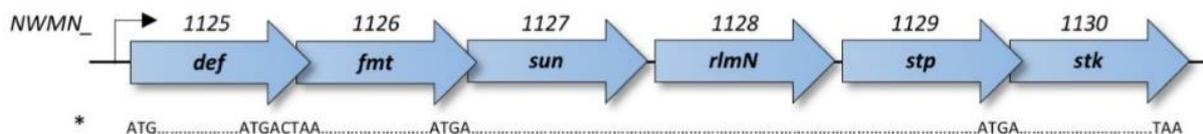


Abbildung 1: Aufbau des *stp/stk*-Operons.

Der Genname und der *S. aureus* Newman ORF (NWMMN) sind im Schema des hexacistronischen Operons angegeben. Überlappende Start- und Stop-Codons einiger Gene sind ebenfalls aufgeführt (*).

Alle sequenzierten Stämme von *S. aureus* codieren eine STPK Stk und eine STPP Stp. Stk wurde lange Zeit aufgrund der starken Homologie zu anderen bakteriellen STPKs als PknB, PrkC oder Stk1 bezeichnet. In dieser Arbeit wird die STPK von *S. aureus* in Einklang mit zahlreichen Publikationen als Stk bezeichnet [51, 60-62]. Stk und Stp sind Bestandteile eines hexacistronischen Operons (Abbildung 1). Das Operon codiert eine Peptiddeformylase (*def*, NWMMN_1125), eine Methionyl-tRNA-Formyltransferase (*fmt*, NWMMN_1126), eine 16S rRNA-Methyltransferase (*sun*, NWMMN_1127), eine 23S rRNA Methyltransferase (*rlmN*, NWMMN_1128) sowie Stp (*stp*, NWMMN_1129) und Stk (*stk*, NWMMN_1130). Stp und Stk werden gemeinsam transkribiert. Das Stopp-Codon von *stp* und das Startcodon von *stk* überlagern sich in den vier Nukleotiden (ATGA) [51, 60, 63]. Die Gene *stk* und *stp* sind in allen *S. aureus*-Stämmen nahezu zu 100 % konserviert. Der Stamm *S. aureus* COL weist jedoch als einziger Stamm eine Punktmutation im *stk*-Gen auf, was zu einer verkürzten Stk-Variante ohne PASTA-Domänen führt [64]. Interessanterweise codieren einige *S. aureus*-Stämme wie Mu50, N315 und JH1 auf der SCCmec-Kassette eine weitere STPK (Stk2), welche ebenfalls keine PASTA-Domänen besitzt. Die Stk2 vermittelt eine effiziente Immunität gegen Bakteriophagen. Das Phagenprotein Pack aktiviert die Stk2, welche fortan zahlreiche Proteine der Translation, Transkription, Zellzyklus, DNA-Reparatur und des zentralen Metabolismus des Bakteriums phosphoryliert. Dies führt zum Selbstmord der Phagen-infizierten Bakterienzelle, wodurch die Verbreitung der Phagen in der Bakteriengemeinschaft verhindert wird [65].

1.5.1 Aufbau von Stk

Stk ist ein Membranprotein und besteht aus der N-terminalen, zytosolischen Kinase-Domäne, drei extrazellulären PASTA-Domänen sowie einer C-terminalen Subdomäne (Abbildung 2A und B), die über eine Transmembrandomäne miteinander verbunden sind [60, 66]. Die Kinase-Domäne (AS 1-282) von Stk wurde von Rakette *et al.* mittels kristallographischer Strukturanalysen charakterisiert [67].

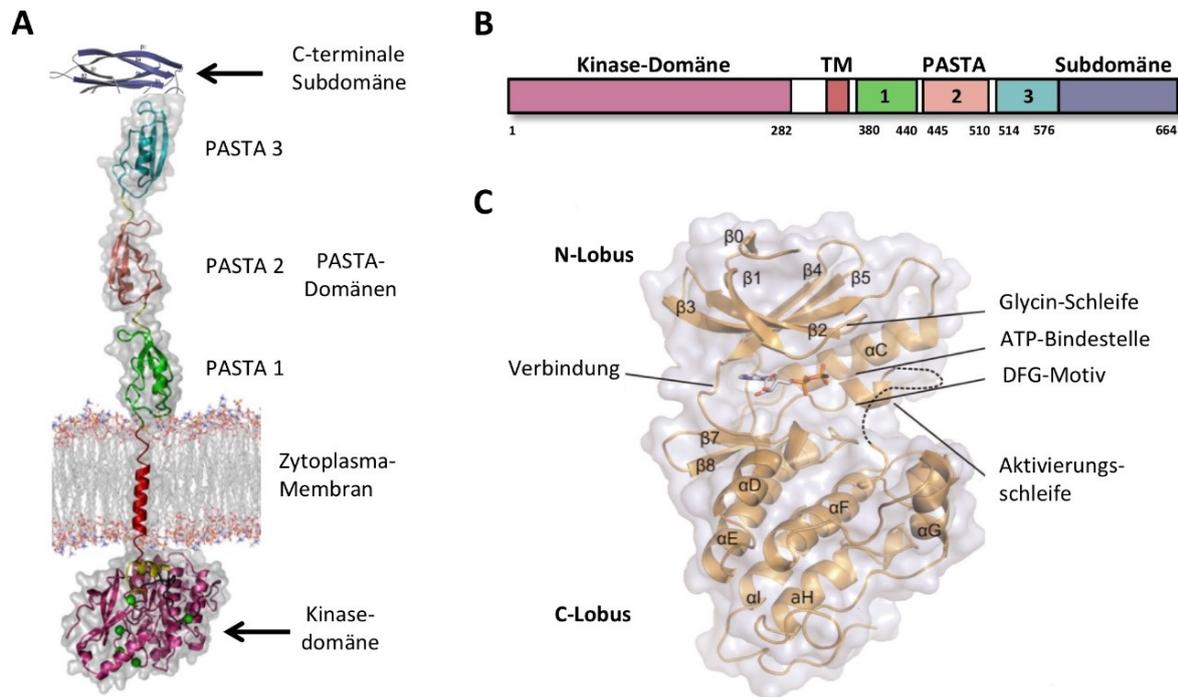


Abbildung 2: Struktureller Aufbau von Stk.

Dreidimensionales Modell (A) und Domänenstruktur (B) von Stk. Die intrazelluläre Kinasedomäne (Aminosäuren 1-282) ist in Magenta eingefärbt und mit der Transmembrandomäne (TM; rot) in die Membran eingebettet. Die extrazellulären Domänen PASTA 1 (380-440), PASTA 2 (445-510), PASTA 3 (514-576) und C-terminale Subdomäne (357-664) sind in grün, lachsrosa, blau und violett eingefärbt. Die Verbindung zwischen den Domänen ist gelb gefärbt. Die Abbildung A wurde modifiziert aus Paracuellos *et al.* (2010) [68]. Die Struktur der Kinase-Domäne von Stk mit α -Helices (α C-I) und β -Faltblätter (β 0-8) ist in braun dargestellt (C). In der ATP- und Substratbindetasche zwischen dem N- und C-Lobus ist die Aktivierungsschleife (gepunktet) lokalisiert. Die Abbildung wurde modifiziert aus Rakette *et al.* [67].

Der N- und C-terminale Lobus der Kinase-Domäne (Stk_{KD}) bilden gemeinsam eine katalytische Furche, in der die Phosphatübertragung auf das Substrat stattfindet (Abbildung 2C). Der N-Lobus (AS 1-90) besteht aus sechs antiparallelen β -Faltblättern, welche sich um die α C-Helix legen. Der C-Lobus (AS 91-282) ist aus sechs α -Helices und zwei kleinen β -Faltblättern aufgebaut. Die beiden Lobi sind über eine Verbindungsregion (AS 87 – 92) miteinander verbunden. Stk_{KD} weist mehrere konservierte Strukturen auf, welche wichtig für die Kinasefunktion sind: die Aktivierungsschleife, die Glycin-reiche Schleife sowie das DFG-Motiv. Die Aktivierungsschleife (AS 160 -171) ist eine flexible Region, welche für die Aktivierung der Kinase von entscheidender Bedeutung ist. Diese Schleife enthält zahlreiche Serine und Threonine, wobei insbesondere Thr₁₆₄ und Thr₁₆₆ wesentliche Phosphoakzeptoren sind. Das ATP bindet in der hydrophoben, katalytischen Tasche zwischen den beiden Lobi und wird dabei von der Glycin-reichen Schleife in ihrer Bindung stabilisiert. In der geschlossenen und somit aktiven Form positioniert

die Glycin-reiche Schleife das γ -Phosphat des ATPs für den Phosphattransfer auf das Substrat. Das DFG-Motiv (AS 151 -153) bindet Magnesiumionen, welche die Phosphate des ATPs linearisieren und somit den Phosphattransfer katalysieren [67]. Für die Aktivität der Kinase sind die ebenfalls zweiwertigen Manganionen vorteilhafter als Magnesiumionen [51, 63]. Darüber hinaus besitzen einige Helices bedeutende Funktionen in der Kinase. Die α C-Helix kontrolliert die relative Orientierung des N- und C-Lobus zueinander. In der aktivierten Kinase rotiert die Helix in die ATP-Binderegion. Die α G-Helix des C-Lobus vermittelt den intermolekularen Kontakt zwischen einer zweiten, dimerisierenden Kinase-Domäne und unterstützt somit die *Trans*-Autophosphorylierung zwischen zwei Kinase-Domänen.

Der extrazelluläre Teil der Kinase besteht aus drei PASTA-Domänen (AS 378 - 576) sowie einer noch nicht näher charakterisierten, C-terminale Subdomäne (AS 577 – 664). Die extrazellulären Domänen von Stk bilden eine Golfschläger-ähnliche Struktur [69]. Die C-terminalen Subdomäne besteht aus sechs β -Faltblättern, welche sich übereinander lagern. Sequenzanalysen dieser Subdomäne zeigen eine geringe Ähnlichkeit zu den s-Typ-Immunglobulin-Domänen, welche Zell-Zellkontakte und Zell-signale vermitteln. Außerdem werden in der Literatur Polymerisierungs- und Peptidoglycan-bindende Eigenschaften diskutiert [69].

Die PASTA-Domänen wurden erstmalig von Yeats *et al.* (2002) als β -Lactam-bindende Domänen in der mykobakteriellen STPK PknB und Penicillin-bindenden Proteinen beschrieben [70]. Die drei Domänen PASTA 1 (AS 376-440), PASTA 2 (AS 445-510) und PASTA 3 (AS 514-576) von Stk bestehen jeweils aus drei β -Faltblättern und einer α -Helix [68, 69]. Die PASTA-Domänen (Stk_{PASTA}) sind konserviert und haben untereinander eine Sequenzhomologie von 21 %, 24 % und 27 %. Die drei Stk_{PASTA} sind jeweils über ein Tetrapeptid miteinander verbunden. Diese Peptidverbindung besteht aus einem konservierten SXG-Motiv, welches im Gegensatz zu den Penicillin-bindenden Proteinen (Pbp) eine linearisierte Anordnung der PASTA-Domänen erlaubt [69].

1.5.2 Mechanismus der Stk-Aktivierung

Die bakteriellen STPKs werden durch die Bindung des entsprechenden Liganden aktiviert. Die Bindung der Liganden an die PASTA-Domänen bewirkt die Dimerisierung zweier STPKs, sodass die beiden Kinasedomänen sich gegenseitig phosphorylieren und somit aktivieren. Kristallstrukturanalysen legen nahe, dass die PASTA-Domänen zweier Stks ein X-förmiges Dimer ausbilden. Die Bindung der PASTA-Domänen an den Liganden bringt die N-Lobi der beiden Kinasedomänen in räumliche Nähe, sodass diese eine Rücken-zu-Rücken-Interaktion eingehen (Abbildung 3B) [68]. Die durch die N-Lobi vermittelte Rücken-zu-Rücken-Dimerisierung führt zu Aktivierung der einzelnen Kinasedomänen. Im inaktiven Status von Stk imitiert die nicht phosphorylierte Aktivierungsschleife ein Substrat und verhindert damit die Bindung eines möglichen Substrates (Abbildung 3A). Die Bindung von ATP im katalytischen Zentrum führt zur *Cis*-Autophosphorylierung am Thr₁₇₂ in der Aktivierungsschleife. Auf

Grundlage der Thr₁₇₂-Phosphorylierung folgt eine Konformationsänderung der Schleife, die zu einer Selbstaktivierung der Kinasedomäne von Stk führt [62]. Die aktivierte Kinasedomäne interagiert anschließend mit einer weiteren Kinasedomäne zu einem Front-zu-Front-Dimer (Abbildung 3C). Diese Dimerisierung führt zu einer zusätzlichen *Trans*-Autophosphorylierung an weiteren Serinen und Threoninen in der Aktivierungsschleife und damit zur vollständigen Aktivierung von Stk (Abbildung 3D). Aktiviertes Stk phosphoryliert als Monomer anschließend in räumlicher Nähe befindliche Substrate (Abbildung 3E). Durch die *Trans*-Autophosphorylierung können die Aminosäurereste von Ser₁₅₉, Thr₁₆₁, Ser₁₆₂, Thr₁₆₄, Thr₁₆₆ und Thr₁₇₂ in der Aktivierungsschleife phosphoryliert werden. Die *Cis*-Autophosphorylierung am Thr₁₇₂ ist essentiell für die Selbstaktivierung der Kinase, wohingegen die *Trans*-Autophosphorylierungsstellen für die optimale Aktivität der Kinase erforderlich sind. Eine Mutation von Thr₁₇₂ führt zur Inaktivierung der Kinase [62]. Die Dephosphorylierung von Stk durch Stp regeneriert die inaktive, nicht phosphorylierte Kinase (Abbildung 3F).

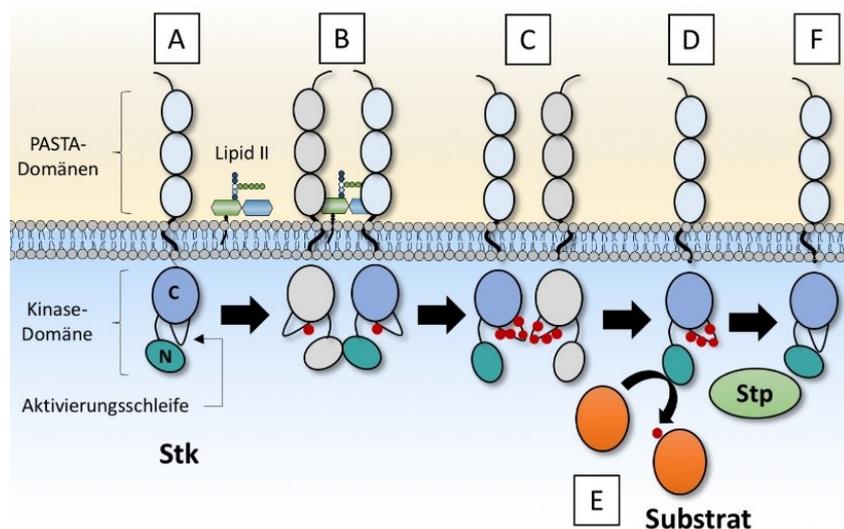


Abbildung 3: Aktivierungsmechanismus von Stk.

Im inaktiven Zustand von Stk ragt die Aktivierungsschleife in die Substratbindetasche zwischen dem N- (cyan) und C-Lobus (blau) der Kinasedomäne hinein (A). Durch Bindung des Liganden Lipid II kommt es zur Rücken-an-Rücken-Interaktion der N-Lobi von Stk und einer weiteren Stk (grau). Die Interaktion bewirkt eine *Cis*-Autophosphorylierung des Thr₁₇₂ in den Aktivierungsschleifen (roter Punkt) der Stks (B). Zwei semi-aktive Stks phosphorylieren sich anschließend gegenseitig (*Trans*-Autophosphorylierung) an Thr- oder Ser-Resten in der Aktivierungsschleife (rote Punkte) (C). Die aktive Stk phosphoryliert als Monomer anschließend das entsprechende Substrat (E). Die Phosphatase Stp dephosphoryliert das Substrat und inaktiviert Stk (F).

Die extrazellulären Liganden von Stk sind lösliche Peptidoglycan-Fragmente bzw. Lipid II-Moleküle [66]. Für PrkC von *B. subtilis* und StkP von *S. pneumoniae* wurde gezeigt, dass die PASTA-Domänen Peptidoglycan (PGN) binden können und diese Ligandenbindung die Autophosphorylierung der Kinase hervorruft [40, 71]. Die direkte Interaktion von Stk und PGN konnte mittels Kristallographie und anderen Techniken noch nicht bewiesen werden. Jedoch konnten mittels Computersimulation drei mögliche PGN-Bindestellen in den PASTA-Domänen von *S. aureus* vorhergesagt werden. Die ersten beiden PGN-Bindestellen scheinen in den Verbindungsregionen zwischen PASTA 1 und PASTA 2, bzw.

zwischen PASTA 2 und PASTA 3 zu liegen, und die Dritte befindet sich auf der Oberfläche von PASTA 3 [68]. In einer aktuellen Studie von Hardt *et al.* wurde gezeigt, dass Lipid II-Moleküle die Autophosphorylierung stimulieren können. Interessanterweise bewirkt Lipid II-Gly₅ als finales Produkt der PGN-Synthese die stärkste Aktivierung von Stk. Demzufolge ist das für Staphylokokken spezifische, extrazelluläre Lipid II der Ligand von Stk [66].

1.5.3 Aufbau von Serin/Threonin-Phosphatasen

Die Familie der bakteriellen, metallabhängigen STPPs besitzt in der katalytischen Domäne eine hohe strukturelle Gemeinsamkeit mit den eukaryotischen PP2C-Phosphatasen. Sie haben konservierte Aspartatreste, die Magnesium- oder Manganionen binden und damit entscheidend für die katalytische Aktivität der STPPs sind. Die bakteriellen STPPs und eukaryotische PP2C bestehen aus einem zentralen β -Faltblattsandwich, welches durch zwei Paare α -Helices umgeben ist. Im Zentrum des β -Faltblattsandwiches ist ein zentraler Kanal, indem die Aspartatreste die Magnesium- oder Manganionen in Position halten. Der größte strukturelle Unterschied zwischen den bakteriellen STPPs und den eukaryotischen PP2C ist eine klappenähnliche Subdomäne. Diese Klappenregion ermöglicht die Substratbindung sowie den Substratumsatz und ist maßgeblich für die Spezifität der Phosphatase verantwortlich [22]

1.5.4 Phosphoproteom von *S. aureus*

Globale Phosphoproteom-Studien für *S. aureus* COL wurden erstmals von Bäsell *et al.* im Jahre 2013 veröffentlicht. In dieser Studie wurden *S. aureus*-Lysate unter verschiedenen Stressbedingungen mittels 2D-Gel-basierter Analysen aufgetrennt und anschließend die phosphorylierten Proteine mit dem phosphosensitiven Farbstoff Pro-Q Diamond angefärbt und quantifiziert. Mit einer weiteren Technik wurden die phosphorylierten Peptide mit Titandioxid angereichert und anschließend mittels Massenspektrometrie detektiert und quantifiziert. In dieser Studie wurden 108 phosphorylierte Proteine mit 76 verschiedenen Phosphorylierungsstellen nachgewiesen, wobei die Phosphorylierungen auf 38 Serine, 19 Threonine, 11 Tyrosine und 8 Arginine verteilt waren. Eine große Gruppe der phosphorylierten Proteine bilden die Enzyme und Transporter des Energiestoffwechsels (u.a. FbaA und Tpi). Darüber hinaus wurden Phosphorylierungen an Enzyme verschiedener Aminosäuresynthesewege, Enzymen der Proteolyse (ClpX und ClpB) und an einigen Virulenz-assoziierten Proteinen (SarA, EbsS) nachgewiesen [72]. In einer weiteren Studie wurde das Phosphoproteom der Tyrosin-Phosphatase B-Mutante (Δ *ptpB*) ebenfalls im *S. aureus* COL-Stammhintergrund analysiert. Hierbei wurden in der *ptpB*-Mutante 421 Phosphorylierungsstellen in 212 Proteinen nachgewiesen, wobei 207 Phosphorylierungen auf phosphorylierte Arginine zurückzuführen waren. Im Wildtyp konnten 167 Phosphorylierungsstellen in 102 Proteinen detektiert werden. 47 % aller phosphorylierten Proteine

konnten dem Kohlenhydratstoffwechsel, der Transkription, der Proteinsynthese oder dem Energiemetabolismus zugeschrieben werden. Es wurden Arginin-Phosphorylierungen an drei wesentlichen Regulatoren der Zellphysiologie (CtsR, MgrA und SigA) gefunden, welche ihrerseits wieder Proteine regulieren, die ebenfalls wieder durch Ser/Thr/Tyr/Arg-Phosphorylierungen reguliert werden. So wurden beispielsweise Phosphorylierungen am Transkriptionsregulator SarA und Proteine des SarA-Regulons identifiziert [31]. Diese globalen Phosphoproteom-Studien zeigen, dass viele Prozesse in der Zelle durch Phosphorylierungen reguliert werden und zahlreiche Substrate von Stk und Stp noch nicht hinreichend charakterisiert sind.

1.5.5 Stk und Stp regulieren die Zellphysiologie und Virulenz in *S. aureus*

1.5.5.1 Stk und Stp regulieren den Metabolismus

Die ersten phänotypischen Beschreibungen der *stk*-, *stp*- und *stk/stp*-Mutanten wurden durch Beltramini *et al.* 2009 vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass die beiden Gene *stk* und *stp* nicht essentiell für das Überleben der Bakterienzelle sind [51]. Alle drei Mutanten zeigten ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum im LB- und TSB-Medium. Interessanterweise kann ein verringertes Wachstum der *stk*-Mutante in RPMI1640-Medium durch die Zugabe von Adenin nivelliert werden [60]. Transkriptom- und Metabolom-Analysen offenbarten eine verringerte Expression von Genen der Purin- und Pyrimidinsynthese und damit einhergehend veränderte Nukleotidkonzentrationen der *stk*-Mutante [63, 73]. Darüber hinaus phosphoryliert Stk *in vitro* die Adenylsuccinat-Synthetase PurA und inhibiert damit die PurA-Enzymaktivität [63]. Stk beeinflusst außerdem die Expression von Genen des Citratzyklus, der Glutaminsynthese und des Zellwandmetabolismus [63]. So werden einige Proteine des zentralen Stoffwechsels wie die Pyruvatdehydrogenase, Enolase, Phosphatocetyltransferase, Fruktose-Biphosphataldolase und Triosephosphatisomerase von Stk phosphoryliert [59]. Außerdem reguliert Stk durch die Phosphorylierung des Regulators CcpA den Kohlenstoffkatabolismus und die Virulenz. Aufgrund der Phosphorylierung verschlechtert sich die DNA-Bindekapazität von CcpA, sodass dessen metabolische Zielgene wie *citZ*, *pckA* und *ald* reprimiert werden. Dementgegen wird die Biofilmbildung und die α -Hämolysin-Sekretion durch phosphoryliertes CcpA gesteigert [74]. Stk hat in *S. epidermidis* ebenfalls einen großen Einfluss auf metabolische Signalwege und reguliert die Biofilmbildung und den Purin-Metabolismus [75].

1.5.5.2 Stk und Stp regulieren die Virulenz von *S. aureus*

Die *stk*-Mutante zeigt durch eine verringerte *sigB*-Aktivität eine verstärkte Expression von *hla*, *sarA*, und der RNA III des Agr-Systems sowie eine verminderte *spa*-Expression [64]. Hingegen ist die α -Hämolysin-Expression (*hla*) in der *stp*-Mutante deutlich reduziert [61]. Ein wesentlicher globaler Regulator vieler Virulenzfaktoren ist SarA. SarA und weitere Transkriptionsfaktoren der MgrA/SarA-

Familie können ebenfalls von Stk an Serinen oder Threoninen phosphoryliert werden. Interessanterweise konnte im SarA-Protein eine Stk-vermittelte Cystein-Phosphorylierung nachgewiesen werden, wobei die Phosphorylierung durch Oxidation oder Alkylierung des Cysteins blockiert werden kann [76]. In der *stp*-Mutante ist SarA durch Stk phosphoryliert und diese Phosphorylierung führt zu einer verminderten Expression von Virulenzgenen (*hla*, *agr*, *sarA*) und einer verstärkten Expression von *spa* [76, 77]. Stk phosphoryliert außerdem den Transkriptionsfaktor MgrA, was zu einer verminderten Synthese des Fluorchinolon-Transporters NorA führt [78, 79]. Eine Stk-vermittelte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors SpoVG stimuliert dessen DNA-Bindeeigenschaften, was zu einer verstärkten Expression der Zielgene (*capA*, *lip* und *nuc1*) führt [80]. Außerdem moduliert Stk das *Quorum Sensing* in *S. aureus*, indem Stk die Ribosylhomocysteinylase LuxS phosphoryliert und so die Produktion des *Autoinducer-2* unterbindet. Der *Autoinducer-2* durchdringt die bakterielle Membran und diffundiert in das Medium. Der extrazelluläre *Autoinducer-2* erlaubt somit die Kommunikation zwischen verschiedenen Bakterienspezies und koordiniert damit die Expression Virulenz-assoziiierter Gene wie beispielsweise der Kapselsynthese [81]. Genexpressionsstudien zeigen, dass Stp viele Virulenzgene wie Hämolysine, Superantigen-ähnliche Proteine und Virulenz-assoziierte PSMs (*phenol-soluble modulins*) reguliert [63, 82].

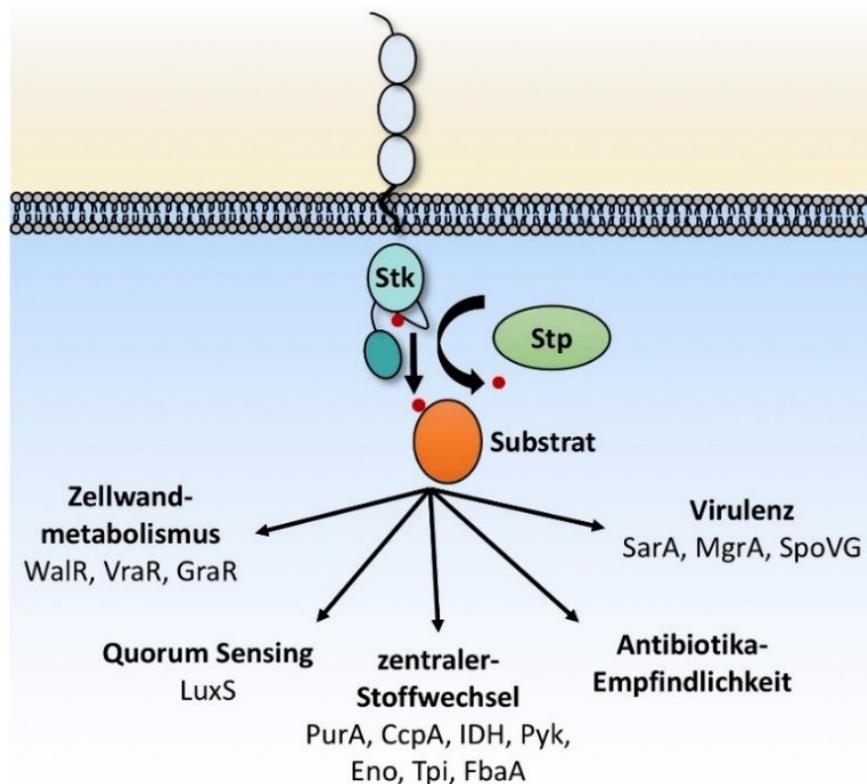


Abbildung 4: Substrate von Stk in *S. aureus*.

Die Übersicht fasst die publizierten Substrate von Stk zusammen. Diese Substrate werden von Stk phosphoryliert und möglicherweise von Stp dephosphoryliert. Substrate von Stp sind bis dato noch nicht bekannt.

Stk und Stp beeinflussen auch den Phänotyp von *S. aureus*. Vergleichende Genomanalysen zeigen, dass Mutationen in Genen des Metabolismus, der DNA-Reparatur, der Virulenz aber auch im *stk*-Gen den *Small Colony Variants*-Phänotyp von *S. aureus* hervorrufen können [83]. *Small Colony Variants* kommen in persistierenden *S. aureus*-Infektionen vor. Diese Bakterienkolonien zeichnen sich durch ein langsames Wachstum und eine hohe Stressresistenz aus. Ferner wird in der Literatur diskutiert, ob die Kinase Stk sekretiert wird und möglicherweise humane Proteine der Apoptose, der Immunantwort und des Metabolismus in der Wirtszellen phosphoryliert. Daher wäre Stk ein wichtiger Faktor für das Überleben von *S. aureus* in der Wirtszelle [84].

Die *stk*-Mutante ist im murinen Haut-Modell virulenter als der *S. aureus* USA300 Wildtyp-Stamm [64]. Auch im murinen Sepsis-Modell ist die *stk*-Mutante deutlich virulenter als der *S. aureus* Newman Wildtypstamm. Hingegen löst die *stp*-Mutante im Sepsis- und Abszess-Modell eine verringerte Interleukin-6 Produktion und weniger Entzündungen in der Niere und Leber aus, sodass die *stp*-Mutante in ihrer Virulenz attenuiert ist [61, 76]. Interessanterweise verursacht die *S. aureus* SH1000 *stk*-Mutante weniger entzündliche Läsionen und eine geringere bakterielle Last im Pyelonephritis-Modell und ist somit im Widerspruch zu anderen Studien weniger virulent als der Wildtyp [60]. In *S. epidermidis* ist Stk ein wesentlicher Faktor für die Bildung des Biofilms und folglich wichtig für die Etablierung der Infektionen an Fremdkörpern wie beispielsweise Kathetern [75]. Die meisten Studien zeigen, dass Stk ein negativer und Stp ein positiver Regulator der Virulenz in *S. aureus* ist.

1.5.5.3 *Stk und Stp beeinflussen die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika*

Der genetische Mechanismus, der zu einer reduzierten Vancomycin-Empfindlichkeit in *S. aureus* führt, ist heterogen und sehr komplex. Vergleichende genetische Untersuchungen von empfindlichen (VSSA) und intermediär-empfindlichen (VISA) klinischen *S. aureus*-Isolaten unter Vancomycin-Exposition offenbarten multiple Mutationen beispielsweise in den Genen *vraG*, *agrA* und *rpoB*. Darüber hinaus wurden auch Mutationen im *stp*-Gen entdeckt, die zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin und Daptomycin führen [55, 82, 85]. Die *stp*-Mutante weist eine Verdickung der Zellwand auf, die jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie in den VISA-Stämmen [82]. Die *stk*-Mutanten von verschiedenen *S. aureus*-Stammhintergründen sind empfindlicher gegenüber Antibiotika wie Cephalosporine, Carbapeneme und Tunicamycin [51, 63, 64] und resistenter gegenüber Fosfomycin, Norfloxacin und Ciprofloxacin [60, 79].

Seit geraumer Zeit werden Stk-Kinaseinhibitoren entwickelt, die sich mit herkömmlichen Antibiotika in einer Kombinationstherapie einsetzen lassen. Der Kinaseinhibitor Inh2-B1 bindet direkt im katalytischen Zentrum von Stk und inhibiert das Wachstum und die Biofilmbildung von MRSA-Stämmen. Im murinen Sepsis-Modell waren der Inhibitor sowie die Cephalosporine einzeln nicht in der Lage, das bakterielle Wachstum zu unterbinden, jedoch konnte mit einer Kombinationstherapie die

Infektion auch in niedrigeren Dosen bekämpft werden [86]. Es wurden außerdem Sulfonamid-Kinaseinhibitoren entwickelt, welche die Empfindlichkeit gegenüber β -Lactam-Antibiotika verbessern und in hohen Dosen nicht toxisch im Mausinfektionsmodell sind [87]. Der Phosphataseinhibitor Methylendisalicylsäure inhibiert effizient Stp und verringert somit die Virulenz von *S. aureus* [88]. Während einer viralen Influenza-Infektion ist *S. aureus* ein Hauptgrund für bakterielle Superinfektionen. Daher werden Inhibitoren entwickelt, welche die virale und bakterielle Infektion gleichzeitig bekämpfen. So ist der MEK-Kinase-Inhibitor CI-1040 insbesondere in seiner metabolisch aktiven Form (ATR-002) wirksam gegen Influenza-Viren und Staphylokokken sowie andere grampositive Bakterien. ATR-002 wirkt bakteriostatisch und reduziert das Wachstum, sowie die Stress- und Antibiotika-Toleranz der Bakterien ohne Resistenzen auszubilden. Hierbei wird das Stk/Stp-Signalsystem als mögliche Zielstrukturen des Inhibitors in Staphylokokken diskutiert [89].

1.5.5.4 *Stk und Stp regulieren die Zellwandsynthese*

Reversible Phosphorylierungen durch Stk und Stp spielen eine wichtige Rolle in der Zellwandsynthese. So besitzen die Zellen der *stp*-Mutante eine deutlich dickere Zellwand und sind resistenter gegenüber der zellwandaktiven Peptidase Lysostaphin. *stk*-, *stp*- und *stk/stp*-Mutanten weisen bemerkenswerte Zellteilungsdefekte wie multiple und unvollständige Septen, Einstülpungen der Zellwand und veränderte Zellgrößen auf [51]. Darüber hinaus konnten in den Mutanten veränderte Konzentrationen der PGN-Vorläufer nachgewiesen werden [73]. Hardt *et al.* konnten zeigen, dass Stk im Septum lokalisiert ist und Lipid II als zentraler Baustein der PGN-Synthese die Kinase Stk aktiviert [66].

Stk interagiert außerdem mit Antwortregulatoren von Zweikomponentensystemen und reguliert somit die Synthese, den Umbau und die Oberflächenladung der Zellwand. Demgemäß wird der Antwortregulator WalR des WalRK-Zweikomponentensystems *in vitro* von Stk phosphoryliert und beeinflusst somit die Expression von Zellwandhydrolasen wie *lytM*, *atlA*, *ssaA* und *isaA* [66, 86]. Der Antwortregulator GraR des GraRS-Zweikomponentensystems unterliegt Threonin-Phosphorylierungen in der DNA-Bindedomäne durch Stk. Die erhöhte GraR-Aktivität durch die Phosphorylierung führt zu einer veränderten Oberflächenladung der Zellwand durch den Einbau von zusätzlichen D-Alaninen in die Zellwandteichonsäuren [90]. Das VraTSR-Dreikomponenten-Signaltransduktionssystem reguliert die Expression des Zellwandstress-Stimulons in Abhängigkeit von zellwandaktiven Antibiotika. Stk kann VraR phosphorylieren und verringert somit die DNA-Bindungseigenschaften von VraR [91]. Neben der Phosphorylierung von Regulatoren des Zellwandmetabolismus ist Stk in der Lage, das Zellteilungsprotein FtsZ *in vitro* zu phosphorylieren [66]. Somit nehmen Stk und Stp eine wichtige Rolle in der Synchronisation der Zellwandsynthese und Zellteilung ein.

1.6 Peptidoglycan-Synthese in *S. aureus*

Die Zellwand von grampositiven Bakterien bildet die äußere Barriere der Zelle und determiniert die Stabilität und Integrität der Bakterienzelle. Sie ist wichtig für die Form und Variabilität der Zelle und schützt diese vor äußeren Stresseinwirkungen wie große Temperatur- und pH-Wert-Änderungen. Die Zellwand von grampositiven Bakterien ist 20 - 40 nm dick und besteht aus PGN, in das Proteine, Polysaccharide, Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren kovalent oder nicht-kovalent verankert sind. PGN besteht aus repetitiven Muropeptid-Einheiten, welche aus einem Disaccharid, einem Stammpeptid und einer Peptidbrücke aufgebaut sind. Das Disaccharid ist konserviert und besteht in den meisten Bakterien aus den β -1,4-verknüpften Zuckerderivaten *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc). Das Stammpeptid und die Peptidbrücke variieren zwischen den Bakterienspezies. Das Stammpeptid ist eine lineare Pentapeptidkette und besteht in *S. aureus* aus *L*-Alanin-*D*-Glutamin-*L*-Lysin-*L*-Glycin-*D*-Alanin-*D*-Alanin. Die Pentapeptidkette ist über das *L*-Alanin und der Lactyl-Gruppen der MurNAc des Disaccharides kovalent verbunden [92]. In *S. aureus* sind die PGN-Stränge mittels Pentaglycin-Brücken miteinander verbunden, sodass der hohe interne osmotische Druck der Zelle durch die starren PGN-Stränge und die flexiblen Peptidbrücken ausgeglichen wird. Die Quervernetzung der Pentaglycin-Brücken findet zwischen dem *L*-Lysin eines Stammpeptids und dem ersten *D*-Alanin eines benachbarten Stammpeptids statt. Aufgrund eines hohen Quervernetzungsgrad von bis zu 90 % erreicht die Zellwand von *S. aureus* ein hohe Festigkeit [93].

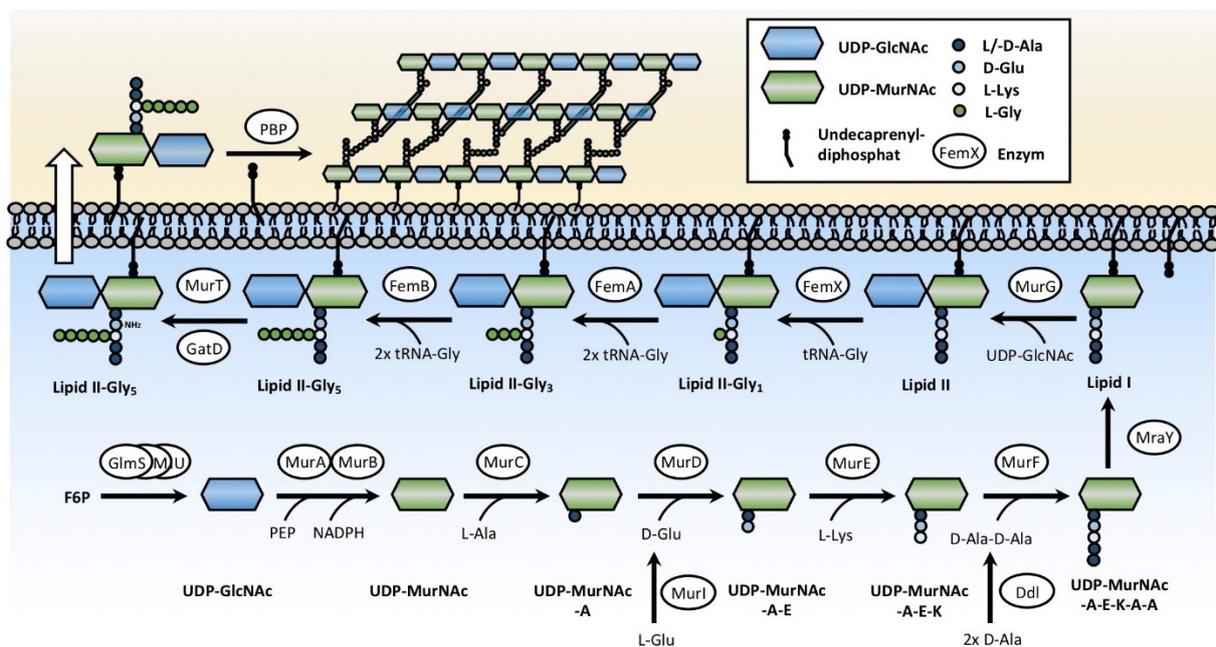


Abbildung 5: Peptidoglycan-Synthese in *S. aureus*.

Die schematische Darstellung wurde modifiziert nach Jarick *et al.* [94]. Abkürzungen: F6P... Fruktose-6-Phosphat, PEP... Phosphoenolpyruvat, NADPH... Nicotinamidadeninukleotidphosphat, UDP... Uridindiphosphat, GlcNAc... *N*-Acetylglucosamin, MurNAc... *N*-Acetylmuraminsäure, Ala/A... Alanin, Glu/E... Glutamat, Lys/K... Lysin, Gly... Glycin

Die PGN-Synthese (Abbildung 5) in *S. aureus* startet mit Glucosamin-6-Phosphat (GlcN6P). Dieser Metabolit nimmt eine entscheidende Rolle zwischen der Zellwandsynthese und Glykolyse ein. Die Aminotransferase GlmS synthetisiert GlcN6P aus dem glycolytischen Metabolit Fruktose-6-Phosphat (F6P) und Glutamin. GlcN6P wird anschließend durch die katalytische Aktivität der Phosphoglucomutase GlmM und der Uridyltransferase GlmU zu UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) weiter verarbeitet [95]. Die Umwandlung von UDP-GlcNAc zu UDP-*N*-Acetylmuraminsäure (UDP-MurNAc) erfolgt durch die Enzyme MurA und MurB. Anschließend bilden die Mur-Ligasen (MurC-F) das Stammpeptid, indem diese sequenziell die Aminosäuren *L*-Ala, *D*-Glu und *L*-Lys sowie das Dipeptid *D*-Ala-*D*-Ala an UDP-MurNAc anhängen. Die Umwandlung von *L*- in *D*-Glutamat und *L*- in *D*-Alanin erfolgt durch die Glutamat-(MurI) bzw. Alanin-Racemase (Alr). Die Ligase Ddl katalysiert die Bildung des *D*-Ala-*D*-Ala-Dipeptids, welches anschließend durch MurF an das wachsende Stammpeptid angehängt wird. Der lösliche PGN-Vorläufer UDP-MurNAc-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala (oder auch Park'sche Nukleotid) wird anschließend durch die membranständige Translokase MraY an der inneren Seite der Zellmembran verankert. Dabei bindet MraY das Park'sche Nukleotid an den Lipidanker Undecaprenyldiphosphat und produziert auf diese Weise das Lipid I (Undecaprenyldiphosphat-MurNAc-Pentapeptid). Die Membranglykosyltransferase MurG katalysiert nachfolgend die Bindung von einem UDP-GlcNAc-Molekül an das Lipid I, was wiederum zum Lipid II (Undecaprenyldiphosphat-GlcNAc-MurNAc-Pentapeptid) führt. In *S. aureus* wird das Lipid II durch das Anfügen von fünf Glycin-Molekülen durch die FemXAB-Proteine weiter modifiziert. Diese nicht-ribosomalen Peptidyltransferasen nutzen Glycyl-tRNAs für die sequenzielle Anlagerung der Glycine an das Lysin des Lipid II-Stammpeptids. FemX fügt das erste Glycin, FemA das zweite und dritte, und FemB das vierte und fünfte Glycin an das Stammpeptid heran. Gemeinsam bilden sie somit die Pentaglycinbrücke am Lipid II. Anschließend wird das Lipid II-Gly₅ mithilfe einer Flippase zur Außenseite der Zellmembran transportiert. Dort werden die Lipid II-Gly₅-Moleküle mittels Penicillin-bindenden Proteinen (Pbp) in die PGN-Ketten eingebaut [1].

1.7 Virulenzfaktoren von *S. aureus*

S. aureus kann eine Vielzahl von Virulenzfaktoren exprimieren, mit deren Hilfe das Bakterium in der Lage ist, die Immunantwort des Wirtes zu umgehen. Viele dieser Virulenzfaktoren sind in der Abbildung 6 dargestellt. Die Virulenzfaktoren können nach ihren Wirkort und Wirkmechanismus in verschiedene Klassen unterteilt werden. Zu den wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. aureus* zählen die Toxine. Sie lassen sich in drei Hauptgruppen unterteilen: (1) die Poren-formenden Toxine; (2) die exofiliativen Toxine und (3) Superantigene [96]. Zu den Poren-formenden Toxinen gehören das α -Hämolyysin (Hla, auch α -Toxin), das β -Hämolyysin (Hlb), das γ -Hämolyysin (HlgABC), die Leukozidine (LukED, LukSF oder auch PVL) und die Phenol-lösliche Moduline (PSM α 1-4, PSM β 1-2) [97]. Das α -Hämolyysin ist das am

besten charakterisierte Toxin in *S. aureus*, welches durch die Zusammenlagerung zu Homoheptameren in der Wirtsmembran eine Pore bildet, die zur nekrotischen Lyse der Wirtszelle führt [98]. Die γ -Hämolyse und Leukozidine bestehen jeweils aus zwei Komponenten. Das γ -Hämolysin besteht aus der HlgB-Komponente und jeweils einer der beiden HlgA- oder HlgC-Komponenten. Jeweils vier Komponenten des γ -Hämolysins formen ähnlich wie beim Panton-Valentine-Leukozidin LukSF eine Pore in der Wirtsmembran, welche die Wirtszelle lysiert. Das β -Hämolysin ist eine Sphingomyelinase, welches das Sphingomyelin der Wirtsmembran hydrolysiert und insbesondere bei niedrigen Temperaturen durch einen unbekanntem Mechanismus zur Lyse von Erythrozyten führt [98]. Die Phenol-löslichen Moduline sind amphiphatische Strukturen, die sich in die Wirtsmembran einlagern und sie dadurch destabilisieren. Die exofoliativen Toxine (z.B. Eta) sind sehr spezifische Serinproteasen, die Zell-Zellverbindungen der Wirtsepidermis spalten. Superantigen sind Enterotoxine wie z.B. Sea, die durch kontaminiertes Essen Durchfall und Erbrechen auslösen. Sie aktivieren eine große Anzahl an T-Zellen, was zu einer massiven Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen führt [97].

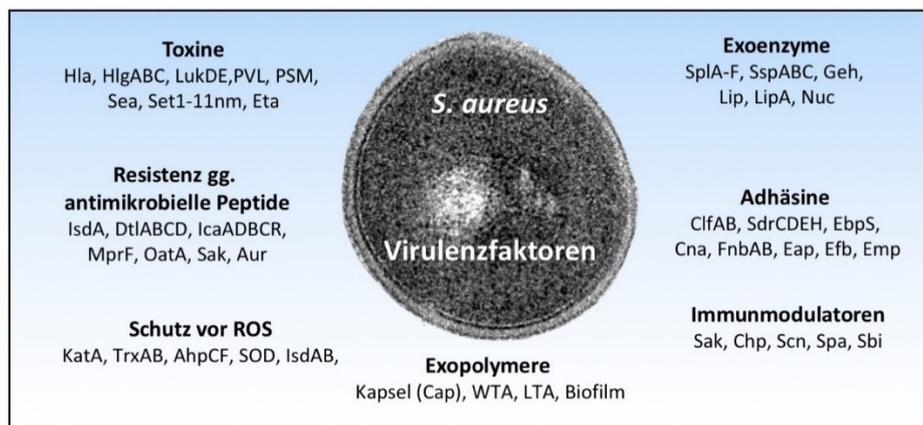


Abbildung 6: Virulenzfaktoren von *S. aureus*.

S. aureus kann eine Vielzahl von verschiedenen Virulenzfaktoren produzieren, die einen Einfluss auf die Pathogenese ausüben. AhpCF, Alkylhydroperoxid-Reduktase; Aur, Aureolysin; Chp, Chemotaxis-inhibierendes Protein; Clf, *Clumping factor*; Cna, Kollagen-Adhäsine; Coa, Koagulase; Cap, Kapsel; Eap, Extrazelluläres Adhärenzprotein; EbpS, Elastin-bindendes Protein; Efb, Extrazelluläres Fibrinogen-bindendes Protein; Eta, Exofoliativtoxin; FnbAB, Fibronectin-bindendes Protein A und B; Geh, Lipase; Hla, α -Hämolysin; HlgABC, γ -Hämolysin; Isd, Eisen-regulierendes Oberflächenprotein; Kata, Katalase; Lip, Lipase; LTA, Lipoteichonsäure; Luk, Leukozidin; MprF, Multipler Peptid-Resistenzfaktor; Nuc, Thernonuklease; OatA, O-Acetyltransferase; PSM, Phenol-lösliche Moduline; PVL, Panton-Valentine Leukozidin; ROS, Reaktive Sauerstoffspezies; Sak, Staphylokinase; Sea, Staphylokokken Enterotoxin Typ A; Set, Exotoxin; Sbi, Staphylokokken IgG-bindendes Protein; Scn, Komplementinhibitor; Sdr, Ser-Asp-reiche Fibrinogen-Sialoprotein-bindendes Protein, SOD, Superoxiddismutase; Spa, Staphylokokken Protein A; Spl, Serinprotease; SSL, Staphylokokken Superantigen-ähnliches Protein; Ssp, Serin- oder Cysteinproteasen; TrxAB, Thioredoxin; WTA, Zellwandteichonsäuren.

Für die Ausbildungen eines Biofilms exprimiert *S. aureus* eine Reihe von Adhäsionsproteinen. Die Adhäsine sind an die Zellwand gebunden und können mit der extrazellulären Matrix des Wirtes interagieren. Zu den Adhäsinen zählen die beiden *Clumping factor*-Proteine (ClfA und ClfB), die Fibronectin-bindenden Proteine (FnbA und FnbB), die Fibrinogen-bindenden Proteine (SdrCDEH, Efb), das Elastin-bindende Protein (EbpS), das Kollagen-bindende Protein Cna sowie das extrazelluläre Adhäsionsprotein Eap. Neben den Adhäsionsproteinen sind die Zellwand- und Lipoteichonsäuren

(WTA und LTA) sowie die sekretierten extrazellulären Polysaccharide (PIA) ebenfalls wichtig für die Adhäsion und die Virulenz von *S. aureus* [99]. Die Bakterien sind auch in der Lage, das Immunsystem zu modulieren, indem sie durch die Proteine Spa und Sbi Antikörper binden und somit B-Zellen zur Apoptose anregen. In *S. aureus* regulieren zahlreiche Regulatoren wie AgrCA, SarA/Z, MgrA, SigB, Rot, ArlRS, SaeRS, SigB und SpoVG die Expression der Toxine, Adhäsine, Immunmodulatoren und anderer Virulenzfaktoren. Diese Virulenzregulatoren interagieren miteinander abhängig von inneren und äußeren Einflüssen in einem hierarchischen Prinzip und wirken so synergistisch oder antagonistisch auf die Expression der Virulenzfaktoren. An dieser Stelle sei auf verschiedene Übersichtsartikel verwiesen, die einen tieferen Einblick über die Virulenzfaktoren und die Regulation der Virulenzfaktoren von *S. aureus* vermitteln [98, 100, 101].

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war eine umfassende Charakterisierung der STPK Stk und der STPP Stp in *S. aureus*. In erster Linie sollten neue Interaktionspartner von Stk und Stp identifiziert und deren Zusammenwirken charakterisiert werden. Dazu sollte ein spezifischer, monoklonaler α Stk-Antikörper hergestellt werden, mit dem anschließend Lokalisations- und Interaktionsstudien durchgeführt wurden. Darüber hinaus sollte der Einfluss von Stk und Stp auf die Zellwandsynthese untersucht werden. Hierbei sollte durch die Anwendung verschiedener Techniken der auffällige Zellwandphänotyp der *stp*-Mutante aufgeklärt werden. Zudem sollten die *stk*-, *stp*- und *stk/stp*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mit verschiedenen *Omics*-Technologien analysiert werden. Dabei sollten vergleichende Analysen des Transkriptoms, Proteoms, Sekretoms und Metaboloms durchgeführt und die auffälligen Unterschiede der Mutanten herausgearbeitet werden.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen ABgene, BioRad, Greiner, BioOne, Peqlab, Promega, Macherey-Nagel, Millipore, MP Biomedicals, Sarstedt geliefert. Die benötigten Antibiotika, Enzyme, Chemikalien und Nährstoffe wurden von den Firmen AppliChem, BioRad, GE Healthcare, Invitrogen, MBI-Fermentas, Merck, New England Biolabs, Oxoid, Peqlab, Promega, Qiagen, Roche, Roth, Sigma und Stratagene bezogen.

2.2 Kits

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Kit	Anbieter
<i>NucleoSpin® Plasmid</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>RNAProtect Bacteria Reagent</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Protino® Protein Purification System</i>	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
<i>pGEM-T® Vektor System</i>	Promega, Mannheim, Deutschland
<i>NucleoBond Xtra Midi Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up</i>	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
<i>DNeasy® Blood and Tissue Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Quick Ligation™ Kit</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
<i>T4 DNA Ligase Kit</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

2.3 Medien

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Medien.

Medien	Komponenten [Menge/Liter]
LB-Medium (<i>Luria-Bertani</i>)	10 g Trypton/Pepton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl
TSB-Medium	30 g <i>Trypticase Soy Broth</i> (BD, Heidelberg und HiMedia, Indien)
MH-Medium	23 g Müller-Hinton-Medium (Roth)
BHI-Medium	37 g Brain-Heart-Infusion (Oxoid)
Blutagarplatten	LB-Medium mit 5% Schafblut 15 g Agar
B2H-Indikatorplatten	LB-Medium 0,5 mM IPTG 40 µg/ml X-Gal 100 µg/ml Ampicillin und Streptomycin 50 µg/ml Kanamycin 15 g Agar

2.4 Antibiotika

Alle Antibiotika wurden entsprechend den Angaben gelöst, steril filtriert und nach Abkühlen des Mediums (ca. 50 °C) zugegeben. Die Lagerung der gelösten Substanzen erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Stocklösung (1000-fach)	Anbieter/Quelle
Ampicillin	100 mg/ml in dH2O	Carl Roth GmbH
Bacitracin	50 mg/ml in dH2O	Sigma BO125
Daptomycin	50 mg/ml in dH2O	AG Ziebuhr
D-Cycloserin	50 mg/ml in dH2O	Sigma 30020
Erythromycin	100 mg/ml in 70 % Ethanol	Carl Roth GmbH
Fosfomycin	10 mg/ml in dH2O	Sigma P5396
Gentamicin	10 mg/ml in dH2O	Sigma G1914
Kanamycin	50 mg/ml in dH2O	Carl Roth GmbH
Methicillin	10 mg/ml in dH2O	Sigma M6535
Nisin	50 mg/ml in dH2O	Sigma N5764
Penicillin G	10 mg/ml in dH2O	Sigma PEN-K
Ramoplanin	10 mg/ml in dH2O	Sigma R1781
Streptomycin	100 mg/ml in dH2O	Carl Roth GmbH
Tunicamycin	10 mg/ml in DMSO	Sigma T7765
Vancomycin	50 mg/ml in dH2O	Sigma V-2002

2.5 Puffer und Lösungen

Bei der Verwendung von Kits oder für enzymatische Reaktion wurden die mitgelieferten Puffer nach Herstellerangaben verwendet. Die Puffer wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert oder steril filtriert. Mehrfach verwendete Puffer und Lösungen sind in der Tabelle 5 zusammengefasst. Puffer und Lösungen, die speziell für eine Methode hergestellt wurden, sind bei der jeweiligen Methode aufgeführt.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen	Komponenten
TBS-Puffer	20 mM TRIS-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl
TBS-Tween-Puffer (TBS-T)	TBS + 0,05% Tween20
PBS-Puffer	0,2 g/l KCl 0,24 g/l K ₂ HPO ₄ 8 g/l NaCl 1,42 g/l Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) pH 7,4

2.6 Bakterienstämme

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F-, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-, mk-), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ , Δ (<i>argF-lac</i>)U169, Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	MBI Fermentas
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)	Merck Biosciences
<i>E. coli</i> DC10B	ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> Δ <i>dcm</i>	Monk et al. (2012) [102]
<i>E. coli</i> BTH101	F-, <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> (<i>Str r</i>), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	Euromedex
<i>S. aureus</i> NewmanHG	<i>S. aureus</i> Newman, <i>saeS+</i> , auch NewHG bezeichnet	Mainiero et al. (2010) [103]
<i>S. aureus</i> NewmanHG Δ <i>stk</i>	NewmanHG mit <i>stk</i> Deletion, <i>stk::ermB</i> , Erm ^R	S. Donat [94]
<i>S. aureus</i> NewmanHG Δ <i>stp</i>	NewmanHG mit <i>stp</i> Deletion, <i>stp::ermB</i> , Erm ^R	S. Donat [94]
<i>S. aureus</i> NewmanHG Δ <i>stk</i> Δ <i>stp</i>	NewmanHG mit <i>stk/stp</i> Deletion, <i>stk/stp::ermB</i> , Erm ^R	S. Donat [94]
<i>S. aureus</i> HG003	NCTC 8325 mit <i>rsbU</i> ⁺ ; <i>tcaR</i> ⁺	S. Donat
<i>S. aureus</i> HG003 Δ <i>stk</i>	HG003 mit <i>stk</i> Deletion, <i>stk::ermB</i> , Erm ^R	S. Donat
<i>S. aureus</i> HG003 Δ <i>stp</i>	HG003 mit <i>stp</i> Deletion, <i>stp::ermB</i> , Erm ^R	S. Donat
<i>S. aureus</i> HG003 Δ <i>stk</i> Δ <i>stp</i>	HG003 mit <i>stk/stp</i> Deletion, <i>stk/stp::ermB</i> , Erm ^R	S. Donat
<i>S. aureus</i> 8325	NTCT 8325, 11 bp Deletion in <i>rsbU</i>	Laborstammsammlung
<i>S. aureus</i> 8325 Δ <i>stk</i>	8325 mit <i>stk</i> Deletion, <i>stk::ermB</i> , Erm ^R	Streker, Dissertation (2005)
<i>S. aureus</i> 8325 Δ <i>stp</i>	8325 mit <i>stp</i> Deletion, <i>stp::ermB</i> , Erm ^R	Donat, Dissertation (2009)
<i>S. aureus</i> 8325 Δ <i>stk</i> Δ <i>stp</i>	8325 mit <i>stk/stp</i> Deletion, <i>stk/stp::ermB</i> , Erm ^R	Donat, Dissertation (2009)
<i>S. aureus</i> NewmanHG Δ <i>spa</i>	NewmanHG mit <i>spa</i> Deletion, Spec ^R	Laborstammsammlung
<i>S. aureus</i> NewmanHG Δ <i>spa</i> Δ <i>stk</i>	NewmanHG Δ <i>spa</i> mit <i>stk</i> Deletion, <i>stk::ermB</i> , Erm ^R Achtung: nur verkürztes <i>agrC</i> , da Stop-Codon im Gen	M. Selle (2014)
<i>S. aureus</i> NewmanHG Δ <i>spa</i> Δ <i>stp</i>	NewmanHG Δ <i>spa</i> mit <i>stp</i> Deletion, <i>stp::ermB</i> , Erm ^R	M. Selle (2014)
<i>S. aureus</i> NewmanHG Δ <i>spa</i> Δ <i>stk</i> Δ <i>stp</i>	NewmanHG Δ <i>spa</i> mit <i>stk/stp</i> Deletion, <i>stk/stp::ermB</i> , Erm ^R	M. Selle (2014)

2.7 Oligonukleotide

Die allgemeinen Oligonukleotide für die Klonierung der Fusionsproteine sind in der Tabelle 7 aufgeführt. Die zahlreichen Oligonukleotide für die Klonierung der B2H-Vektoren sind in der Tabelle 30 im Anhang gelistet.

Tabelle 7: Allgemein verwendete Oligonukleotide.

In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide mit deren Sequenz und ggf. mit Restriktionsschnittstellen.

Oligonukleotide	Sequenz	Enzym/Verwendung
pET_KD_fw	ATATTGGATCCataggtaaaataataatgaacg	BamHI
pET_KD_rev	ATATTCTCGAGTTAaccgctatcgttttc	EcoRI
pET FemX_fw	ATATGAATTCgaaaagatgcatatcactaatca	EcoRI
pET FemX_rev	TATACTCGAGctattttcgttttaatttacagatat	XhoI
pET FemA_fw	ATATGGATCCAagtttacaatttaacagctaaagag	BamHI
pET FemA_rev	TATACTCGAGctaaaaattctgtctttaacttttttaa	XhoI

Oligonukleotide	Sequenz	Enzym/Verwendung
pET FemB_fw	ATATGGATCCaaatttacagagttaactgttaccg	BamHI
pET FemB_rev	TATACTCGAGctatttcttaatttttacgtaatttctc	XhoI
FemX_T32A_fw	aacgaaatgggcagaagcaaagaaa	Nukleotidaustausch
FemX_T32A_rev	accatccagttaatttcttctgctctgc	Nukleotidaustausch
FemX_T36A_fw	ggcagaacaaagaaattagctggatg	Nukleotidaustausch
FemX_T36A_rev	gcgctaccatccagctaatttc	Nukleotidaustausch
FemX_T32+36A_fw	gggcagaagcaaagaaattagctggatg	Nukleotidaustausch
FemX_T32+36A_rev	gcgtaccatccagctaatttcttctctc	Nukleotidaustausch
T7_fw	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
T7_terminal_rev	GCTAGTTATTGCTCAGCG	Sequenzierung

2.8 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur Herstellung von Fusionsproteinen sind in der Tabelle 8 aufgeführt. Aufgrund der Vielzahl wurden die B2H-Plasmide in der Tabelle 31 im Anhang gelistet.

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendet Plasmide.

Plasmide	Eigenschaft	Anbieter/Quelle
pGEM-T	Amp ^R	Promega
pET-28a (+)	His ₆ Expressionsvektor, Kan ^R	Novagen
pET-28a-Stk _{KD}	His ₆ -Stk ₁₋₂₉₁ , kloniert in pET28a, Kan ^R	diese Arbeit
pET-28a-Stk (PknB)	His ₆ -Stk, kloniert in pET28a, Kan ^R	Donat, 2013
pET-28a-Stk _{T164A}	His ₆ -Stk _{T164A} , phospho-ablative Substitution von Thr ₁₆₄ zu Ala, kloniert in pET28a, Kan ^R	diese Arbeit
pET-28a-Stk _{T166A}	His ₆ -Stk _{T166A} , phospho-ablative Substitution von Thr ₁₆₆ zu Ala, kloniert in pET28a, Kan ^R	diese Arbeit
pET-28a-Stk _{T164A/T166A}	His ₆ -Stk _{T164A/T166A} , phospho-ablative Substitution von Thr ₁₆₄ & Thr ₁₆₆ zu Ala, kloniert in pET28a, Kan ^R	diese Arbeit
pET-28a-Stp	His ₆ -Stp, kloniert in pET28a, Kan ^R	Donat, 2013
pET-28a-CitC	His ₆ -CitC, kloniert in pET28a, Kan ^R	Donat, 2013
pET-28a-WalR	His ₆ -WalR, kloniert in pET28a, Kan ^R	Donat, 2013
pET-28a-FemX	His ₆ -FemX, kloniert in pET28a, Kan ^R	diese Arbeit
pET-28a-FemA	His ₆ -FemA, kloniert in pET28a, Kan ^R	diese Arbeit
pET-28a-FemB	His ₆ -FemB, kloniert in pET28a, Kan ^R	diese Arbeit
pET-28a-FemX _{T32A}	His ₆ -FemX mit Substitution von Thr ₃₂ zu Ala, kloniert in pET28a, Kan ^R	diese Arbeit
pET-28a-FemX _{T36A}	His ₆ -FemX mit Substitution von Thr ₃₆ zu Ala, kloniert in pET28a, Kan ^R	diese Arbeit
pET-28a-FemX _{T32A/T36A}	His ₆ -FemX mit Substitution von Thr ₃₂ & Thr ₃₆ zu Ala, kloniert in pET28a, Kan ^R	diese Arbeit

2.9 Antikörper

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Antikörper	Hersteller/Quelle
α Maus-Antikörper-HPR (polyklonal, Ziege)	Sigma A5278
α Hase-Antikörper-HPR (polyklonal, Ziege)	SAB, L3012-2
α Stk (monoklonal, Klon 14-5-4)	diese Arbeit, BioGenes GmbH, Berlin
α Stk _{KD} (monoklonal, Klon 10-3-4)	diese Arbeit, BioGenes GmbH, Berlin
α Stp (polyklonal, Maus)	Donat S., 2013
α FemX 1-3 (polyklonal, Maus)	diese Arbeit
α FemA 1-3 (polyklonal, Maus)	diese Arbeit
α FemB 1-3 (polyklonal, Maus)	diese Arbeit
α Phospho-Threonin (α P-Thr, polyklonal, Hase)	Cell Signaling, #9381S

2.10 Geräte

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Geräte	Firma
<i>TECAN Infinite F200 Pro</i>	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
<i>ARRAMATE</i>	Alere, Jena
<i>Thermocycler</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ultraschallgerät Sonifier 250 D	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
<i>SpeedVac™ Concentrator SC250EXP</i>	Thermo Fisher, Darmstadt
NanoDrop®-Spektralphotometer	Thermo Fisher, Darmstadt
<i>FastPrep®-Kugelmühle</i>	MB Biomedicals, Eschwege

2.11 Software

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Software.

Software	Firma
CLC Main Workbench und Sequence Viewer	CLC bio, Aarhus, Dänemark
EndNote X7	Thomson Reuters, New York City, USA
Office 2013	Microsoft, München
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA

2.12 Datenbanken

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Datenbanken.

Datenbank	Link
AureoWiki [104]	http://aureowiki.med.uni-greifswald.de/Main_Page
NCBI PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
UniProt	https://www.uniprot.org/
KEGG	https://www.genome.jp/kegg/
Microbes Online	http://www.microbesonline.org/
SignalP 4.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/

3 Methoden

3.1 Anzucht und Stammhaltung

Im Allgemeinen wurden *E. coli*-Stämme in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Die Anzucht der *S. aureus*-Stämme erfolgte hingegen in TSB-Medium und auf TSB-Platten. Für MHK-Bestimmungen wurde das Müller-Hinton-Medium verwendet. Dem Medium wurde bedarfsgerecht entsprechende Antibiotika (Tabelle 4) zugesetzt. Die Anzucht von Bakterien erfolgte als Flüssigkulturen im Schüttler je nach Anwendung bei 37 °C, 30 °C oder 18 °C. Für die Langzeitlagerung von Bakterienstämmen wurden die Bakterien über Nacht in Flüssigkulturen angezogen, mit sterilen Glycerin versetzt (Endkonzentration: 25 %) und bei -80 °C gelagert.

3.2 Arbeiten mit DNA

3.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. aureus*

Für die Isolierung chromosomaler Staphylokokken-DNA wurden die *S. aureus*-Kultur in LB-Medium mit 1 % Glycerin über Nacht bei 37 °C inkubiert. 2 ml der Kultur wurden pelletiert (2 min, 16.000 g, RT) und das Zellpellet in 1 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl 10 mM TRIS-HCl (pH 7,5) mit 25 % Saccharose resuspendiert und mit 15 µl 0,5 M EDTA (pH 8) versetzt. Nach Zugabe von 10 µl Lysostaphin (2 mg/ml) wurde die Suspension für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Suspension mit 375 µl TE-Puffer, 225 µl 10 % SDS und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 55 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 150 µl 5 M Natriumperchlorat und 450 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt und für 1,5 h bei RT geschüttelt. Die Probe wurde anschließend so lange zentrifugiert (10 min, 16.000 g, RT), bis der Überstand klar war. Der Überstand wurde mit dem doppelten Volumen 100 % Ethanol versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde pelletiert (10 min, 16.000 g, RT) und mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde nach einer einstündigen Trocknung bei RT in 50 µl ddH₂O aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

TE-Puffer	10 mM TRIS-HCl pH 7,5
	1 mM EDTA (pH 8)

3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

3.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Die *E. coli*-Kultur wurde über Nacht unter Selektionsdruck des jeweiligen Antibiotikums in 3 ml LB-Medium kultiviert. 2 ml der Übernachtskultur wurden pelletiert (10 min, 16.000 g, RT). Das Zellpellet wurde in 150 µl Puffer 1 resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Puffer 2 hinzugegeben, kurz geschwenkt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 150 µl Puffer 3 dazugegeben, invertiert und ebenfalls für 5 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde anschließend zentrifugiert (10 min, 16.000 g, RT) und die Plasmid-DNA im Überstand mit 315 µl Isopropanol gefällt. Die Plasmid-DNA wurde pelletiert (15 min, 16.000 g, RT) und anschließend mit 500 µl 70%igen Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend bei RT getrocknet und in 50 µl dH₂O aufgenommen.

Puffer 1	20 mM TRIS-HCl (pH 7,5) 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,1 mg/ml RNase A
Puffer 2	0,2 N Natriumhydroxid 1 % SDS
Puffer 3	3 M Natriumacetat (pH 4,8)

3.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Plasmid Kits

Bei einer großen Probenzahl wurden die Plasmide mittels *NucleoSpin*[®]-Plasmid-Isolationskit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert. Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte die Plasmid-Isolierung mithilfe des *NucleoBond*[®] *Midi* Kits (Macherey-Nagel) aus bis zu 200 ml Übernachtskultur.

3.2.3 Bakterienlysate für die Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine schnelle, PCR-basierte Methode zum Nachweis von DNA-Fragmenten in einer hohen Anzahl von zu testenden Kolonien. Diese Methode eignet sich insbesondere Transformanten auf das Vorhandensein von DNA-Fragmenten zu überprüfen. Hierbei wird als DNA-Vorlage keine gereinigte Plasmid-DNA oder chromosomale DNA verwendet, sondern die DNA direkt aus den Bakterienkolonien gewonnen. Dazu wurde die Kolonie in 50 µl ddH₂O resuspendiert und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurden die Zellbruchstücke pelletiert (5 min 16.000 g, RT) und 10 µl des DNA-haltigen Überstandes als Amplifikationsmatrize für die PCR eingesetzt.

3.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die DNA- oder RNA-Konzentration der Probe wurde anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{600}) am NanoDrop®-Spektralphotometer bestimmt.

3.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion dient der *in vitro* DNA-Amplifikation, wobei eine bestimmte DNA-Sequenz durch die zielgerichtete Auswahl an Oligonukleotiden (*Primer*) und einer DNA-Polymerase vervielfacht werden kann. Die PCR ist ein temperaturabhängiger, zyklischer Prozess bei dem die Konzentration an amplifizierter DNA exponentiell ansteigt. Die PCR wird im *Thermocycler* durchgeführt und jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

- 1) initialen Denaturierung der Ausgangs-DNA (2-5 min, 94-98 °C)
- 2) 30-40 Zyklen bestehend aus
 - a) Denaturierung (30 s, 94-98 °C)
 - b) Anlagerung (*Annealing*) der Oligonukleotide (30 s, 50-65 °C)
 - c) Elongation (15 s – 3 min, 68-72 °C)
- 3) Elongation (5 min, 68-72 °C)

In dieser Arbeit wurde die PCR angewendet, um...

- um für Klonierungen und Sequenzierungen spezifische DNA-Abschnitte aus chromosomaler- oder Plasmid-DNA zu amplifizieren
- spezifische DNA-Abschnitte aus chromosomaler- oder Plasmid-DNA nachzuweisen
- einzelne Basenpaare in Plasmiden zu substituieren.

Für Standard-PCRs zum Nachweis von DNA wurde die *GoTaq® Flexi* DNA Polymerase (Promega) verwendet. Die *Phusion®* DNA-Polymerase (NEB) mit einer Korrekturlesefunktion wurde für DNA-Sequenzen verwendet, welche korrekt amplifiziert werden sollten. Die Polymerasen wurden mit ihren entsprechenden Puffern nach Herstellerangaben verwendet. Des Weiteren wurde der PCR-Reaktion 0,2 mM Desoxynukleotide (dNTPs) und 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide hinzugefügt. Als Amplifikationsmatrize diente chromosomale DNA, Plasmid-DNA oder der Überstand der Bakterienlysate (Kolonie-PCR). Alle Komponenten wurden in einem finalen Volumen von 20 bis 100 µl PCR-Ansatz zusammengefügt.

3.2.6 Horizontale Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA ihrer Länge nach. Dem 1 - 2%igen TAE-Agarosegel wurde zur DNA-Detektion der Fluoreszenzfarbstoff *HD-Green™* (Intas) zugesetzt. Die DNA-Probe wurde mit DNA-Ladepuffer (NEB) versetzt und im Agarosegel für 30 – 60 min bei 120 V in

TAE-Puffer aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht in einem Geldokumentationssystem fotografiert und ausgewertet.

TAE-Laufpuffer	40 mM TRIS-HCl
	40 mM Essigsäure
	1 mM EDTA pH 8,0

3.2.7 Aufreinigung von DNA

Zur Entfernung von Verunreinigungen der DNA mit Oligonukleotiden, Enzymen und Salzen wurde das *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* (Marcherey-Nagel) verwendet. Die PCR-Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 10 – 20 µl DNase-freien Wasser eluiert.

3.2.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen wurden ebenfalls das *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* (Marcherey-Nagel) verwendet. Dafür wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht ausgeschnitten und gewogen. Anschließend wurde zum Gelstück das doppelte Volumen an NTI-Puffer hinzugeben und so lange bei 50 °C inkubiert, bis das Gelstück sich komplett aufgelöst hatte. Anschließend erfolgte die Aufreinigung nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 10 – 20 µl DNase-freien Wasser eluiert.

3.2.9 Restriktionsspaltung von DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgte mithilfe von Restriktionsendonukleasen durch enzymatische Hydrolyse. Es wurden 1 – 10 µg DNA mit 1 µl Enzym in einem vom Hersteller empfohlenen Puffer hinzugegeben und für 1 h bei der empfohlenen Temperatur inkubiert. Die gespaltene DNA wurde entweder direkt mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* (Marcherey-Nagel) aufgereinigt, oder vorher im Agarosegel aufgetrennt und anschließend das DNA-Fragment aus dem Gel extrahiert und mit dem Kit aufgereinigt.

3.2.10 Ligation von DNA

3.2.10.1 Ligation in pGEM®-T

Das pGEM-T® Vektorsystem (Promega) ist ein sehr effizientes System für die Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor mit hoher Kopienzahl. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit der *GoTaq®* DNA-Polymerase (Promega) und 2 mM dATPs im geeigneten Puffer für 20 min bei 68 °C polyadenyliert. Die adenylierten PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt und deren DNA-Konzentration bestimmt. 150 ng der aufgereinigten PCR-Produkte wurden anschließend nach Herstellerangaben in den pGEM-T®-Vektor ligiert und anschließend in *E. coli* DH5α oder *E. coli* DC10B transformiert.

3.2.10.2 Ligation mit T4-Ligase

Der Zielvektor und das gewünschte DNA-Fragment wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten, um kompatible Enden an Vektor und DNA-Fragment zu erzeugen. 50 ng geschnittener Vektor und 150 ng des DNA-Fragments wurden entweder für 5 min mit dem *Quick Ligation*TM Kit (NEB) oder über Nacht mit dem T4 DNA Ligase Kit (NEB) nach Herstellerangaben ligiert. Ein Teil des Ligationsansatzes wurde anschließend in die Zielzellen transformiert.

3.2.11 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

49 ml LB-Medium wurden mit 1 ml *E. coli*- Übernachtskultur beimpft und anschließend bis zur OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend wurden die Zellen pelletiert (10 min, 3.000 g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 25 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 2,5 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15 % Glycerin resuspendiert und in Aliquote bei -80 °C gelagert.

3.2.12 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid-DNA (z.B. pET28a) mit 50 µl der kompetenten *E. coli*-Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 s bei 42 °C wurden die Zellen mit 950 µl vorgewärmtem LB-Medium gemischt und für mindestens 1 h bei 37 °C geschüttelt. 100 µl der Zellsuspension der Plasmid-Transformation wurden direkt auf der Selektionsplatte mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die restliche Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (2 min, 2000 g, RT) und 800 µl des Überstands verworfen. In der verbliebenden Flüssigkeit wurden die Bakterien resuspendiert und auf einer weiteren Selektionsplatte ausplattiert.

3.2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA und der PCR-Produkte erfolgte durch die Firma *Microsynth Seqlab* (Göttingen). 1,2 µg Plasmid-DNA oder 90 – 150 ng PCR-Produkt wurden mit 30 pmol des entsprechenden Oligonukleotids versetzt. Das Volumen wurde mit ddH₂O auf 15 µl eingestellt und an die Firma gesandt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung monoklonaler Stk-Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mithilfe der Firma BioGenes GmbH (Berlin) monoklonale Stk-Antikörper (α Stk) hergestellt, welche als wichtiges Werkzeug für Western Blots oder Immunpräzipitationen dienen. Dazu wurden der Firma 2 ml gereinigtes Stk_{His6} (1,34 mg/ml) und 1 ml gereinigtes CitC_{His6} (0,4 mg/ml) als Spezifitätskontrolle zur Verfügung gestellt. Für eine detaillierte methodische Beschreibung der Hybridom- und Antikörpergenerierung durch die Firma wird auf deren Abschlussbericht (42354_IsaC_Abschlussbericht vom 21.10.2014) verwiesen.

Im folgenden Abschnitt werden die grundlegenden Schritte der Hybridom-Generierung und der Antikörpergewinnung behandelt. Fünf Mäuse wurden mit dem gereinigten Protein Stk_{His6} intraperitoneale immunisiert. Zur Überprüfung einer spezifischen Immunantwort gegen das Antigen Stk_{His6} wurden die Antiseren mit einem ELISA (*enzyme-linked immunosorbant assay*) getestet. Die murinen Milzzellen wurden anschließend mit Myelomzellen unter Einsatz von Polyethylenglykol fusioniert und die generierten Hybridome in Zellkulturplatten kultiviert. Ein ELISA diente zum IgG-Nachweis und zum Screening der Zellkulturüberstände. Antikörper-produzierende Hybridome wurden selektiert und mittels limitierter Verdünnung kloniert, um Antikörper-produzierenden Zellen von den nicht produzierenden Zellen zu trennen. Fünf Primärkulturen ergaben nach der ersten Klonierung Subklone, welche weiter Antikörper gegen Stk_{His6} produzierten. Diese Klone wurden einer zweiten Klonierung unterzogen und deren Zellkulturüberstände zu Testzwecken an uns gesandt. Diese Zellkulturüberstände wurden in unseren Labor mittels Dot Blot, Western Blot und ELISA auf ihre Spezifität gegenüber Stk getestet. Die Klone wurden anschließend von der Firma kryokonserviert und mit den entsprechenden Zellkulturüberständen (10 ml) an uns gesandt.

3.3.2 Herstellung von *E. coli*- und *S. aureus*-Lysaten

Für die Herstellung von *E. coli*-Proteinproben wurden die Bakterien in LB-Medium über Nacht im Schüttler bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte (OD₆₀₀) der Kultur bestimmt. 2 OD₆₀₀-Einheiten der Kultur wurden pelletiert (5 min, 8.000 g, RT) und der Überstand sorgfältig abgenommen. Das Zellpellet wurde anschließend in 100 μ l *E. coli*-Lysepuffer resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dem Lysat wurden 20 μ l 5x SDS-Ladepuffer hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 10 min bei 95 °C inkubiert und nach der Abkühlung auf Eis bei -20 °C eingefroren.

Für die Gewinnung der *S. aureus*-Proteinproben wurden die Bakterien in TSB-Medium bis zur gewünschten Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ der Kultur bestimmt. 20 OD-Einheiten der Kultur wurden pelletiert (5 min, 8.000 g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Gewicht

des Zellpellet wurde an einer Feinwaage bestimmt. Das Zellpellet wurde mit Zellysepuffer resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Das Volumen des Zellysepuffers entsprach dabei dem doppelten Gewicht des Zellpellet. Anschließend wurde die Probe mit Silikatkügelchen versetzt und dreimal für 45 s bei 6,5 m/s mithilfe der *FastPrep*[®]-Kugelmühle lysiert. Die Probe wurde zentrifugiert (10 min, 12 000 g, 4 °C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Zellpellet wurde erneut mit dem Zellysepuffer versetzt und zweimal mit der Kugelmühle lysiert. Das Lysat wurde mit dem gleichen Volumen an Zellysepuffer inklusive 2 % Dodecyl- β -D-Maltopyranosid (DDM) zugesetzt und für 10 min bei 4 °C auf dem Rollschüttler inkubiert. Die Probe wurde anschließend zentrifugiert und der Überstand in das Reaktionsgefäß überführt. Die Probe im Reaktionsgefäß wurde erneut zentrifugiert (20 min, 12.000 g, 4 °C) und der Überstand als Zellysyt bei -20 °C eingefroren.

<i>E. coli</i> -Lysepuffer	10 μ g/ml Lysozym 2 U/ μ l DNase 10 mM TRIS-HCl pH 7,5 0,9 % NaCl
Zellysepuffer	20 mM HEPES 150 mM NaCl 110 mM NaAcetat 2 mM MgCl ₂ 10 μ g/ml Lysostaphin 2,5 μ g/ml DNase 1 % Phosphatase-Inhibitor 1 % Calbiochem Protease-Inhibitor Cocktail Set 1
5x Ladepuffer	1,25 M TRIS-HCl pH 6,8 10 % SDS 50 % Glycerol 10 % Mercaptoethanol
100x Phosphatase-Inhibitor III	250 mM NaF 5 mM NaOrthovanadat 50 mM NaPyrrophosphat 50 mM β -Glycerolphosphat

3.3.3 Zellfraktionierung aus *S. aureus* Gesamtzelllysyt

Um die zellulären Fraktionen von *S. aureus* NewmanHG wt, Δ stk, Δ stp und Δ stk Δ stp zu isolieren, wurden die Zellfraktionierung nach Smith *et al.* angewandt [105]. Übernachtskulturen der Stämme wurden in 200 ml TSB-Medium auf OD₆₀₀ 0,05 verdünnt und bei 37 °C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 2 inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (10 min, 8.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert und das Zellpellet mit 5 ml eiskalten PBS

gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 2 ml Proteoplast-Puffer resuspendiert und 100 µl der Probe als Gesamtzelllysat bei -20 °C eingefroren. Zur restlichen Probe wurden 100 µg/ml Lysostaphin hinzugegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Probe wurde anschließend zentrifugiert (15 min, 6.000 g, 4 °C) und der Überstand als Zellwandfraktion bei -20 °C eingefroren. Das Proteoplast-Pellet wurde mit 2,5 ml Proteoplast-Puffer gewaschen und anschließend in 2,5 ml 50 mM TRIS-HCl (pH 7,5) resuspendiert und fünfmal für 30 s bei maximaler Energie mit der Ultraschallsonde behandelt. Dabei wurde die Probe stets auf Eis gekühlt. Das Proteoplast-Lysat wurde mit der Ultrazentrifuge zentrifugiert (1 h, 40.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde in 120 µl 50 mM TRIS-HCl (pH 7,5) resuspendiert und als Membranfraktion bei -20 °C eingefroren. Der Überstand wurde mit 3 ml TRIS-HCl (pH 7,5) verdünnt und bis zur weiteren Bearbeitung als Zytoplasmafraktion bei -20 °C gelagert.

Die Proteine des Gesamtzelllysats, der Zellwandfraktion, der Zytoplasmafraktion und des Zellkulturüberstandes wurden mit 1/10 (v/v) 100%iger Trichloressigsäure über Nacht bei 4 °C gefällt. Die Fraktionen wurden zentrifugiert (10 min, 6.000 g, 4 °C) und die Pellets erst mit 100%igen und dann mit 80%igen Aceton gewaschen. Die Pellets der einzelnen Fraktionen wurden anschließend in einem geeigneten Volumen TRIS-HCl pH 7,5 resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Proteoplast-Puffer	50 mM TRIS-HCl pH 7,5
	20 mM MgCl ₂
	30 % Raffinose (w/v)
	1 % Calbiochem Protease-Inhibitor Cocktail Set 1

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteinproben wurden durch das SDS im Ladepuffer und durch das kurze Aufkochen denaturiert. Dabei maskiert das negativ geladene SDS die Eigenladung der Proteine, sodass diese sich im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht auftrennen.

	12 %iges Trenngel	15 %iges Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	1,6 ml	1,1 ml	1,0 ml
Acrylamid/-Bisacrylamid	2,0 ml	2,5 ml	0,25 ml
1,5 M TRIS-HCl pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml	
1 M TRIS-HCl pH 6,8			0,19 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,015 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,05 ml	0,05 ml	0,015 ml
Tetramethylethylen-diamin	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml

Die entsprechenden Komponenten des Trenngels wurden in ein 50 ml Falcon gegeben und durch langsames Invertieren gemischt. Nach Zugabe des Polymerisationskatalysators Tetramethylethylen-diamin wurde das Trenngel-Gemisch sofort in die Gießvorrichtung gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel-

Gemisch auf das Trenngel gegeben. Nach dem Einsetzen des Kamms polymerisierte das Sammelgel ebenfalls für mindestens 30 min. Üblicherweise wurden die Gele am Vortag angefertigt und in feuchten Zellstoff eingewickelt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Die vorangestellte Vorschrift zeigt das Pipettierschema für ein SDS-Gel. Die Proteine wurden mit der *BioRad-Mini-Protean II Cell*-Apparatur (BioRad) aufgetrennt. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgte für 1 – 3 h bei einer konstanten Stromstärke von 22 mA/Gel. Im Anschluss konnten die Gele gefärbt oder die Proteine auf eine Membran übertragen werden.

SDS-Laufpuffer	14,4 % Glycin
	3 % TRIS
	1 % SDS

3.3.5 Färbung der Gele

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für 30 min auf dem Schüttler in einer Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend für mindestens 30 min in der Entfärbelösung entfärbt. Um den Kontrast der blauen Proteinbanden zu erhöhen, wurde das Gel mehrmals mit dH₂O gewaschen sowie über Nacht in dH₂O geschwenkt.

Coomassie-Färbelösung	0,6 g Coomassie-Blau G-250
	0,6 g Coomassie-Blau R-250
	454 ml 96 % Ethanol
	92 ml Eisessig
	ad 1 l dH ₂ O

Entfärbelösung	330 ml 96 % Ethanol
	100 ml Eisessig
	ad 1 l dH ₂ O

3.3.6 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum spezifischen Proteinnachweis mittels Antikörper. Hierbei werden nach der SDS-PAGE die Proteine vom Gel auf eine Trägermembran z.B. Nitrocellulose oder Polyvinylfluorid im elektrischen Feld transferiert. Anschließend erfolgt die Detektion der Proteine durch die Antigen-Antikörperreaktion.

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine im *Semidry Blot*-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zuvor wurden die Membran und sechs Lagen Whatman-Papier mit Blot-Puffer getränkt. Auf die Graphitplatte der Blot-Apparatur (Anode) wurden drei Lagen Whatmann-Papier und die Membran platziert. Anschließend wurde das Proteingel luftblasenfrei auf die Membran aufgelegt,

mit drei Lagen Whatman-Papier bedeckt und die Kathode aufgesetzt. Der Proteintransfer erfolgte in Abhängigkeit der Größe des Zielproteins für 0,5 bis 1 h bei einer konstanten Spannung von 20 V.

Die Membran wurde anschließend für 2 h in Blockierungspuffer (5 % Magermilch in TBS) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu maskieren. Im Anschluss inkubierte die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (1:1000 – 1:5000 in 1 % Magermilch/TBS). Bei der Benutzung des Phosphothreonin-Antikörpers (#9381S, *Cell Signaling*, Frankfurt) wurde der Magermilchanteil durch Albumin ersetzt. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 15 min in TBS-Tween-Puffer (TBS-T) gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem entsprechenden *Horseradish Peroxidase* (HPR)-konjugierten Sekundärantikörper (Anti-Maus-HPR 1:10000 und Anti-Kaninchen-HPR 1:5000 jeweils in TBS) für 2 h bei RT. Nach dreimaligen Waschen in TBS-T wurde die Membran für 2 min mit der ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*) inkubiert. Die Detektion des Chemilumineszenzsignals erfolgte mittels lichtempfindlicher Kamera des *ImageQuant LAS 4000* Systems.

Blot-Puffer	150 mM TRIS 120 mM Glycin 10 % Ethanol
TBS-Puffer	10 mM TRIS-HCl pH 7,5 0,9 % NaCl
TBS-T-Puffer	0,05 % Tween20 in TBS-Puffer
Lösung A	0,25 mg/ml Luminol in 0,1 M TRIS-HCl (pH 8,8)
Lösung B	1,1 g/ml para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
ECL-Lösung	2 ml Lösung A + 0,2 ml Lösung B + 0,6 µl 30 % H ₂ O ₂

3.3.7 Blaue Nativ-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die BN-PAGE ist eine Elektrophoresetechnik, die zur Auftrennung von nativen Membranproteinen und Proteinkomplexen geeignet ist. Sie kann auch zur Bestimmung der Masse von native Proteinen und Proteinkomplexen verwendet werden. Bei dieser Technik wird in Gegensatz zur SDS-PAGE auf den Einsatz von SDS und Mercaptoethanol sowie auf das Erhitzen der Probe verzichtet. Unter diesen nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen lagert sich der negativ geladenen Farbstoff Coomassie-Blau an die Proteine und überlagert deren Eigenladung. Somit können diese negativ geladenen, nativen Proteine oder Proteinkomplexe im elektrischen Feld aufgetrennt werden.

In diesem Versuch wurde untersucht, welche Proteinmasse Stk unter nativen Bedingungen aufweist. Außerdem wurde überprüft, ob Stk möglicherweise in einem Proteinkomplex assoziiert ist. Dazu

wurden native Proteinlysate der Stämme *S. aureus* NewmanHG Δspa wt und Δstk hergestellt. Diese Lysate wurden anschließend mithilfe der BN-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels *Wet*-Blot-Verfahrens auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Die Detektion von Stk erfolgte mit dem Stk-Antikörper.

Das Elektrophorese-Equipment, die Puffer (*NativePAGE*TM Katoden- und Lauf-Puffer) und die vorgefertigten Gele (3 – 12 % Bis-TRIS *NativePAGE*TM Novex Gel, 30 – 10.000 kDa) wurden von der Firma *Life Technologies* (Thermo Fisher, Darmstadt) bezogen. Die Proteinlysate der *S. aureus* Δspa -Stämme wurden, wie unter Abschnitt 3.3.2 beschreiben, hergestellt. 200 µg natives Proteinlysate wurde mit 1/10 Volumenanteil *NativePAGE*TM-Probenadditiv (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) und 4x *NativePAGE*TM-Probenpuffer versetzt und in die Geltasche gegeben. Zur Abschätzung der Proteingröße diente der *NativMark*-Proteinstandard von *Life Technologies*. Als Anodenpuffer wurde der *NativePAGE*TM-Laufpuffer verwendet. Für die Elektrophorese mit anschließend Western Blot wurden zwei verschiedene Katodenpuffer verwendet. Die beiden Katodenpuffer wurden mit *NativePAGE*TM-Laufpuffer und zusätzlich mit 0,02 % oder 0,002 % *NativePAGE*TM-Katodenadditiv angesetzt. Die Auftrennung der Proteine bis zum ersten Drittel des Gels erfolgte mit dem dunkelblauen Katodenpuffer (mit 0,02 % *NativePAGE*TM-Katodenadditiv). Anschließend wurde der Katodenpuffer durch den hellblauen Katodenpuffer (0,002 % *NativePAGE*TM-Katodenadditiv) ersetzt. Die Elektrophorese erfolgte im Kühlraum bei 4 °C für 1 h bei 150 V und anschließend bei 250 V.

Der Western Blot des *NativePAGE*-Gels erfolgte nach dem *Wet Blot*-Verfahren. Hierzu wurde eine Polyvinylidenfluorid-Membran nacheinander für 90 s in Methanol, 5 min in dH₂O und in Transferpuffer geschwenkt. Das Whatman-Papier und die *Blot Pads* wurden ebenfalls für 5 min in Transferpuffer gegeben. Das Gel wurde zusammen mit der Membran, dem Whatman-Papier wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben, zusammengebaut und in die mit Transferpuffer gefüllte Blot-Kammer gegeben. Der Proteintransfer wurde für 1 h bei 100 V im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde Stk nach dem Protokoll aus dem Abschnitt 3.3.6 mittels Stk-Antikörper nachgewiesen.

<i>Wet Blot</i> -Transferpuffer	86 mM Glycin
	25 mM TRIS-HCl
	20 % Methanol

3.3.8 Herstellung rekombinanter Proteine

Die Proteinexpression erfolgte mithilfe des pET28a-Expressionssystems der Firma *Novagen* (Madison, USA). Das pET28a-Vektorsystem erlaubte die N- und C-terminale Fusion eines Polyhistidin-Tags an das entsprechende Zielprotein. Die Gene dieser Arbeit wurden als N-terminales Polyhistidin-Fusionsprotein kloniert. Unter Verwendung des *lac*-Promotoraktivators IPTG konnte das

rekombinante Protein exprimiert werden. Das Protein wurde anschließend mithilfe von Ni-TED-Säulen aufgereinigt und im entsprechenden Puffersystem dialysiert.

3.3.8.1 Konstruktion rekombinanter Proteine

Das entsprechende Gen wurde aus dem *S. aureus* NewmanHG-Genom mittels PCR amplifiziert und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in den pET28a-Vektor kloniert. Der Vektor wurde zuerst in *E. coli* DH5 α oder DC10B und anschließend in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE) transformiert und bei -80 °C als Bakterienstock gelagert.

3.3.8.2 Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Proteine wurden unter nativen Bedingungen mittels Affinitätschromatographie anhand der *Proteino* Ni-TED-Säulen (Marcherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Dabei banden die Polyhistidin-Fusionsproteine des Proteinlysats an die immobilisierten Nickelionen, während das Lysat und die Waschpuffer durch die Säulenmatrix hindurchlaufen. Nach mehreren Waschsritten wurden die rekombinanten Proteine durch den Imidazol-haltigen Elutionspuffer eluiert.

Für die Expression des rekombinanten Proteins wurde eine 30 ml Vorkultur in LB-Medium mit 50 μ g/ml Kanamycin über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden 20 ml der Vorkultur in 1 Liter LB-Medium mit 50 μ g/ml Kanamycin gegeben und diese Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Expression der Proteine mit 0,5 mM Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und für 18 – 24 h bei 18 °C geschüttelt. Die Kultur wurde anschließend zentrifugiert (15 min, 4.000 g, 4 °C) und das Zellpellet bei -20 °C gelagert. Das Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 10 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension fünfmal für 45 s mit der Ultraschallsonde behandelt. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (30 min, 8.000 g, 4 °C) und das klare Zelllysate bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Nach der Äquilibration der Ni-TED-Säule mit 5 ml LEW-Puffer wurde das Zelllysate auf die Säule gegeben. Die an die Säule gebundenen His-getaggten Proteine wurden nacheinander mit 5 ml LEW-Puffer, mit 5 ml LEW-Puffer mit 1 mM Imidazol und 2 ml LEW-Puffer mit 10 mM Imidazol gewaschen. Anschließend wurden die Proteine mit 9 ml Elutionspuffer in Eppendorfgefäße eluiert. Zur Überprüfung des Proteingehalts wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Proteinhaltige Fraktionen wurden für die Dialyse verwendet.

Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 50 μ g/ml DNase, 100 μ g/ml Lysozym, 0,02 % Calbiochem Protease Inhibitor Cocktail Set 1
------------	--

LEW-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl
Elutionspuffer	250 mM Imidazol in LEW-Puffer

3.3.8.3 Dialyse der Protein

Die Dialyse dient dem Pufferaustausch oder der Entfernung von störenden Substanzen aus der Proteinlösung. Für die Dialyse wurden Dialyseschläuche (MWCO 3500; *Spectra/Por*[®] *Dialysis Membrane*, Spectrum Laboratories) oder *VivaSpin*[®]-Konzentratoren (Sartorius, Göttingen) verwendet. Der Dialyseschlauch wurde für 5 min in dH₂O rehydratisiert. Die Probe wurde anschließend in den Schlauch gegeben und in 5 Liter des gewünschten Puffers für 2 h bei 4 °C unter leichtem Rühren dialysiert. Danach wurde die Dialyse mit frischem Puffer über Nacht unter gleichen Bedingungen fortgeführt.

Für die Konzentrierung des Dialysats oder für den Dialyseschlauch-freien Pufferwechsel wurde die *VivaSpin*[®]-Konzentratoren verwendet. Hierzu wurden die Konzentratoren mit 5 ml des entsprechenden Puffers befüllt, und bis zu einem Restvolumen von 0,5 – 1 ml zentrifugiert (4000 g, 4 °C). Anschließend wurde das Dialysat oder die Proteinprobe in den Konzentrator gegeben und ebenfalls bis zu einem Restvolumen von 0,5 ml zentrifugiert. Der Durchlauf wurde dabei stets verworfen. Anschließend wurde die Probe zweimal mit 5 ml Puffer gewaschen und bis zu einem finalen Volumen von 0,5 – 1 ml zentrifugiert. Die Probe wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für kurze Zeit bei 4 °C oder für einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert.

3.3.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des *Advanced Protein Assay*-Reagenz (*Cytoskeleton*, Denver, USA) bestimmt. Diese schnelle und sensitive Methode erlaubt aufgrund der hohen Reagenzientoleranz die Proteinbestimmung in verschiedensten Puffern, biologischen Flüssigkeiten und Kulturmedien. Die Proteinkonzentration kann anhand eines Farbumschlags des Reagenz von grün nach blau am Photometer bei einer OD_{600nm} bestimmt werden. Bei jeder Proteinbestimmung wurde zuvor eine Albumin-Eichkurve erstellt und anhand dieser die Proteinkonzentration der Probe ermittelt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe (0 - 1000 µg/ml Albumin) im entsprechenden Puffer hergestellt. Die Probe wurde entweder 1:10, 1:50 oder unverdünnt eingesetzt. 20 µl der Albumin-Verdünnung oder der Probe wurden in eine Küvette mit 1 ml Reagenz gegeben, kurz gevortext und anschließend die OD₆₀₀ gemessen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnte anhand der OD₆₀₀ die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden.

3.3.9 *In vitro* Kinase-/Phosphatase-Assay

Die Validierung potentieller Substrate von Stk und Stp erfolgt mithilfe des Kinase- bzw. Phosphatase-Assays. Hierbei wurde überprüft, ob Stk das Substrat phosphoryliert und Stp das Substrat dephosphoryliert. Die Phosphorylierung wird anschließend mithilfe des α P-Thr-Western Blots oder mithilfe der Massenspektrometrie nachgewiesen.

Für den Kinase-Assay wurde die Kinase-Domain von Stk₁₋₂₉₁ (Stk_{KD}) verwendet [67], da sie gegenüber dem vollständigen Stk₁₋₆₆₄-Protein weniger degradierte. 1 μ g des rekombinanten Proteins (FemX, FemA oder FemB) und 1 μ g von Stk_{KD} wurden für 1 h bei 37 °C im Kinasepuffer mit oder ohne 20 mM ATP inkubiert. Für den Phosphatase-Assays wurden zusätzlich noch 1 μ g Stp zum Reaktionsgemisch hinzugefügt. Nach der Inkubation wurde der Ansatz mit SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben mithilfe der SDS-PAGE in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Phosphorylierung der Substrate wurde mithilfe des Phosphothreonin-Antikörpers im Western Blot detektiert. Die Detektion der Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsstellen der Substrate erfolgte mithilfe der Massenspektrometrie. Dazu wurde der Kinase-/Phosphatase-Assay wiederholt, die Ansätze mit SDS-Ladepuffer versetzt und jeweils für 30 min im Dunkeln bei RT mit 1 mM DTT reduziert und mit 10 mM Iodacetamid alkyliert. Nach kurzen Aufkochen (5 min, 95 °C) wurde der Ansatz mithilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit dem Farbstoff Coomassie gefärbt. Die entsprechende Proteinbande wurde anschließend ausgeschnitten und an die Massenspektrometrie (AG Schlosser, RVZ Würzburg) übergeben.

Kinasepuffer	50 mM TRIS-HCl pH 7,5 3 mM MgCl ₂ 3 mM MnCl ₂ +/- 20 mM ATP
--------------	--

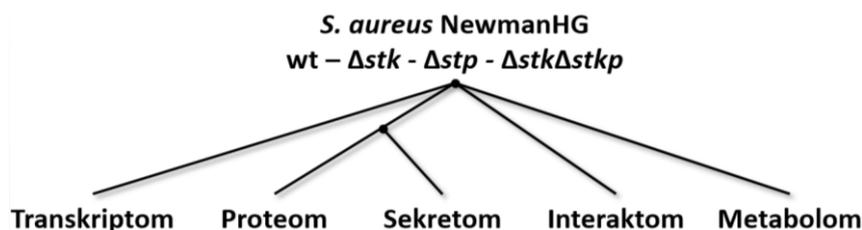


Abbildung 7: Übersicht der verschiedenen Omics-Techniken zur Charakterisierung der *S. aureus*-Stämme.

Der *S. aureus* NewmanHG-Wildtyp und die isogenen *stk*-, *stp*- und *stk/stp*-Mutanten aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden mithilfe verschiedener Omics-Techniken charakterisiert. Die verschiedenen Techniken und deren Durchführung sind in den folgenden Abschnitten beschrieben. Das Proteom und Sekretom wurde für jeden Stamm aus einer Kultur gewonnen. Hingegen wurde das Interaktom, Metabolom und Transkriptom jeweils aus getrennten Kulturen angefertigt.

3.4 Transkriptom-Analyse der *S. aureus*-Stämme mittels RNA-Seq

3.4.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Um die RNA aus *S. aureus* NewmanHG wt, Δstk , Δstp und $\Delta stk\Delta stp$ zu isolieren, wurden Übernachtskulturen der Stämme auf OD₆₀₀ 0,05 in 20 ml TSB-Medium eingestellt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 2 inkubiert. 5 ml der Kultur wurden anschließend mit 5 ml *RNAprotect*-Reagenz (Qiagen) vermischt und die Suspension für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (15 min, 6.000 g, 4 °C). Die RNA-Extraktion erfolgte mithilfe des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben stets auf Eis. Das Zellpellet wurde in 0,7 ml RLT-Puffer resuspendiert und in *Lysing Matrix*-Röhrchen (MB Biomedicals) überführt. Die Zellen wurden zweimal für 45 s bei 6,5 m/s mithilfe der *FastPrep*[®]-Kugelmühle lysiert. Anschließend wurde das gekühlte Zelllysate zentrifugiert (10 min, 17.000 g, RT). 0,5 ml des Überstands wurden mit 0,5 ml 100%igen Ethanol versetzt und die gesamte Probe auf eine *RNeasy*-Säule gegeben. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (30 s, 11.000 g, RT) wurde der Ansatz einmal mit 0,7 ml RW1-Puffer und zweimal mit 0,5 ml RPE-Puffer gewaschen. Die Säule wurde anschließend trocken zentrifugiert (2 min, 11.000 g, RT) und auf ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die RNA wurde mit 40 µl RNase-freien Wasser von der Säule eluiert (1 min, 11.000 g, RT). Mithilfe des NanoDrop[®]-Photometers wurde die RNA-Konzentration der Proben bestimmt. Die Proben wurden anschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.4.2 RNA-Sequenzierung der *S. aureus*-Stämme

Die Proben für die RNA-Sequenzierung von *S. aureus* NewmanHG wt und der entsprechenden Deletionsstämme (Δstk , Δstp und $\Delta stk\Delta stp$) wurden in Triplikaten an *vertis Biotechnologie AG* (Freisingen, Deutschland) gesandt. Die Firma depletierte die ribosomale RNA aus der Gesamt-RNA mithilfe des *Ribo-Zero rRNA Removal Kits* (Illumina). Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese. Hierbei wurden RNA-Proben mittels Ultraschall fragmentiert. An das 3'-Ende der fragmentierten RNA wurden Oligonukleotidprimer ligiert. Im ersten Schritt der cDNA-Synthese wurde mithilfe einer Reversen-Transkriptase der erste Strang der cDNA synthetisiert. Im zweiten Schritt wurde mittels DNA-

Polymerase der komplementäre cDNA-Strang mit einen Proben-spezifischen Barcode synthetisiert. Für die Illumina *NextSeq*-Sequenzierung wurden alle Proben mit ihren entsprechenden Barcode in äquimolaren Mengen zusammengefügt. Der cDNA-Mix wurde mithilfe eines Agarosegels nach Größe (200 bp bis 500 bp) fraktioniert. Dieser fraktionierte cDNA-Mix wurde anschließend mittels *Illumina NextSeq 500*-System mit einer Read-Länge von 75 bp sequenziert. Die entsprechenden Sequenzen wurden anschließend von Dr. Konrad Förstner (*Bioinformatics IMIB, Würzburg*) ausgewertet und bereitgestellt.

3.5 Proteom-Analysen der *S. aureus*-Stämme

3.5.1 Isolierung der Proteine aus den *S. aureus*-Lysaten

Für die Proteom-basierenden Analysen wurden die *S. aureus*-Stämme bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Aus jede Proben wurden das Proteom und das Sekretom aufgearbeitet. Die Aufarbeitung und die Messung der Proteine mittels Massenspektrometrie wurden mit freundlicher Unterstützung von Mico Steger (RVZ, Würzburg) vorgenommen. Die *S. aureus*-Stämme wurden in 5 Replikaten in 200 ml TSB-Medium bei 37 °C bis zur logarithmischen (OD_{600} 2-3) kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (10 min, 5.000 rpm, 4 °C). Vom Zellkulturüberstand wurden 2 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und als Sekretom-Proben weiterbearbeitet (Abschnitt 3.5.2). Das Zellpellet wurde mit 20 ml PBS-NaF (5 mM NaF) gewaschen und bei -20 °C eingefroren. Die folgende Probenaufarbeitung erfolgte stets auf Eis.

Das Zellpellet wurde in 0,4 ml Zellysepuffer resuspendiert und für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Der Lysepuffer enthielt Lysostaphin, welches die Zellwand der Staphylokokken lysierte. Außerdem wurden dem Puffer Inhibitoren zugesetzt, welche die bakteriellen Phosphatasen und Proteasen hemmte. Nach der Zugabe von 0,2 g Glaskügelchen wurden die Bakterien dreimal für 60 s bei 6,5 m/s mithilfe der *FastPrep*[®]-Kugelmühle lysiert. Zwischen den Lysesritten wurden die Proben stets auf Eis gekühlt. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (10 min, 8.000 g, 4 °C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde das Zellpellet nochmals in 0,4 ml Lysepuffer resuspendiert und erneut zweimal mit der *FastPrep*[®]-Kugelmühle lysiert. Dem Zellysats wurden 40 µl 20 %iges DDM hinzugefügt und für 10 min bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Das Detergenz DDM überführt schwerlösliche Membranproteine des Zellysats in die wässrige Phase. Das Zellysats wurde anschließend zentrifugiert und der Überstand ebenfalls in das entsprechende Reaktionsgefäß überführt. Die finale DDM-Konzentration in der Probe betrug 0,5 %. Die Probe wurde nochmals zentrifugiert (30 min, 8.000 g, 4 °C), um alle unlöslichen Bestandteile aus der Probe zu entfernen. Der Überstand wurde in einem neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

(Porendurchmesser: 0,22 μm) filtriert. Das Filtrat wurde direkt in ein Reaktionsgefäß mit 200 μl 10%igen SDS gegeben. Nach der Zugabe von 18 μl 1M DTT wurde die Probe gevortext und 5 min bei 90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen bis auf RT wurde die Probe für 20 min mit 1M Chloracetamid alkyliert. Die Probe wurde anschließend in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen der Proben wurden die Proben für 10 min im Schüttelinkubator (25 °C, 750 rpm) inkubiert, gevortext und anschließend 1 ml der Proben in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung des TSB-Mediums und niedermolekularer Verbindungen aus der Probe wurde ein Reaktionsgefäß mit einer Ultrafiltrationsmembran (10 kDa *Cutoff Microcon Centrifugal Filters*, Merck) verwendet. Die Membran wurde mit 50 μl ABC-Puffer (50 mM Ammoniumbicarbonat) äquilibriert und anschließend mit 14.000 g zentrifugiert. Die Probe wurde auf die Membran gegeben, zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Das Retentat wurde zweimal mit jeweils 200 μl Waschpuffer (8 M Harnstoff in 50 mM ABC) und zweimal mit 150 μl 50 mM ABC-Puffer gewaschen. Auf die konzentrierte Proteinprobe (Retentat) wurden 60 μl Elutionspuffer (0,2 % SDS in 50 mM ABC) gegeben und das Gemisch wurde für 5 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Zur Fällung der eluierten Proteine (ca. 80 μl) wurden 320 μl eiskaltes 100%iges Aceton dem Eluat hinzugegeben und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe zentrifugiert (15 min, 10.000 g, 4 °C) und der Überstand mit einer Pipette abgezogen. Das Proteinpellet wurde für 10 min bei 4 °C mit 300 μl 80%igen Aceton inkubiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und die restliche Flüssigkeit unter dem Abzug getrocknet. Das Proteinpellet wurde in 60 μl Verdau-Puffer (0,5 % SDS in 100 mM ABC) aufgenommen und für 15 min im Schüttelinkubator (25 °C, 1000 rpm) resolubilisiert. Die Proteine wurden mit 1,2 μg LysC für 1,5 h und anschließend mit 1 μg Trypsin über Nacht im Schüttelinkubator (37 °C, 1200 rpm) verdaut. Am nächsten Tag wurden dem Verdau 60 μl Ethylenacetat und 2,4 μl Trifluoressigsäure (TFA) zugefügt und für 30 s gevortext. Das Ethylenacetat der Peptidprobe wurde anschließend für 20 min in der *SpeedVac* verdampft und die Probe bei -80 °C eingefroren. Die Peptide wurden anschließend, wie im Abschnitt 3.5.2 beschrieben, für die Messung im Massenspektrometer vorbereitet.

3.7 Interaktom-Analyse mittels Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine biochemische Methode, bei der mithilfe eines Antikörpers das entsprechende Antigen aus einer Lösung extrahiert wird. In diesem Versuch wurden fünf Lysate des *S. aureus*-Wildtyps hergestellt. Aus diesem Lysaten wurden mithilfe des Stk-Antikörpers Stk und an Stk-gebundene Interaktionspartner aufgereinigt und die Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie identifiziert. Um unspezifische Interaktionspartner auszuschließen, wurde der gleiche Versuch mit fünf *S. aureus* Δstk -Lysaten oder der Versuch in Abwesenheit des Antikörpers durchgeführt. Die Stk-Anreicherung durch die Immunpräzipitation wurde mittels Western Blot nachgewiesen.

3.7.1 Probengewinnung

Um die Lysate aus *S. aureus* NewmanHG wt und Δ stk für die Immunpräzipitation herzustellen, wurden Übernachtskulturen der Stämme auf OD₆₀₀ 0,05 in 1 Liter TSB-Medium eingestellt und bei 37 °C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 2 inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert (15 min, 5.000 g, 4 °C) und mit 25 ml PBS-NaF (5 mM) gewaschen. Das Pellet wurde in 10 ml Lysepuffer (siehe Abschnitt 3.7.1) resuspendiert und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien dreimal für 60 s bei 6,5 m/s in der *FastPrep*[®]-Kugelmühle lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (10 min, 8.000 g, 4 °C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Bakterienpellet wurde in 3 ml Lysepuffer resuspendiert, erneut in der *FastPrep*[®]-Kugelmühle lysiert, mit 325 µl 20%igen DDM versetzt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Probe wurde anschließend zentrifugiert (20 min, 9.000 g, 4 °C) und der Überstand in das entsprechende Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Proteinkonzentration des Überstands bestimmt und der Überstand als *S. aureus*-Lysat bei -20 °C eingefroren.

3.7.2 Immunpräzipitation

Zunächst wurden die monoklonalen Stk-Antikörper bestehend aus α Stk_{KD} und α Stk_{PASTA} in gleichen Masseanteilen vermischt. Der α Stk_{Mix} gewährleistete bei einer Epitopmaskierung eines Antikörpers das Binden des anderen Antikörpers an Stk. 20 mg der jeweils fünf Lysate (wt und Δ stk) wurden auf Eis mit eiskaltem Waschpuffer (Abschnitt 3.5) auf 5 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 15 µg α Stk_{Mix} in die Proben mit Ausnahme der Negativkontrolle gegeben und für 2 h bei 4 °C auf den Rollschüttler inkubiert. Die magnetischen Protein-G *Beads* (15 µl je Probe) wurden mithilfe einer magnetischen Schiene zweimal in 1 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen und in 30 ml Waschpuffer resuspendiert. Die *Beads* wurden in die Probe überführt und für 2 h bei 4 °C auf den Rollschüttler inkubiert. Hierbei binden die Protein-G *Beads* den F_c-Teil der Stk-Antikörper, welche im Schritt zuvor Stk und dessen Interaktionspartner gebunden haben. Die *Beads* wurden anschließend mithilfe der magnetischen Schiene separiert und das Lysat verworfen. Nach sechsmaligen Waschen mit 1 ml Waschpuffer wurden der *Beads* mit 33 µl 1x SDS-Ladepuffer (mit 10 mM DTT) versetzt und für 30 min bei RT auf dem Rollschüttler inkubiert. Die an die *Beads*-gebundenen Proteine wurden somit von den *Beads* eluiert und gleichzeitig durch DTT reduziert. Anschließend wurden die Proteine für 30 min im Dunkeln bei RT mit 10 mM Iodacetamid alkyliert. Die *Beads* wurden erneut separiert und die Proteinprobe bis zur weiteren Aufarbeitung für die Massenspektrometrie (Mirco Steger, AG Schlosser, RVZ Würzburg) bei -20 °C eingefroren. Die Peptide wurden anschließend, wie im Abschnitt 3.5.2 beschrieben, für die Messung im Massenspektrometer vorbereitet.

3.8 Metabolom-Analyse

Die intrazelluläre Metabolom-Analyse der *S. aureus*-Stämme wurde nach dem Protokoll von Meyer *et al.* [106] durchgeführt und die extrahierten Metaboliten dank Daniel Schultz (AG Lalk, Universität Greifswald) mittels UPLC-Massenspektrometrie analysiert. Die Stämme wurden in je 100 ml TSB-Medium bis zur logarithmischen (OD_{600} 2) und stationären Wachstumsphase (OD_{600} 9 bis 12) inkubiert. 20 OD_{600} -Einheiten der Kulturen wurden zügig auf das Filtersystem gegeben und sofort mit 15 ml eiskalter 0,6%iger NaCl-Lösung gewaschen. Der Filter mit den anhaftenden Zellen wurde sofort in ein 50 ml Falcon mit 5 ml eiskalter Extraktionslösung (60 % HPLC-Ethanol) überführt, kurz heftig geschüttelt und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden bei -80 °C gelagert. Die nachfolgenden Schritte des Zellaufschlusses wurden stets eisgekühlt durchgeführt. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und je 10 mal 10 s geschüttelt und gevortext, um die Zellen vom Filter abzulösen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 10.000 rpm, 4 °C) und der Überstand in ein 50 ml Falcon-Gefäß mit 5 ml Glaskugeln überführt. Der Filter wurde erneut mit 5 ml HPLC-Wasser geschüttelt, gevortext und zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls in das mit Glaskugeln befüllte Falcon-Gefäß überführt. Zu den zusammengeführten Überständen wurde außerdem 100 µl des internen Standards (5 nM Camphorsulfonsäure) hinzugegeben. Die Zellen wurden dann zweimal für 45 s bei 6 m/s mittels *FastPrep*®-Kugelmühle lysiert. Das Zelllysate wurde zentrifugiert (10 min, 12.000 rpm, 4 °C) und der Überstand in ein 50 ml Falcon überführt. Das Zellpellet wurde mit 5 ml HPLC-Wasser erneut mittels *FastPrep*®-Kugelmühle lysiert und anschließend zentrifugiert. Die Überstände wurden vereint und bis auf 40 ml mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert. In Greifswald wurden die Proben durch Daniel Schultz lyophilisiert und für die UPLC-Massenspektrometrie aufgearbeitet [73].

3.9 *Staph Toxin*-Proteinarray

In diesem Versuchsteil wurden die spezifischen Antikörperantworten der Mäuse auf eine Infektion mit den verschiedenen *S. aureus*-Stämmen untersucht. Hierbei wurden Mäuse mit den *S. aureus*-Stämme nach dem Protokoll von Selle *et al.* vakziniert [107]. Mithilfe des *Staph-Toxin*-Proteinarrays [108] erfolgte ein indirekter Nachweis von sekretierten Staphylokokken-Proteinen anhand der von der Maus produzierten Antikörper. Das jeweils spezifische Antikörpermusters erlaubte die Differenzierung der *S. aureus*-Stämme anhand der spezifischen Immunantwort auf die Staphylokokken-Antigene. Die Infektion der Mäuse mit den Staphylokokken-Stämmen sowie die Gewinnung der Mausseren erfolgten durch Dr. Tobias Hertlein und Liane Dreher (AG Ohlsen, Universität Würzburg).

3.9.1 Mausinfektionsmodell

Die *S. aureus* NewmanHG-Stämme (wt, Δstk , Δstp und $\Delta stk\Delta stp$) wurden über Nacht in BHI-Medium bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien verdünnt und bis zur logarithmischen Phase kultiviert. Nach einem Zentrifugationsschritt (20 min, 4.000 g) wurden die Bakterien in BHI-Medium mit 20 % Glycerin aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Vor der Infektion wurden die Bakterien bei RT aufgetaut, mit sterilem PBS gewaschen und auf die gewünschte Infektionsdosis in PBS eingestellt. Die genaue Infektionsdosis wurde mittels optischer Dichte und einer Verdünnungsreihe auf LB-Platten bestimmt. Für den Infektionsversuch wurden weibliche, 18 – 20 g schwere BALB/c Mäuse von *Charles River* (Sulzfeld) verwendet. Die Tiere wurden dreimal mit einer sublethalen Infektionsdosis (5×10^6 Bakterien) im Zeitintervall von 14 Tagen intramuskulär infiziert. Für die Analyse der Antikörperantwort wurden 12 Tage nach der letzten Infektion das Blut mithilfe einer Herzpunktion gewonnen. Das gewonnene Blut wurde für 30 min bei RT agglutiniert, anschließend zentrifugiert (5 min, 3.000 g, RT) und das Serum bei -20 °C eingefroren.

3.9.2 Evaluierung der Antikörperantwort

Die spezifische Antikörperantwort auf die *S. aureus*-Stämme wurde mittels *Staph-Toxin-Array-Ag03* der Firma *Alere Technologies GmbH* (Jena) erfasst. Auf dem Array sind 63 verschiedene *S. aureus* spezifische Antigene in verschiedenen Konzentrationen kovalent gebunden. Die entsprechenden *S. aureus*-Antigene können den Publikationen von *Selle et al.* und *Kloppot et al.* entnommen werden [107, 108]. Die Detektion der an den Array gebundene Antikörper erfolgte mittels HPR-konjugierten Anti-Maus-Antikörper. Das entsprechende Signal jedes Antigens auf dem Array wurde von der Firma *Alere* ausgewertet.

Die Proteinarrays wurden jeweils für 5 min bei 37 °C mit 150 μ l Waschpuffer gewaschen und mit 100 μ l Blockierungspuffer geblockt. Anschließend wurde das Serum 1:5000 mit PBS verdünnt und 100 μ l der Verdünnung auf dem Array für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen mit 150 μ l Waschpuffer für 5 min bei 37 °C erfolgte die Inkubation mit dem HPR-konjugierten α Maus-IgG-Antikörper (100 μ l in einer 1:1000 Verdünnung) für 15 min bei 37 °C. Anschließend wurde der Array zweimal mit 150 μ l Waschpuffer für 5 min bei 37 °C gewaschen. Der Array wurde mit 100 μ l Substratlösung (*SeramunGrün*[®], *Seramun Diagnostik GmbH*, Heidesee) für 10 min bei 25 °C mit inkubiert. Nach dem Inkubationsschritt wurde die Lösung entfernt und das Signal am *ArrayMate*-Lesegerät gemessen. Die Auswertung der Signale erfolgte durch die Firma *Alere*.

Waschpuffer	PBS 0,05 % Tween20 0,25 % TritonX100 1 % FCS
Blockierungspuffer	PBS 0,05 % Tween20 10 % FCS

3.10 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Bestimmung der Zellgröße und der Zellwanddicke der verschiedenen *S. aureus*-Stämme wurden mittels TEM elektronenmikroskopische Bilder von Zellen der logarithmischen und stationären Phase angefertigt. Die Stämme wurden in 20 ml TSB Medium bei 37 °C kultiviert. 15 ml Bakterienkultur der logarithmischen (OD_{600} 2) und 1 ml Bakterienkultur der stationären Phase (OD_{600} 10) wurden zentrifugiert (10 min, 8000 g, RT) und das Zellpellet in 1,5 ml 2,5%igen Glutaraldehyd für 30 min auf Eis fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut pelletiert (10 min, 8000 g, 4 °C) und das eisgekühlte Zellpellet zur weiteren Probenaufarbeitung an die AG Stiglohrer (Biozentrum, Würzburg) übergeben. Dort wurden die Proben fünfmal für je 3 min in 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7,2) gewaschen und anschließend für 2 h bei 4 °C in Osmium(VIII)-oxid (2 % OsO_4 in Cacodylatpuffer) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben fünfmal für je 3 min mit ddH₂O gewaschen und über Nacht in 0,5%igen Uranylacetat inkubiert. Anschließend wurden die Proben für je 30 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 96 % und dreimal 100 %) bei 4 °C sowie dreimal in Propylenoxid bei RT entwässert. Die entwässerten Proben wurden anschließend in Epon812 eingebettet und ultradünn geschnitten. Die TEM-Bilder wurde mit einem JEM-2100 Elektronmikroskope (JEOL, Freising) mit der Digitalkamera TemCam F416 (TVIPS, Gauting) bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV aufgenommen.

3.11 Lysostaphin-Empfindlichkeitstest

Um die Empfindlichkeit der *S. aureus*-Stämme gegenüber der Endopeptidase Lysostaphin zu untersuchen, wurden 1 ml der logarithmischen Kultur bei einer OD_{600} von 2 sowie 2 OD_{600} -Einheiten der stationären Übernachtskultur pelletiert. Nach dem Waschen mit 1 ml Lysostaphin-Puffer (20 mM TRIS-HCl pH 7, 150 mM NaCl, 1mM EDTA) wurden das Zellpellet in 1 ml Lysostaphin-Puffer resuspendiert. 100 µl der Bakteriensuspension wurden in einer 96-Lochplatte in Triplikaten vorgelegt. Anschließend wurden 100 µl Lysostaphin-Lösung (1 µg/ml Lysostaphin in Lysostaphin-Puffer) hinzugegeben. Die Lysekinetik der Bakterien wurde in einem fünfminütigen Zeitintervall über 3 h bei 37 °C im TECAN-Mikroplattenleser erfasst. Als Negativkontrolle diente die Reaktion ohne Lysostaphin.

3.12 Muropeptide-Analyse

Die Muropeptide wurde in Anlehnung an Kühner *et al.* [109] aus den Zellwänden der *S. aureus*-Stämme extrahiert und dank Dr. Ute Bertsche (Universität Tübingen/Hohenheim) mittels UPLC-Massenspektrometrie analysiert. Die Stämme wurden in je 20 ml TSB-Medium bei 37 °C bis zur logarithmischen (OD_{600} 2) und stationären Wachstumsphase (OD_{600} 8 bis 10) inkubiert. 4 ml der logarithmischen und 2 ml der stationären Kulturen wurden pelletiert (20 min, 5.000 g, RT) und bei -80 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 1 ml 1 M NaCl resuspendiert, gevortext und anschließend für 20 min bei 100 °C im Heizblock gekocht. Die abgekühlte Probe wurde erneut pelletiert und dreimal mit 1,5 ml ddH₂O gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde in 1 ml ddH₂O resuspendiert und für 30 min im eisgekühlten Ultraschallbad behandelt. 0,5 ml Puffer B (TRIS-HCl pH 6,8 mit 15 µg/ml DNase und 60 µg/ml RNase) wurden zur Probe hinzugegeben und dieser Ansatz für 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde 0,5 ml Puffer C (50 µg/ml Trypsin in ddH₂O) der Probe hinzugefügt und dieser Ansatz unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach dreiminütigem Aufkochen bei 100 °C im Heizblock wurde die Probe pelletiert und das Pellet mit 1 ml ddH₂O gewaschen. Zur Entfernung der Zellwandteichonsäuren durch saure Hydrolyse wurde das PGN-Pellet für 4 h bei 37 °C in 0,5 ml 1 M HCl inkubiert. Zur pH-Neutralisation der Probe wurde das PGN-Pellet so oft mit 1 ml ddH₂O gewaschen bis ein pH-Wert von 5 bis 6 erreicht wurde. Das PGN-Pellet wurde anschließend in 0,6 ml 12,5 mM NaH₂PO₄ (pH 5,5) resuspendiert und die OD_{600} der PGN-Suspension bestimmt. Anschließend wurden die Proben auf eine OD_{600} von 3 in einem finalen Volumen von 900 µl eingestellt und an Dr. Ute Bertsche nach Tübingen versandt. In Tübingen wurden 100 µl der PGN-Suspension für 4 h bei 37 °C mit Mutanolysin (2.000 U/ml in ddH₂O) verdaut. Der Verdau wurde zentrifugiert (10 min, 4.700 rpm) und der Überstand enthielt die isolierten Muropeptide. Die Muropeptide wurden anschließend in einer Reduktionslösung (10 mg/ml Natriumborohydrat in 0,5 M Borax in ddH₂O, pH 9) reduziert. Nach Zugabe von 50%iger Phosphorsäure wurde die Reduktion gestoppt. Anschließend konnten die Muropeptide mittels UPLC und UPLC-Massenspektrometrie bestimmt werden.

3.13 Bakteriellies Zwei-Hybrid-System (B2H)

Das bakterielle Zwei-Hybrid-System ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen zwischen zwei potentiellen Interaktionspartnern in einem *E.coli*-Reporterstamm. Im B2H-System bedient man sich der katalytische Domäne der Adenylatzyklase (CyaA) von *Bordetella pertussis*. Diese katalytische Domäne besteht aus zwei komplementären Fragmente (T25 und T18), welche bei einer Interaktion cyclisches AMP (cAMP) synthetisieren. Das gebildete cAMP bindet gemeinsam mit dem CAP-Protein an den cAMP-CAP-abhängigen Promotor von Reportergenen. Werden diese Reportergene (z.B. β -Galaktosidase) aktiviert, so lässt sich deren Aktivität anhand chromogener Substrate (z.B. X-Gal

oder MUG) nachweisen. Die beiden komplementären Fragmente (T25 und T18) werden N- oder C-terminal an die zu testenden Proteine mithilfe der Expressionsvektoren (p25N, p25C, p18N und p18N) fusioniert. Der Nachweise der Interaktion zweier Fusionsproteine erfolgt in einem Adenylatzyklase-deletierten *E. coli*-Reporterstamm (*E. coli* BTH101). Aufgrund der Interaktion beider Fusionsproteine kommt es zur funktionellen Rekonstitution der Adenylatzyklase, was die Expression der Reportergene zur Folge hat. Die Expression des Reporterenzym β -Galaktosidase wurde semiquantitativ mittels X-Gal-Indikatorplatten (Spotassay, Abschnitt 3.13.1) oder quantitativ mittels MUG-Hydrolyse (β -Galaktosidase-Assay, Abschnitt 3.13.2) bestimmt. Die Expressionvektoren (p25C, p25N, p18C, p18N), die Kontrollvektoren (p18KT25-*zip* und pUT18-*zip*) und der Reporterstamm *E. coli* BTH101 wurden von der Firma Euromedex (Stouffelweyersheim, Frankreich) bezogen. Die Klonierung der entsprechenden Vektoren erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Klonierung der B2H-Vektoren wurden die Oligonukleotide aus der Tabelle 30 verwendet. Einer Übersicht der B2H-Vektoren, die in Rahmen dieser Arbeit kloniert wurden oder von anderen Arbeitsgruppen bereitgestellt wurden, sind der Tabelle 31 zu entnehmen.

3.13.1 Semiquantitative Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen mittels Spot-Assays

Für die zu testende Interaktionen der Fusionsproteine wurden jeweils 10 ng der Expressionsvektoren in kompetente *E. coli* BTH101-Zellen transformiert und für zwei Tage bei 30 °C auf Selektionsplatten (LB-Agar, 50 μ g/ml Kanamycin, 100 μ g/ml Ampicillin und Streptomycin) inkubiert. 5 bis 10 Kolonien wurden im Selektionsmedium (LB-Medium, 50 μ g/ml Kanamycin, 100 μ g/ml Ampicillin und Streptomycin) vereinigt und bei 30 °C über Nacht inkubiert. 2 μ l der Übernachtskultur wurde mittels Replikator auf einer Indikatorplatte (0,5 mM IPTG, 40 μ g/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal), 50 μ g/ml Kanamycin, 100 μ g/ml Ampicillin und Streptomycin) positioniert und für 3 bis 5 Tage bei 18 °C inkubiert. Interagierende Fusionsproteine bildeten blaue Kolonien auf den Indikatorplatten. Die Kontrollplasmide (p18KT25-*zip*, pUT18-*zip*) dienten als Positivkontrolle. Die Testung der einzelnen Vektoren mit den leeren Vektoren p25C und p18C dient als Negativkontrolle. Jede Plasmidkombination wurde mindestens dreimal getestet.

3.13.2 Quantifizierung von Protein-Protein-Interaktionen mittels β -Galaktosidase-Assays

Ausgewählte B2H-Protein-Protein-Interaktionen wurden mittels β -Galaktosidase-Assay nach der Methode von Vidal-Aroca *et al.* quantifiziert [110]. Hierbei wird das Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactopyranosid (MUG) durch die β -Galaktosidase zum fluoreszierenden 4-Methylumbelliferyl (MU) gespalten. 6 bis 10 Transformanten wurden in Triplikaten in 1 ml Selektionsmedium (LB-Medium, 50 μ g/ml Kanamycin, 100 μ g/ml Ampicillin und Streptomycin, 0,5 mM IPTG) für 3 Tage bei 18 °C

inkubiert. 20 µl der Kultur wurde mit 80 µl Z-Puffer verdünnt und davon die OD₆₀₀ bestimmt. Anschließend wurden 25 µl MUG-Lösung (1 mg/ml MUG in DMSO) hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde die MUG-Hydrolyse mit 30 µl 1 M NaCO₃ gestoppt und die Fluoreszenzintensität (Anregung 355 nm, Emission 460 nm) gemessen. Die arbiträre Einheit der β-Galaktosidase-Aktivität (MUG Einheit) wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{MUG Einheit} = \frac{F_{355\text{nm}/460\text{nm}}}{t [\text{min}] \times \text{OD}_{600\text{nm}}}$$

Z-Puffer

16 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O
6,25 g NaH₂PO₄ x H₂O
0,75 g KCl
0,25 g MgSO₄ x 7 H₂O
in 1000 ml dH₂O

3.14 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Der MHK ist die geringste Konzentration einer Substanz, die das Wachstum einer Bakterienkultur hemmt. Für diese Untersuchung wurden die Übernachtskulturen der *S. aureus*-Stämme in Müller-Hinton-Medium auf OD₆₀₀ 0,05 verdünnt. Die Bakterien wurden in einem Volumen von 200 µl zusammen mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanz für 24 h bei 37 °C inkubiert. Bakterien ohne Substanz-Zugabe dienten als Wachstumskontrolle.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von Stk und Stp

4.1.1 Herstellung und Charakterisierung der α Stk-Antikörper

Als wichtiges Werkzeug für weiterführende Untersuchungen wie Western Blot-Analysen und Immunpräzipitationen wurden in Zusammenarbeit mit der Firma BioGenes (Berlin) monoklonale α Stk-Antikörper sowie die entsprechenden Antikörper-produzierenden Hybridome hergestellt. Die fünf Antikörper (Abbildung 8A) mit der stärksten Bindungsaffinität im ELISA (BioGenes) wurden unter unseren Laborbedingungen auf ihre Spezifität mittels Dot Blot und Western Blot getestet.

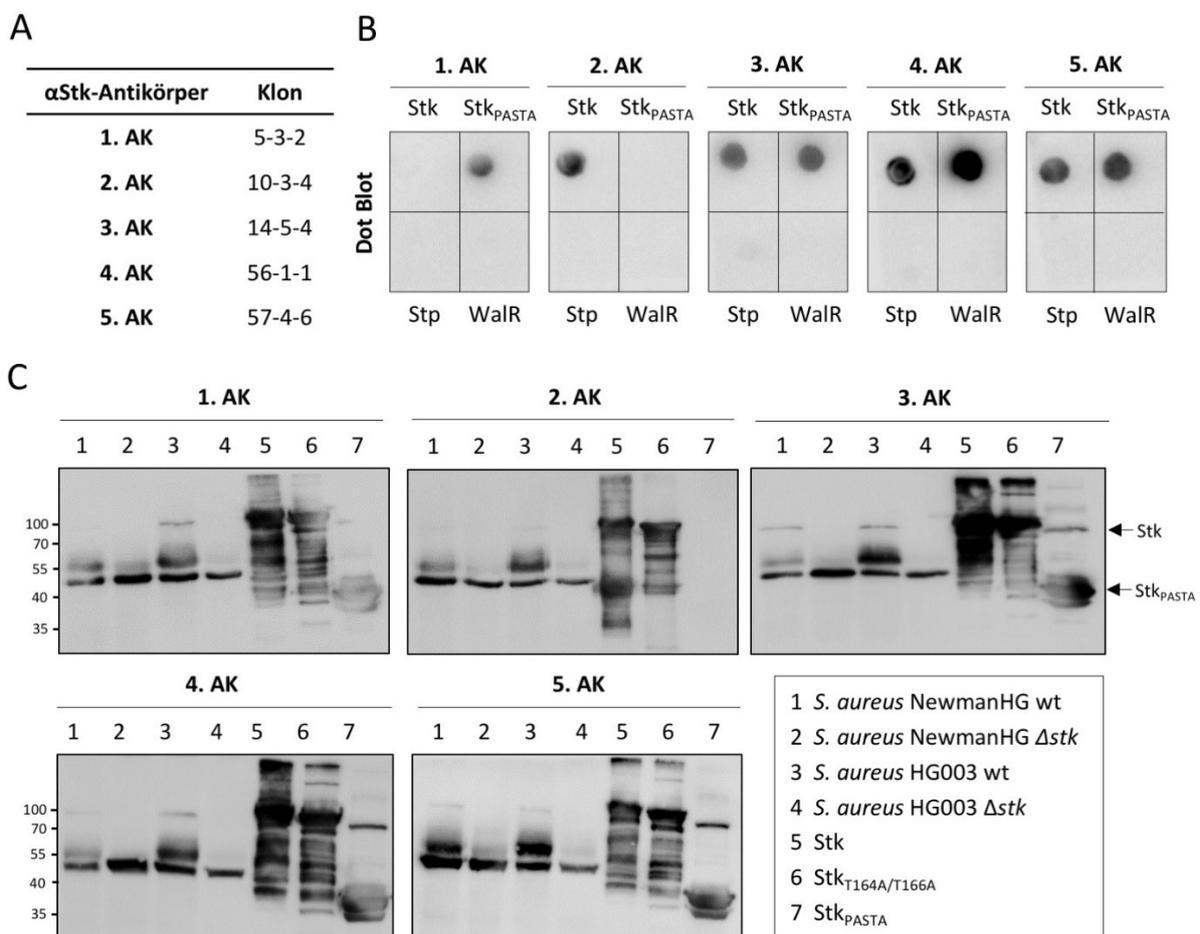


Abbildung 8: Überprüfung der α Stk-Antikörperspezifität.

(A) Übersicht der verschiedenen Hybridomklone, die monoklonale α Stk-Antikörper produzieren. (B) Im Dot Blot binden die α Stk-Antikörper an die native Protein Stk und die extrazellulären PASTA-Domänen von Stk (Stk_{PASTA}). WalR und Stp dienen als Negativkontrollen. (C) Überprüfung der Spezifität der α Stk-Antikörper mittels Western Blot. Zelllysate von *S. aureus* NewmanHG und HG003 wt und Δ stk, sowie die Proteine Stk, Stk_{PASTA} und Stk_{T164A/T166A} wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Stk mit dem jeweiligen α Stk-Antikörper im Western Blot nachgewiesen.

Zur Überprüfung der Bindung der monoklonalen Antikörper an natives Stk und der extrazellulären PASTA-Domänen von Stk (Stk_{PASTA}) wurde ein Dot Blot mit den nativen Proteinen durchgeführt (Abbildung 8B). Die Antikörper 3, 4 und 5 binden jeweils an ein Epitop der PASTA-Domänen, da die Antikörper sowohl für das komplette Stk-Protein als auch für Stk_{PASTA} ein Signal im Dot Blot lieferten. Dagegen bindet der Antikörper 2 (Klon 10-3-4) an ein Epitop der intrazellulären Kinasedomäne von Stk, da dieser Antikörper an Stk aber nicht an Stk_{PASTA} band. Der Antikörper 1 lieferte im Dot Blot ein widersprüchliches Ergebnis, da dieser nur für Stk_{PASTA} aber kein Signal für Stk lieferte. Die Proteine Stp und WalR dienten als Spezifitätskontrollen und zeigten erwartungsgemäß keine Signal.

Neben der Bindung der Antikörper an Stk unter nativen Bedingungen (Abbildung 8B) wurde die Bindung an denaturiertes Stk mittels Western Blot überprüft (Abbildung 8C). Dabei bestätigte sich das Bindungsmuster der Dot Blots. Der Antikörper 2 band an die intrazelluläre Kinasedomäne (keine Bindung an Stk_{PASTA}), während die Antikörper 3, 4 und 5 an die extrazellulären PASTA-Domänen banden (Signal für Stk und Stk_{PASTA}). Der Antikörper 1 band im Western Blot an Stk (100 kDa Bande) und Stk_{PASTA} (40 kDa Bande), sodass dieser Antikörper trotz des fehlenden Signals im Dot Blot ebenfalls ein spezifischer Anti-Stk_{PASTA}-Antikörper ist. Die Antikörper banden an die rekombinanten Stk-Proteine und an das Stk-Protein aus den verschiedenen Zelllysaten (*S. aureus* NewmanHG und HG003). Die Δ stk-Zelllysate dienten als Negativkontrolle und zeigten zwei unspezifische Signale bei 55 kDa und 50 kDa, welche vermutlich auf die Antikörper-bindenden Proteine Spa und Sbi zurückzuführen sind. Die rekombinanten Proteine Stk und Stk_{PASTA} degradierten unter denaturierenden Bedingungen, da im Western Blot multiple Banden auftraten. Die genauen Antikörperbindungsepitope an Stk lassen sich mit diesen beiden Methoden nicht vorhersagen.

Die fünf Antikörper-produzierenden Hybridomklone (Abbildung 8A) werden in flüssigen Stickstoff aufbewahrt und die entsprechenden Zellkulturüberstände sind bei -80 °C gelagert. In den folgenden Western Blot-Analysen wurde aus Gründen der Reproduzierbarkeit stets der Antikörper 3 (Klon 14-5-4) als α Stk verwendet. In einigen Versuchen wurde außerdem der Kinasedomäne-bindende Antikörper 2 (Klon 10-3-4) als α Stk_{KD} verwendet.

4.1.2 Native Konformation von Stk

Zur Beantwortung der Frage, ob Stk möglicherweise dimerisiert oder in einem größeren Proteinkomplex assoziiert ist, wurde eine Blau-Native-Gelelektrophorese (BN-PAGE) von *S. aureus* NewmanHG Δspa durchgeführt (Abbildung 9). Hierbei wurde eine *spa*-Mutante verwendet, um unspezifische Banden durch Spa im Western Blot zu vermeiden. Es wurden native *S. aureus* NewmanHG Δspa -Lysate vom Wildtyp und Δstk mittels BN-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Membran geblottet. Für Stk konnte mithilfe des α Stk-Antikörpers ein Molekulargewicht von ungefähr 250 kDa ermittelt werden. Aufgrund der zahlreichen unspezifischen Bindungen des murinen α Stp-Antiserums im denaturieren Western Blot wurde für Stp keine BN-PAGE durchgeführt. Abschließend ist festzuhalten, dass Stk (100 kDa in SDS-PAGE) wohl in einem Protein-komplex (250 kDa in BN-PAGE) gebunden ist.

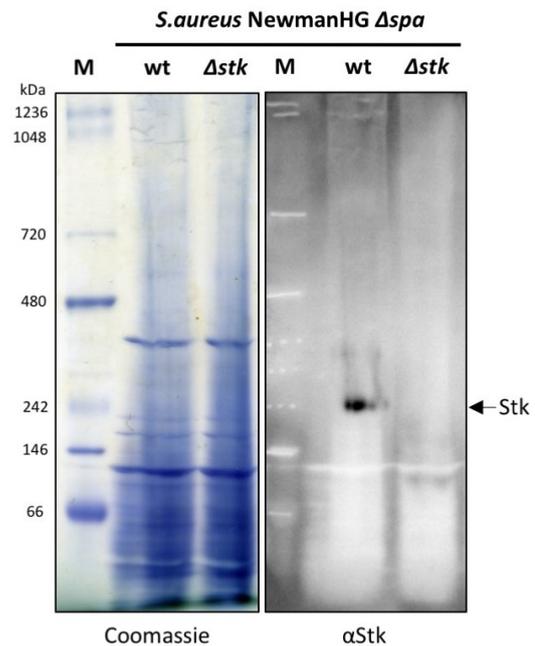


Abbildung 9: Stk-Proteinkomplex-Analyse mittels BN-PAGE.

Natives *S. aureus* NewmanHG Δspa -Lysat (200 μ g pro Spur) wurde der Größe nach in einer BN-PAGE aufgetrennt und anschließend wurde Stk mittels Western Blot bei einem Molekulargewicht von 250 kDa detektiert. Als Negativkontrolle diente *S. aureus* NewmanHG $\Delta spa\Delta stk$. Der Größenstandard *NativMarker* (M) diente der Größenabschätzung der Proteine in kDa.

4.1.3 Zelluläre Lokalisation von Stk und Stp

Laut Datenbanken (Uniprot, AureoWiki) ist Stk in der Zellmembran und Stp im Zytosol lokalisiert. Im folgenden Abschnitt wurde die Lokalisation von Stk und Stp in der Bakterienzelle genauer untersucht. Das *S. aureus* NewmanHG-Gesamtzelllysat wurde in die einzelnen zellulären Fraktionen Zytosol, Zellmembran, Zellwand und Sekretom aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot analysiert. Dabei wurden die Fraktionen mit dem α Stk-Antikörper (Abschnitt 4.1.1) oder einem murinen α Stp-Antiserum inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch Anti-Maus-HRP-Antikörper und ECL-Substrat.

Stk war erwartungsgemäß im Gesamtzelllysat sowie in der Membran- und Zellwandfraktion nachweisbar (100 kDa Bande) (Abbildung 10). Die schwache Bande in der Zytosolfraktion ist vermutlich auf eine ungenügende Abtrennung von der Membranfraktion zurückzuführen. Im Zellkulturüberstand war Stk nicht nachweisbar. Da in der *stk*-Mutante erwartungsgemäß keine Stk-Bande nachweisbar war, sind die Stk-Banden im Wildtyp-Western Blot als spezifisch anzusehen. Die 50 kDa und 55 kDa Banden in der *stk*-Mutante basieren wohl auf die Antikörper-bindenden Proteine Spa und Sbi.

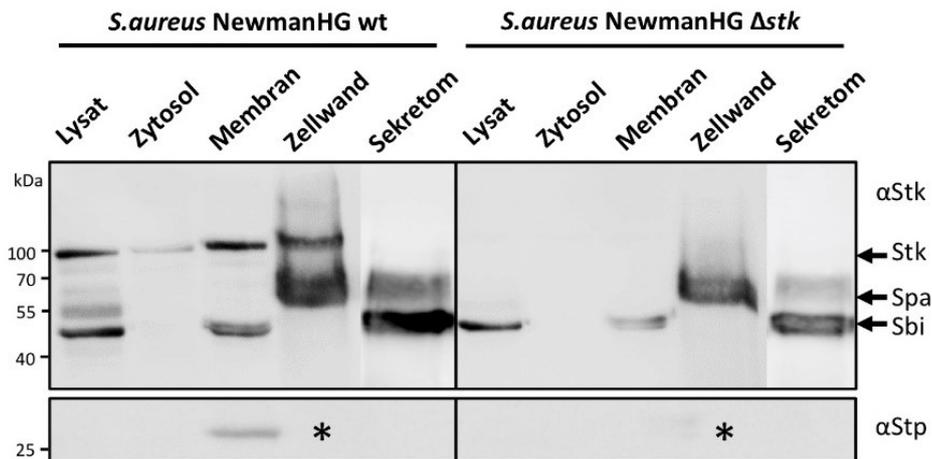


Abbildung 10: Stk und Stp sind in der Zellmembran lokalisiert.

Western Blot-Analysen der verschiedenen Zellfraktionen von *S. aureus* NewmanHG wt. Der Nachweise von Stk und Stp erfolgte mittels α Stk und dem murinen α Stp-Antiserum. Stk konnte in der Gesamtzelllysat-, Membran- und Zellwandfraktion nachgewiesen werden. Stp war nur in der Membranfraktion nachweisbar. Als Negativkontrollen dienten die Zellfraktionen von *S. aureus* NewmanHG Δ stk (Blot oben rechts) bzw. Δ stp (Blot unten rechts). Die markierte Zellwandfraktion (*) fehlte aufgrund technischer Schwierigkeiten in den α Stp-Western Blots.

Interessanterweise war Stp nicht in der Zytosol- sondern in der Membranfraktion nachweisbar. Das murine α Stp-Antiserum zeigt im Gesamtzelllysat eine sehr schwache Bindung an Stp (28 kDa Bande). Daher wurde vermutlich Stp in der Membranfraktion stark angereicht. In der *stp*-Mutante war erwartungsgemäß Stp in keiner Fraktion nachweisbar. Die Zellwandfraktion wurde im α Stp-Western Blot nicht untersucht. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Stp als vorhergesagtes, zytosolisches Protein an der Zellmembran lokalisiert ist und nicht im Zytosol nachweisbar war. Stk kommt in der Membran- und Zellwandfraktion vor.

4.1.4 In *S. aureus* NewmanHG Δ stp akkumulieren Phosphoproteine

In diesem Versuchsteil wurde das Phosphorylierungsmuster der Stämme in verschiedenen Wachstumsphasen mittels Phosphothreonin-Western Blots (α P-Thr) untersucht. Der polyklonale α P-Thr-Antikörper detektiert phosphorylierte Threoninreste unabhängig von der umgebenden Aminosäuresequenz des Proteins, sodass dieser Antikörper ein großes Spektrum an phosphorylierten Proteinen detektieren kann.

Die untersuchten Stämme wiesen ein ähnliches Wachstumsprofil auf (Abbildung 11B), sodass die Wachstumsphasen zu den jeweiligen Zeitpunkten zwischen den verschiedenen Stämmen vergleichbar waren. Bei einer optischen Dichte von 2 war eine Phosphorylierung von Stk (100 kDa-Bande) im Wildtyp erkennbar (Abbildung 11A). Diese *in vivo* Phosphorylierung war in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante aufgrund der Abwesenheit von Stk erwartungsgemäß nicht nachweisbar. Interessanterweise war Stk in der *stp*-Mutante deutlich stärker phosphoryliert (kräftige 100 kDa-Bande) als im Wildtyp. Durch die Abwesenheit von Stp in der *stp*-Mutante scheint in diesen Zellen phosphoryliertes Stk zu akkumulieren. Außerdem waren in der *stp*-Mutante weitere phosphorylierte Proteine nachweisbar

(drei Banden zwischen 30 und 40 kDa und zwei Banden zwischen 55 und 70 kDa), die ausschließlich in dieser Mutante vorkamen. Interessanterweise zeigte der Wildtyp mit Ausnahme der Stk-Bande das gleiche Phosphorylierungsmuster wie die *stk*- und *stk/stp*-Mutante. Trotzdem waren in allen Mutanten neben den Antikörper-bindenden Proteinen Sbi und Spa (50 und 55 kDa-Bande) weitere phosphorylierte Proteine (80 kDa, 35 kDa und ca. 27 kDa Bande) nachweisbar, die unabhängig von Stk und Stp in den Zellen phosphoryliert waren. Der α Stk- und α Stp-Western Blot diente dem jeweiligen Nachweis der fehlenden Proteinexpression von Stk und Stp in den entsprechenden Mutanten.

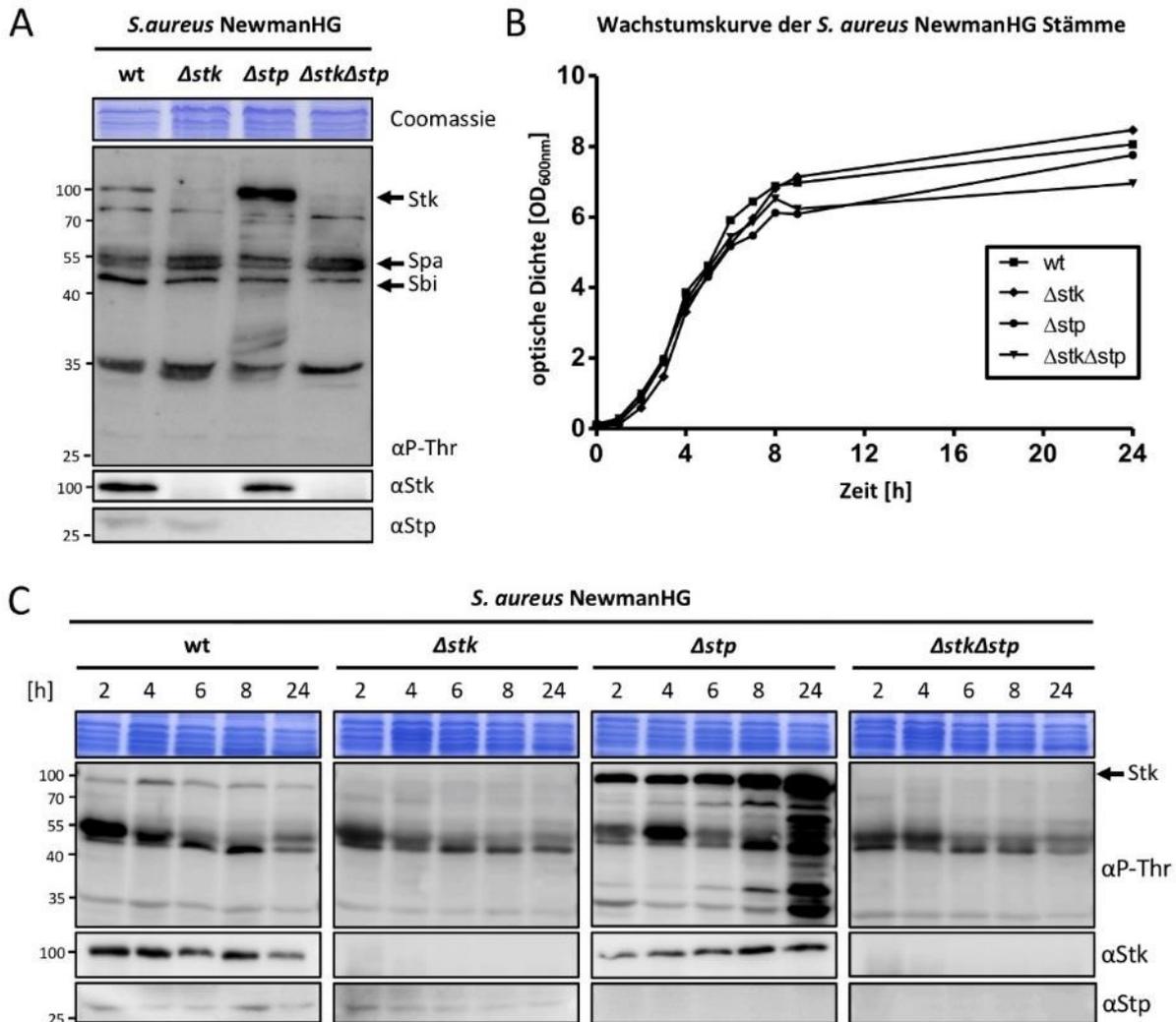


Abbildung 11: Phosphoproteom der *S. aureus*-Stämmen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase.

(A) Phosphothreonin-Western Blot (α P-Thr) der *S. aureus* NewmanHG-Stämme während einer OD_{600} von 2. (B) Wachstumskurven der Stämme im Zeitraum von 24 h. (C) α P-Thr-Western Blots der Stämme aus verschiedenen Wachstumsphasen. Als Ladekontrolle diente ein Ausschnitt aus dem entsprechenden Coomassie-gefärbten Gel. Die Stk- und Stp-Expression in den Mutanten wurden mithilfe von α Stk bzw. α Stp-Antiserum detektiert.

Der α Stk-Western Blot (Abbildung 11C) zeigte eine stärkere Expression von Stk in der frühen exponentiellen Wachstumsphase (2 - 4 h), während in der stationären Phase (24 h) deutlich weniger Stk exprimiert wurde. Hingegen scheint die Expression von Stk in der *stp*-Mutante im zunehmenden Wachstumsverlauf stetig stärker exprimiert zu werden. Aufgrund der geringen Signalintensität der

α Stp-Western Blots im Wildtyp und der *stk*-Mutante lässt sich keine konkrete Aussage zum Expressionsprofil von Stp treffen. Erwartungsgemäß waren Stk bzw. Stp in den jeweiligen Mutanten nicht nachweisbar.

Der α P-Thr-Western Blot offenbarte im Wildtyp den stärksten Phosphorylierungsgrad von Stk während der exponentiellen Wachstumsphase (4 h). Im fortschreitenden Wachstum nahm der Phosphorylierungsgrad von Stk wieder ab (6 – 24 h). Hingegen war das Phosphorylierungssignal in der *stp*-Mutante schon in der frühen exponentiellen Wachstumsphase deutlich stärker als im Wildtyp. Die Phosphorylierung von Stk und zehn unbekannt Proteinen nahm im weiteren Wachstumsverlauf deutlich zu. In der *stp*-Mutante akkumulierten phosphorylierte Proteine während der stationären Wachstumsphase (24 h). Das Phosphorylierungsmuster der *stk*- und *stk/stp*-Mutante war mit Ausnahme der fehlenden Stk-Phosphorylierung vergleichbar mit dem Wildtyp. In diesen drei Stämmen war eine Stk/Stp-unabhängige Hintergrundphosphorylierung erkennbar.

Neben dem Phosphorylierungsmuster konnte als Nebenbefund der α P-Thr-Western Blots die Expression der Antikörper-bindenden Proteine Spa und Sbi in den verschiedenen Stämmen bewertet werden. Im Wildtyp und der *stk*- sowie *stk/stp*-Mutante war Spa (55 kDa-Bande) in der frühen exponentiellen Phase am stärksten exprimiert (2 h) und nahm im Laufe der exponentiellen Wachstumsphase deutlich ab. In der *stp*-Mutante war die stärkste Spa-Expression in der exponentiellen Wachstumsphase (4 h) zu beobachten und nahm anschließend ebenfalls ab. Das Sbi-Protein (50 kDa-Bande) zeigte seine stärkste Expression im Wildtyp und der *stk*- sowie *stk/stp*-Mutante während des Übergangs von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase (6 – 8 h). In der *stp*-Mutante war die Sbi-Expression zu Beginn der stationären Phase (8 h) am stärksten. Die Expression von Sbi und Spa konnten in der stationären Phase von der *stp*-Mutante nicht bewertet werden, da die Signale von phosphorylierten Proteinen die Signale von Spa und Sbi möglicherweise überlagern.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass Stk und andere Proteine *in vivo* phosphoryliert sind und dass sich diese Phosphorylierungen in der *stp*-Mutante massiv anreichern. Aufgrund der wenigen phosphorylierten Proteine im Wildtyp ist das Phosphorylierungsgleichgewicht zugunsten der Phosphatase verschoben. Durch die *stp*-Deletion kommt es in der stationären Phase zu einer massiven Akkumulation von phosphorylierten Proteinen, sodass in diesem Falle das Phosphorylierungsgleichgewicht zugunsten der Kinase verschoben ist. In allen Stämmen ist ein Stk/Stp-unabhängige Hintergrundphosphorylierung nachweisbar.

4.2 Stk und Stp regulieren Zellwandbiosyntheseenzyme

4.2.1 Die Zellwand von *S. aureus* NewmanHG Δstp ist deutlich dicker

Zur Identifizierung morphologischer Unterschiede zwischen *S. aureus* NewmanHG Wildtyp und den isogenen Mutanten (Δstk , Δstp , and $\Delta stk\Delta stp$) wurden Aufnahmen mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM) angefertigt (Abbildung 12). Die TEM-Aufnahmen erfolgten mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Christian Stigloher (Universität Würzburg). Die Zellgröße und Zellwanddicke der *S. aureus*-Stämme in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase wurden ermittelt und statistisch ausgewertet.

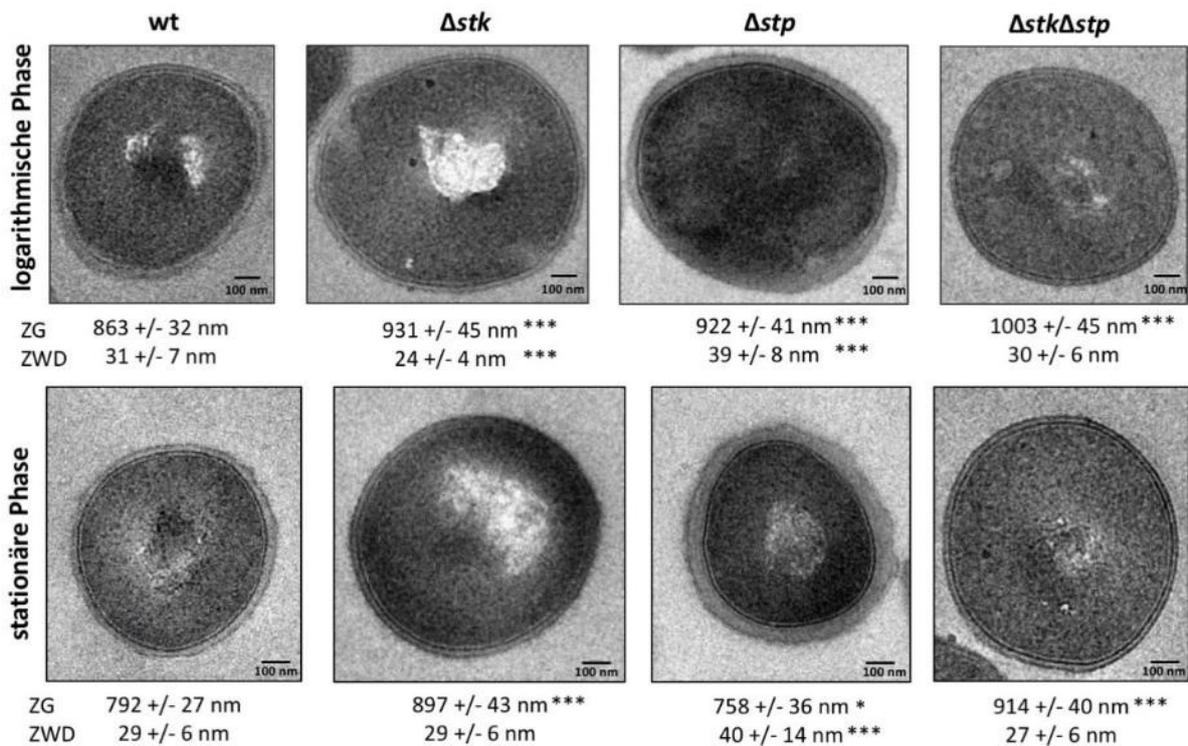


Abbildung 12: Zellwand-Analyse der *S. aureus*-Stämme mittels TEM.

Die durchschnittliche Zellgröße (ZG) und die Zellwanddicke (ZWD) der Stämme in den beiden Wachstumsphasen wurde mittels TEM analysiert. Die ermittelten Werte basieren auf den 20 größten von 100 Zellen des jeweiligen Stamms. Die durchschnittliche Zellwanddicke wurde an fünf verschiedenen Stellen der Zellwand einer Zelle bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung ($n=20$). Die statistische Signifikanz wurde mittels *One-way ANOVA* berechnet (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Die Abbildungen zeigen jeweils eine repräsentative Zelle jedes Stamms in der entsprechenden Wachstumsphase. Die Abbildungen wurden modifiziert nach Jarick *et al.* [94].

Bakterienzellen der logarithmischen Phase waren generell 10 % größer als Zellen der stationären Phase, wobei die Mutanten in der logarithmischen Phase signifikant größer waren als die Wildtypzellen (8 % Δstk , 7 % Δstp und 16 % $\Delta stk\Delta stp$). In der stationären Phase waren die Δstk - und $\Delta stk\Delta stp$ -Zellen 15 % größer als die Wildtypzellen. Hingegen waren die Δstp -Zellen 4 % kleiner als der Wildtyp. Die Zellwände der Δstp -Zellen waren in der logarithmischen (26 %) und in der stationären Phase (38 %) signifikant dicker als die Zellwände des entsprechenden Wildtyps. Die Zellwanddicken der anderen

Stämme waren in beiden Wachstumsphasen unverändert. Ein Ausnahmefall war die signifikant dünnere Zellwand der Δstk -Zellen in der logarithmischen Phase (23 % dünner im Vergleich zum Wildtyp).

4.2.2 Die Zusammensetzung der Muropeptide *stp*-Mutante ist verändert

Auf Grundlage der verdickten Zellwand der *stp*-Mutante wurden die Muropeptide der Zellwände der verschiedenen Stämme in beiden Wachstumsphasen analysiert. Das PGN der verschiedenen Stämme wurden isoliert, mit Mutanolysin in Muropeptide (Monomere bis Oligomere) gespalten und diese Muropeptide anschließend mittels UPLC-Massenspektrometrie identifiziert. Der Verdau, die Messung und die Identifizierung der Muropeptide wurden von Dr. Ute Bertsche (Universität Tübingen & Hohenheim) durchgeführt.

Die UPLC-Chromatogramme der verschiedenen Stämme in den beiden Wachstumsphasen sind in der Abbildung 13 dargestellt. Auf Grundlage der Retentionszeit und der Masse konnten den Peaks die entsprechenden Muropeptide zugeordnet werden (Tabelle 14). Dabei konnten in allen Proben die typischerweise in *S. aureus* vorkommenden Muropeptide identifiziert werden: Das Monomer Penta-Gly₅ (Peak 3), das quervernetzte Dimer Penta-Gly₅-Tetra-Gly₅ (Peak 6) und das Trimer Penta-Gly₅-Tetra-Gly₅-Tetra-Gly₅ (Peak 9). Mit Ausnahme der stationären *stp*-Mutante glichen sich alle Muropeptidprofile der verschiedenen Stämme. In der *stp*-Mutante akkumulierten in der stationären Wachstumsphase Muropeptide mit unvollständigen Interpeptidbrücken. Den unvollständigen Muropeptiden wie Penta (Peak 1), Penta-Gly₅-Tetra (Peak 5) und Penta-Gly₅-Tetra-Gly₅-Tetra (Peak 8) fehlte jeweils eine Pentaglycin-Interpeptidbrücke. Ebenso konnten veränderte Muropeptide mit Monoglycin (Penta-Gly [Peak 2]), mit Monoalanin (Penta-Ala [Peak 4] und Penta-Gly₅-Tetra-Ala [Peak 7]) oder Glycin-Alanin (Penta-Gly₅-Tetra-Gly₅-Tetra-Ala-Gly [Peak 10]) als Interpeptidbrücke festgestellt werden. Die entsprechenden Peaks im Chromatogramm zeigen, dass diese Muropeptide auch in den anderen Stämmen jedoch mit einem deutlich niedrigeren Vorkommen nachgewiesen werden konnten.

Veränderungen in den Interpeptidbrücken von Muropeptiden in *S. aureus* haben oft einen Einfluss auf deren Muropeptid-Quervernetzung. Der Quervernetzungsgrad der Muropeptide untereinander wies jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen auf und lag bei allen Stämmen in beiden Wachstumsphasen zwischen 72 % und 74 % (Tabelle 15). Außerdem konnten keine stammspezifischen Unterschiede im Deacetylierungsgrad der Muropeptid-Zuckerreste und der Glutamat-Amidierung am Stammpeptid festgestellt werden.

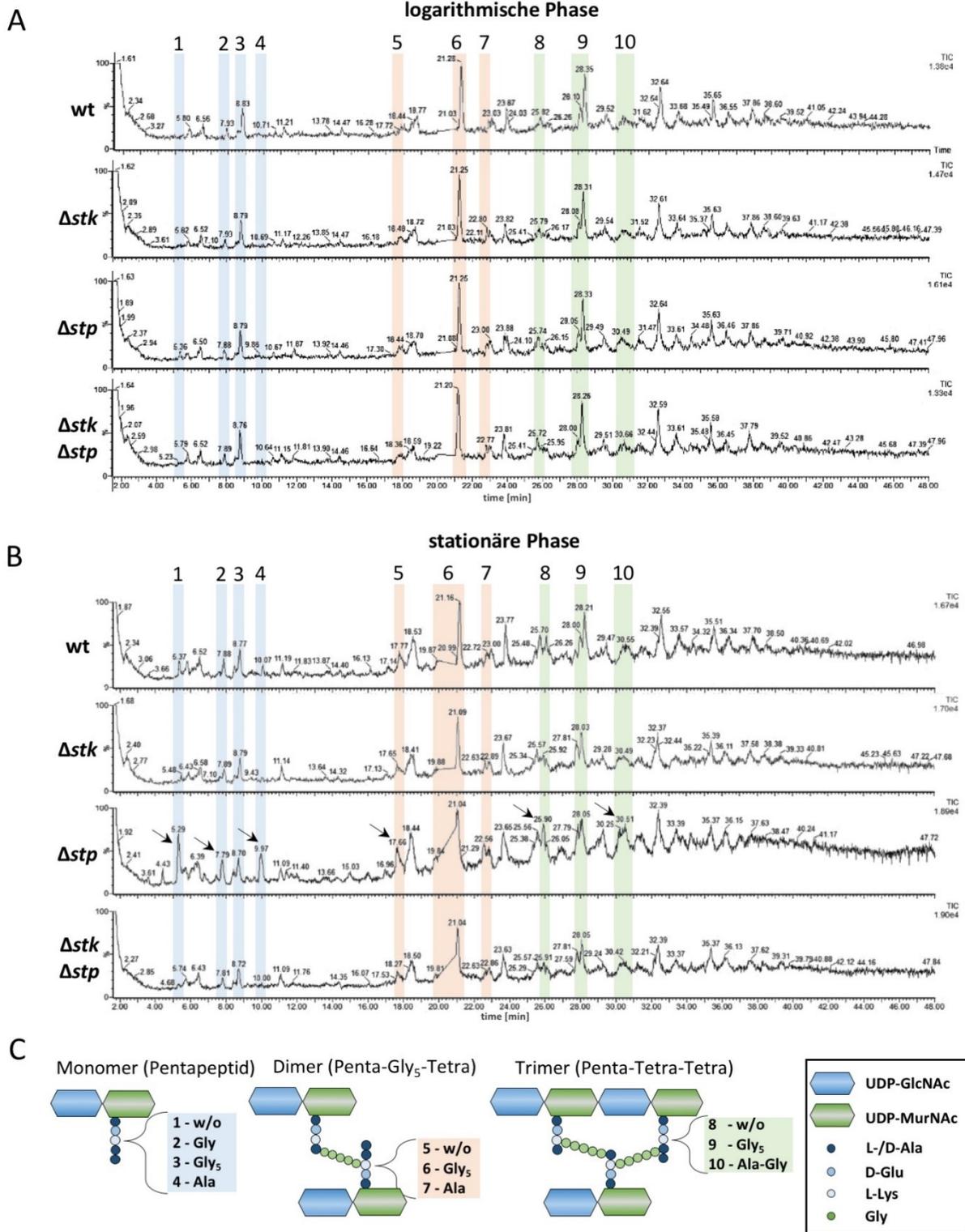


Abbildung 13: Muropeptid-Analyse der *S. aureus*-Stämme mittels UPLC-MS.

Die Zellwände der Stämme aus der logarithmischen (A) und stationären Phase (B) wurden isoliert, mit Mutanolysin verdaut und mittels UPLC-MS wurden die Muropeptide bestimmt. Die Massen und Retentionszeiten der einzelnen Peaks sind in der Tabelle 14 aufgeführt. Die Interpretation der einzelnen Peaks ist schematisch in (C) dargestellt. Das Chromatogramm der *stp*-Mutante in der stationären Phase zeigt eine Akkumulation von Muropeptiden, welche unvollständige oder veränderte Interpeptidbrücken aufweisen. Diese auffälligen Muropeptide sind im Chromatogramm (Peak 1, 2, 4, 5, 8 und 10) mit einem Pfeil hervorgehoben. Die Abbildung wurde modifiziert nach Jarick *et al.* [94].

4.2.3 *S. aureus* NewmanHG Δstp ist resistenter gegenüber Lysostaphin

Angesichts der verdickten Zellwand und des veränderten Muropeptidprofils der *stp*-Mutante wurde die Stabilität der Zellwand mithilfe von Lysostaphin untersucht. Lysostaphin ist eine Endopeptidase, welche die Interpeptidbrücken des PGN von *S. aureus* zwischen dem dritten und vierten Glycin spaltet und folglich eine Lyse von *S. aureus* bewirkt.

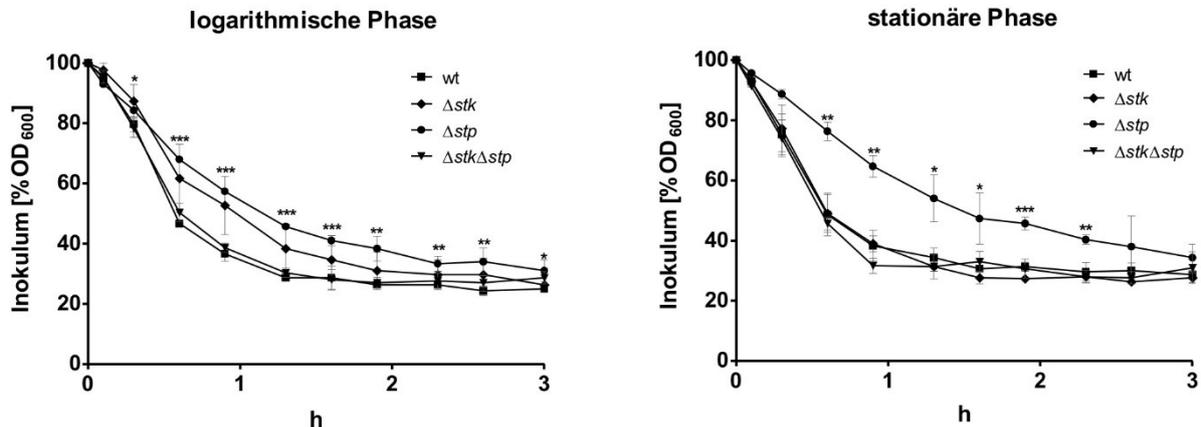


Abbildung 14: Lysostaphin-Empfindlichkeit der *S. aureus*-Stämme.

Die Bakterien wurden mit 0,5 µg/ml Lysostaphin für 3 h bei 37 °C inkubiert und die Lyse der Bakterien wurde mithilfe der Abnahme der optischen Dichte (% OD_{600nm}) dokumentiert. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt und die Standardabweichung ist an den entsprechenden Messpunkten zu erkennen. Die statistische Signifikanz der ermittelten Werte wurde mit dem ungepaarten t-Test berechnet (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Die Abbildungen wurden modifiziert nach Jarick *et al.* [94].

Zur Bewertung der Lysostaphin-Empfindlichkeit wurde der Zeitpunkt der halbmaximalen Bakterienlyse (50 % OD₆₀₀ bei t=0 min) verwendet. Die Zellen der stationären *stp*-Mutante erreichten die halbmaximale Bakterienlyse 85 min nach der initialen Lysostaphin-Behandlung, wohingegen die anderen Stämme in der stationären Phase nach 35 min lysierten. In der logarithmischen Phase benötigten die Zellen des Wildtyps und der Doppelmutante 35 min. Darüber hinausgehend lysierten die Zellen der *stk*- und der *stp*-Mutanten nach 60 min bzw. 78 min. Somit waren die Zellen der *stp*-Mutante in der logarithmischen Phase empfindlicher gegenüber Lysostaphin im Vergleich zur stationären Phase. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die *S. aureus stp*-Mutante im Vergleich zu den anderen Stämmen weniger empfindlich gegenüber Lysostaphin ist.

4.2.4 *Stk* und *Stp* beeinflussen die Konzentration von PGN-Verläufermetaboliten

Infolge des auffälligen Zellwandphänotyps der *stp*-Mutante wurden die intrazellulären PGN-Vorläufer der verschiedenen Stämme in beiden Wachstumsphasen analysiert. Im Rahmen der Metabolom-Analyse (Abschnitt 4.3.6) wurden die Metaboliten isoliert und anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die Messung und die Identifizierung der Metaboliten wurden von Daniel Schultz (AG Lalk, Universität Greifswald) durchgeführt.

Es konnten alle löslichen, intrazellulären Metaboliten der Zellwandsynthese in beiden Wachstumsphasen nachgewiesen werden (Abbildung 15). Dabei wurden alle PGN-Vorläufer beginnend vom UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) und der UDP-*N*-Acetylmuraminsäure (UDP-MurNAc) bis zum Park's Nukleotid (UDP-MurNAc-Ala-Glu-Lys-Ala-Ala) quantifiziert. Jedoch konnte UDP-MurNAc-Ala-Glu-Lys nur in der logarithmischen und nicht in der stationären Phase detektiert und quantifiziert werden.

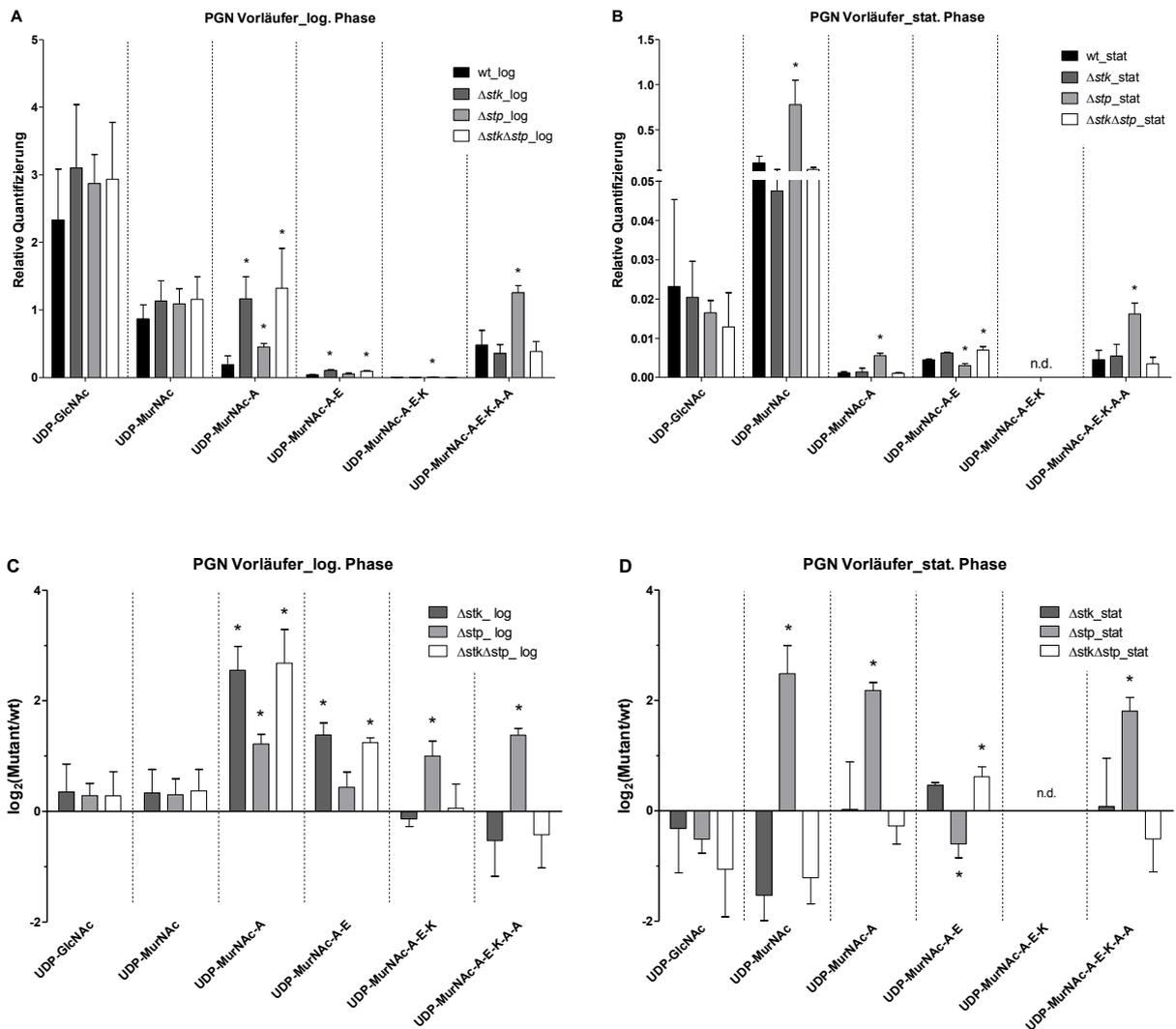


Abbildung 15: Zellwandvorläufer-Analyse der *S. aureus*-Stämme mittels LC-MS.

Die Balkendiagramme repräsentieren die relativen PGN-Vorläuferkonzentrationen (A, B) bzw. die Verhältnisse der PGN-Vorläufer der Mutanten zum Wildtyp (C, D), welche aus den *S. aureus*-Stämmen der logarithmischen und stationären Phase isoliert wurden. Die PGN-Vorläuferkonzentrationen wurden auf einen internen Standard normalisiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung (n=4). Die statistische Signifikanz wurde mittels nicht parametrischem, ungepaartem *Mann-Whitney*-Test berechnet (* $p < 0,05$; n.d. nicht detektierbar). Die Abbildungen wurden modifiziert nach Jarick *et al.* [94].

Einzelne PGN-Vorläufer waren in der logarithmischen Phase abundanter als in der stationären Phase. In der logarithmischen Phase war UDP-GlcNAc in allen Stämmen der am häufigsten vorkommende Zellwandmetabolit. Hingegen war UDP-MurNAc-Ala-Glu-Lys nur im geringen Maße nachweisbar

(Abbildung 15A). In der stationären Phase waren alle PGN-Vorläufer mit Ausnahme von UDP-MurNAc bis nahe des Detektionslimits reduziert (Abbildung 15B). UDP-MurNAc-Ala-Glu-Lys war in der stationären Phase nicht mehr nachweisbar. Im Vergleich zur logarithmischen Phase blieb in der stationären Phase die Konzentration von UDP-MurNAc nahezu konstant, während es bei UDP-GlcNAc zu einer Konzentrationsabnahme um den Faktor 100 kam. Darüber hinausgehend war der Pool an frühen PGN-Vorläufern wie UDP-GlcNAc und UDP-MurNAc in beiden Wachstumsphasen größer als die nachfolgenden PGN-Metaboliten.

In der logarithmischen Phase war eine signifikante Anreicherung von UDP-MurNAc-Ala (6- bzw. 6,5-fach) und UDP-MurNAc-Ala-Glu (2,6- bzw. 2,3-fach) in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante gegenüber dem Wildtyp evident. Nachfolgende PGN-Vorläufer wie UDP-MurNAc-Ala-Glu-Lys und UDP-MurNAc-Ala-Glu-Lys-Ala-Ala (1,5- bzw. 1,3-fach) zeigten in beiden Stämmen keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Hingegen reicherten sich in der *stp*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp UDP-MurNAc-Ala (2,3-fach), UDP-MurNAc-Ala-Glu-Lys (2,0-fach) und UDP-MurNAc-Ala-Glu-Lys-Ala-Ala (2,6-fach) in signifikanten Mengen an. In der stationären Phase wiesen die *stk*- und *stk/stp*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Veränderungen in den PGN-Vorläuferkonzentrationen auf. Die Akkumulation von UDP-MurNAc-Ala-Glu in der *stk/stp*-Mutante um den Faktor 1,5 bildete hierbei eine Ausnahme. Hingegen wies die *stp*-Mutante gegenüber dem Wildtyp eine signifikante Abnahme von UDP-MurNAc-Ala-Glu um das 1,5-fache auf. Außerdem kam es zur signifikanten Zunahme von UDP-MurNAc (5,5-fach), UDP-MurNAc-Ala (4,6-fach) und UDP-MurNAc-Ala-Glu-Lys-Ala-Ala (1,6-fach) in der *stp*-Mutante. Der prägnanteste Aspekt aus der Metabolom-Analyse war die Akkumulation von PGN-Vorläufern in den *stp*-Mutanten beider Wachstumsphasen, während *stk*- und *stk/stp*-Mutante z.T. widersprüchliche Effekte auf die PGN-Vorläufersynthese offenbarten.

4.2.5 Stk interagiert mit Zellwandsynthese- und Zellteilungsproteinen

Auf Grundlage der veränderten Zellwand und den veränderten Metabolitkonzentrationen in der *stp*-Mutante wurden mithilfe des B2H-Systems direkte Protein-Protein-Interaktionen von Stk bzw. Stp und Zellwandsynthese- und Zellteilungsproteinen untersucht. Dazu wurden die Interaktionen von Stk und Stp mit den Zellwandsynthese- und Zellteilungsproteinen semiquantitativ im Spotassay getestet (Abbildung 16) und ausgewählte Interaktionen im β -Galaktosidase-Assay quantifiziert (Abbildung 17).

Stk interagiert mit den Membran-assoziierten Zellwandsyntheseenzymen (MurG, FemA, FemB, Pbp1, Pbp2, Pbp3, RodA), der Zellwandhydrolase LytH, der Transglycosylase Mgt und den Zellteilungsproteinen (DivIB, DivIC, EzrA, FtsW). Der β -Galaktosidase-Assay bestätigte die Interaktionen von Stk mit MurG, FemA und FemB. Hingegen interagiert Stk nicht mit den Zellwandsyntheseenzymen (GlmS, GlmM, GlmU, MurA bis MurF, Murl, Ddl, FemX, Pbp4), den Zellwandhydrolasen Sle1 und SsaA, der Acetyltransferase OatA und den Zellteilung-assoziierten Proteinen (GpsB and FtsA). Aufgrund der

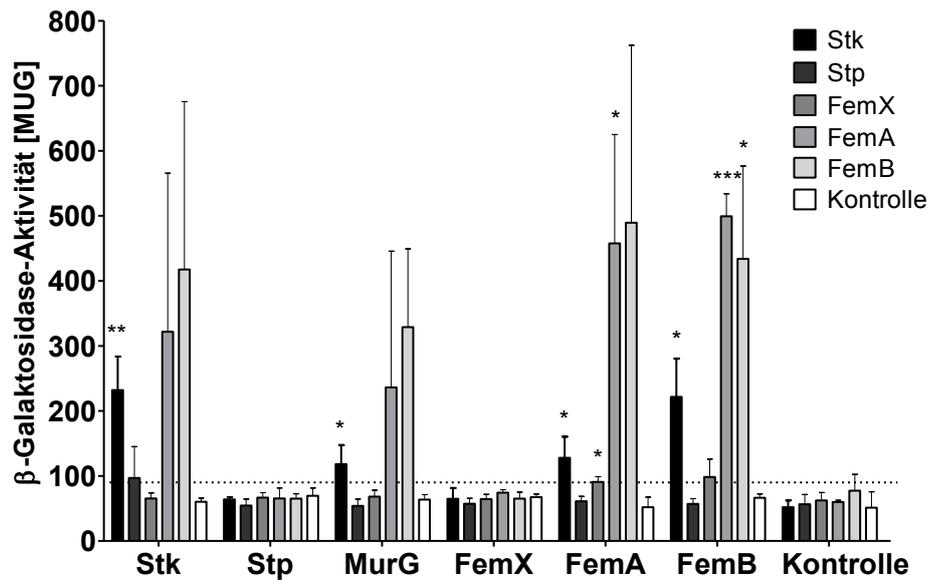


Abbildung 17: Quantifizierung ausgewählter Stk-Interaktionspartner mittels β -Galaktosidase-Assays.

Für die Quantifizierung ausgewählter Interaktionen wurde die β -Galaktosidase-Aktivität der interagierenden Fusionsproteine mithilfe des fluorogenen Substrats MUG bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Der Schwellenwert von 90 MUG-Einheiten basierte auf dem niedrigsten signifikant erhöhten Wert (FemA-FemA-Interaktion) aller getesteten Interaktionen und ist durch die horizontale, gepunktete Linie gekennzeichnet.

Infolge der veränderten Muropeptid-Interpeptidbrücken in der *stp*-Mutante waren die Pentaglycinsynthetisierenden Proteine FemX, FemA und FemB von besonderem Interesse. Daher wurden diese Proteine ebenfalls mit allen Zellwandsynthese- und Zellteilungsproteinen getestet. FemA und FemB bildeten jeweils Homodimere und interagierten miteinander im Spotassay und β -Galaktosidase-Assay. Hingegen interagierte FemX weder mit sich selbst noch mit FemA und FemB in beiden Assays. FemX interagierte schwach mit Pbp2, DivIC und EzrA im Spotassay. Dagegen interagierten FemA und FemB mit Stk sowie einigen Zellwandsyntheseenzymen (MurG, Pbp1, Pbp2, RodA), Mgt, LytH und Zellteilungsproteinen (DivIB, DivIC, EzrA, FtsW). Damit interagierten FemA und FemB mit beinahe den gleichen Proteinen wie die Kinase Stk. Das Interaktionsnetzwerk von Stk, Stp, FemX, FemA und FemB in Bezug auf die Zellwandsynthese und Zellteilung ist in der Abbildung 18 zusammengefasst.

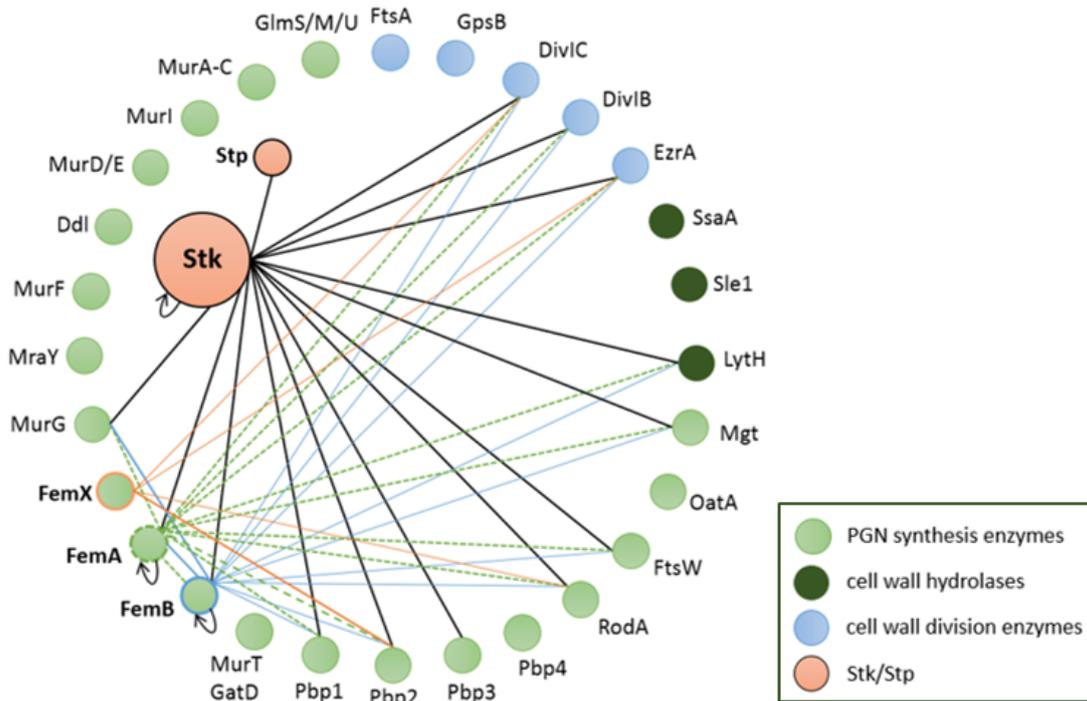


Abbildung 18: Interaktionsnetzwerk von Stk, Stp und FemXAB mit Zellwandsynthese- und Zellteilungsproteinen.

Die Abbildung zeigt eine Übersicht der getesteten Protein-Protein-Interaktionen basierend auf den B2H-Analysen. Interaktionen zwischen Proteinen sind jeweils mit einer Linie dargestellt. Die Dimerisierungen von Stk, FemA und FemB sind mit einem rückgeführten Pfeil gekennzeichnet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Jarick *et al.* [94].

4.2.6 FemX wird *in vitro* durch Stk phosphoryliert und durch Stp dephosphoryliert

Infolge der Interaktionen von Stk mit FemA und FemB wurde mittels *in vitro* Kinase-Assay überprüft, ob Stk FemX, FemA und FemB phosphorylieren kann. Darauf aufbauend wurde untersucht, ob Stp die Stk-abhängigen Phosphorylierungsstellen wieder dephosphorylieren kann (Abbildung 19). Der *in vitro* Kinase-Assay mit anschließendem α P-Thr-Western Blot zeigte, dass die Kinasedomäne Stk_{KD} nur FemX (zweite Spur; 48 kDa-Bande) aber nicht FemA (sechste Spur, 49 kDa) und FemB (zehnte Spur, 49 kDa) phosphorylierte (Abbildung 19A). Die Zugabe von Stp zum Kinase-Assay führte zur Dephosphorylierung von FemX (dritte und vierte Spur) und einer Reduktion des Phosphorylierungssignals von Stk_{KD}. Stk_{KD} (37 kDa) degradierte unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE. Aufgrund der *in vivo* Phosphorylierung von Stk_{KD} im *E. coli*-Überexpressionsstamm verursachte die Stk_{KD}-Degradation ein verschmiertes Signal (25 - 37 kDa) im Blot.

Zur Validierung der FemX-Phosphorylierung durch Stk_{KD} wurden der Kinase-/Phosphatase-Assay wiederholt und die entsprechenden Proteinbanden ausgeschnitten, mit Trypsin und LysC verdaut und anschließend die Phosphorylierungsstellen mittels Massenspektrometrie detektiert. Die Ergebnisse der α P-Thr-Western Blots bestätigten sich. FemX wurde an den Aminosäuren Thr₃₂, Thr₃₆, und Ser₄₁₅ durch Stk_{KD} phosphoryliert (Abbildung 19B). Außerdem wurden Phosphopeptide von FemX detektiert,

die gleichzeitig am Thr₃₂ und Thr₃₆ durch Stk_{KD} phosphoryliert wurden. Diese drei FemX-Phosphorylierungsstellen wurden durch Stp dephosphoryliert. Die Stk-Interaktionspartner FemA und FemB wurden im *in vitro* Kinase-Assay nicht durch Stk phosphoryliert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass FemX sowohl ein Substrat für die Kinase Stk als auch für die Phosphatase Stp ist.

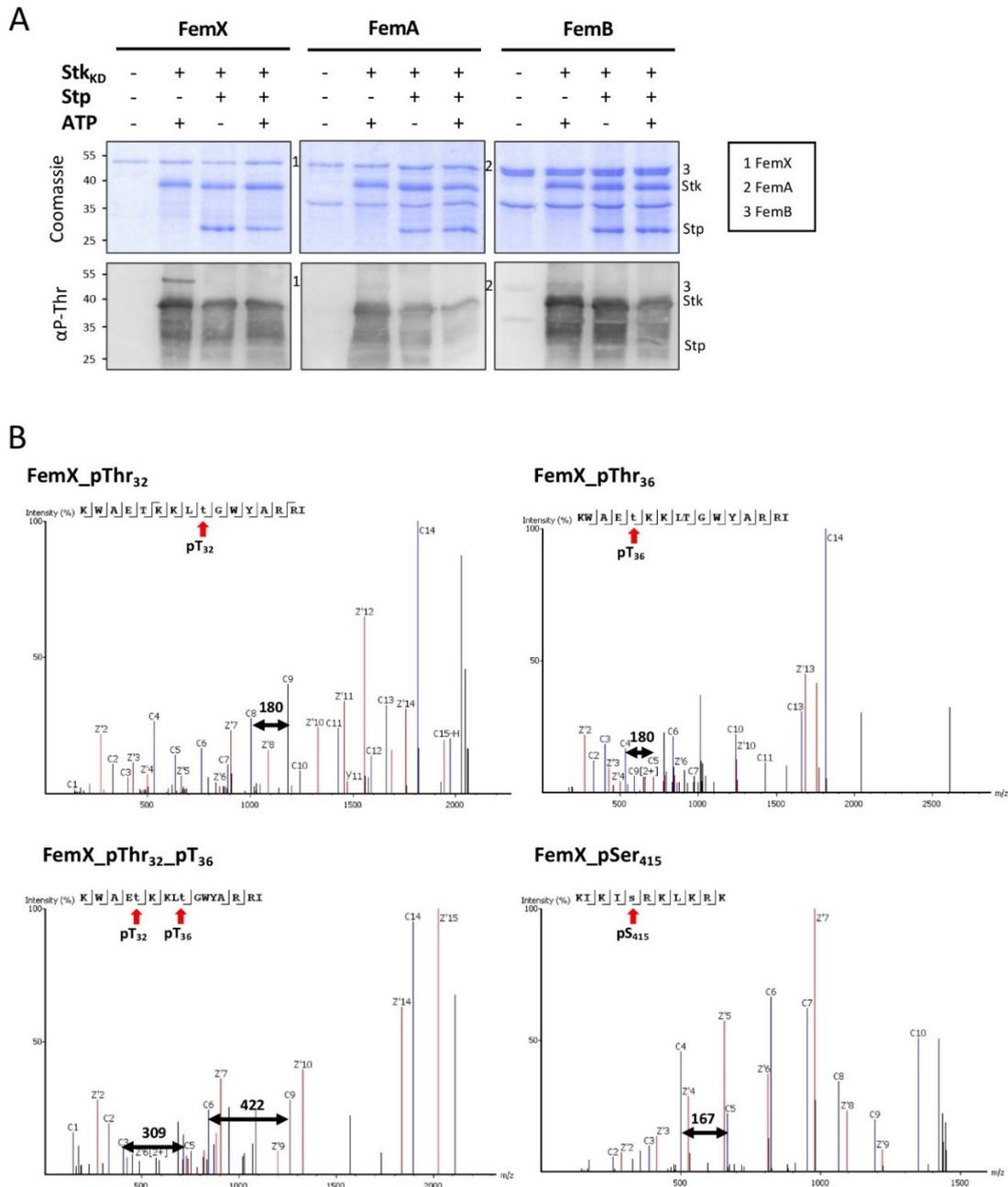


Abbildung 19: Stk und Stp phosphorylieren bzw. dephosphorylieren FemX.

Der *in vitro* Kinase- und Phosphatase-Assay wurde mit Stk, Stp und den FemX/A/B-Proteinen durchgeführt. Die De-/Phosphorylierung an den Proteinen wurde mittels α P-Thr-Western Blot (A) und Massenspektrometrie (B) detektiert. Die Kinase-domäne Stk_{KD} wurde mit dem rekombinanten FemX-, FemA- oder FemB-Protein mit oder ohne Stp für 1 h bei 37 °C inkubiert und mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde entweder auf eine Membran geblottet oder mit Coomassie gefärbt. Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten, verdaut und die Peptide mittels Massenspektrometrie identifiziert (B). Es konnten drei phosphorylierte Stellen (pThr₃₂, pThr₃₆, pThr₃₂/pThr₃₆ und pSer₄₁₅) im FemX-Protein identifiziert werden. Die entsprechende Massendifferenz des Phosphats (80), Thr (101) und Ser (87) wurde im Chromatogramm gekennzeichnet. FemA und FemB wurden nicht durch Stk phosphoryliert. Die Abbildungen wurden modifiziert nach Jarick *et al.* [94].

4.2.7 *stk*- und *stk/stp*-Mutanten sind empfindlicher gegenüber zellwandaktiven Antibiotika

Zur Lokalisation möglicher Substratenzyme von *Stk* und *Stp* in der Zellwandsynthese wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) der Stämme von verschiedenen zellwandaktiven Antibiotika bestimmt. Die *stp*-Mutante wies für die Inhibitoren der Zellwandvorläufersynthese (Fosfomycin, D-Cycloserin und Tunicamycin) eine 2-fach verminderte Empfindlichkeit gegenüber dem Wildtyp auf (Tabelle 13). Hingegen war die MHK der *stp*-Mutante beim Lantibiotikum Nisin doppelt so hoch (256 µg/ml) im Vergleich zum Wildtyp (128 µg/ml). Andere zellwandaktive Antibiotika hatten keinen Einfluss auf die MHK der *stp*-Mutante.

Die *stk*- und *stk/stp*-Mutante hatte mit der Ausnahme von Fosfomycin (16 bzw. 4 µg/ml) die gleiche MHK für alle getesteten Antibiotika. Die MHK des MurA-Inhibitor Fosfomycin war für die *stk*-Mutante doppelt so hoch (16 µg/ml) und für *stk/stp*-Mutante (2 µg/ml) halb so hoch gegenüber dem Wildtyp (4 µg/ml). Interessanterweise war die MHK des MraY-Inhibitors Tunicamycin für beide Stämme (4 µg/ml) um den Faktor acht niedriger als beim Wildtyp (32 µg/ml). Beide Stämme waren auch doppelt so empfindlich gegenüber Ramoplanin (0,06 µg/ml), Methicillin (1 µg/ml) und Penicillin G (0,125 µg/ml) wie der Wildtyp. Die Deletion der Gene *stk* oder *stp* hatten keinen Einfluss auf die MHK von Vancomycin, Daptomycin und Bacitracin.

Tabelle 13: MHK-Bestimmung der *S. aureus*-Stämme gegenüber zellwandaktiver Antibiotika.
Die Tabelle wurde modifiziert nach Jarick *et al.* [94].

	MHK [µg/ml]			
	wt	Δstk	Δstp	$\Delta stk\Delta stp$
Fosfomycin	8	16	4	4
D-Cycloserin	32	32	16	32
Tunicamycin	32	4	16	4
Ramoplanin	0,06	0,03	0,06	0,03
Nisin	128	128	256	128
Methicillin	2	1	2	1
Penicillin G	0,25	0,13	0,25	0,13
Vancomycin	2	2	2	2
Daptomycin	2	2	2	2
Bacitracin	32	32	32	32

4.3 Vergleichende Analysen der *S. aureus* NewmanHG Stämme

4.3.1 Transkriptom-Analyse der *S. aureus* Stämme

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die Deletion der Gene *stk* und *stp* auf die Genexpression der entsprechenden Mutanten ausübt. Dazu wurden der Wildtyp und die Mutanten bis zu einer optischen Dichte von 2 in TSB-Medium kultiviert und die RNA aus den Zellen isoliert. Die RNA wurde anschließend von der Firma *vertis Biotechnologie AG* (Freisingen, Deutschland) sequenziert. Die bioinformatische Auswertung erfolgte mittels DESeq2 durch Dr. Konrad Förstner (*Core Unit Bioinformatics* IMIB, Würzburg). Die Genexpression der Mutanten wurde stets in das Verhältnis zum Wildtyp gesetzt. Als signifikante Veränderungen in der Genexpression wurden Gene mit der x-fachen Änderung ≥ 2 oder ≤ -2 und einen $p_{\text{adj}} \leq 0,05$ identifiziert. Darüber hinaus wurde bei signifikant veränderten Genen überprüft, ob auch andere Gene des komplette Operons dereguliert waren (x-fache Änderung $\neq 1$, $p_{\text{adj}} \leq 0,05$). Signifikant veränderte Gene, die die Kriterien nicht erfüllten ($2 > x < 2$), wurden aufgrund der Fülle an veränderten Transkripten in dieser Analyse nicht mit einbezogen.

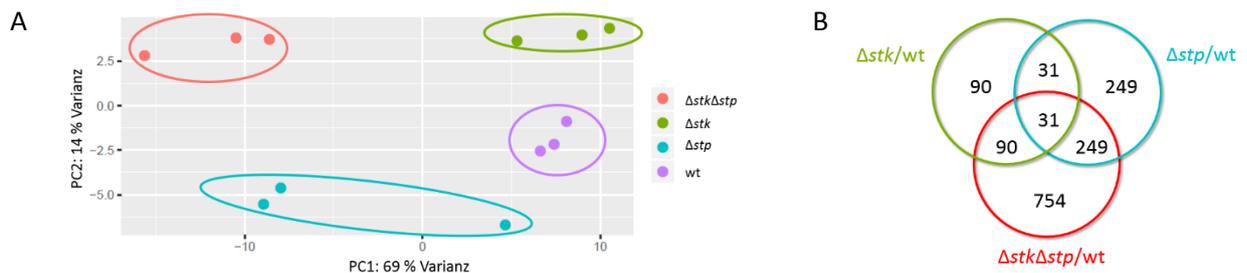


Abbildung 20: Hauptkomponenten-Analyse der stammspezifischen Transkriptome.

(A) Die Transkriptome der *S. aureus* NewmanHG-Mutanten und des Wildtyps unterscheiden sich untereinander. (B) Das Venn-Diagramm fasst die Anzahl der signifikant veränderten Gene in den einzelnen Mutanten mit den jeweiligen Überlappungen zusammen.

Die Hauptkomponenten-Analyse (*principle component analysis*) der Transkriptome der verschiedenen *S. aureus*-Stämme zeigte, dass die stammspezifischen Triplikate große Ähnlichkeiten aufwiesen, aber große Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen zu beobachten waren (Abbildung 20A). Dies lässt auf eine unterschiedliche Genexpression der verschiedenen Mutanten schließen. Einzig ein Transkriptom einer *stp*-Mutante zeigte eine stärkere Abweichung von den anderen beiden Transkriptomen der *stp*-Mutante. Insgesamt konnten 2525 Transkripte der 2610 Gene und 66 tRNA-Gene vom *S. aureus* Newman-Genom quantifiziert werden. In der vergleichenden Transkriptom-Analyse waren 90 Gene in der *stk*-Mutante, 249 Gene in der *stp*-Mutante und 754 Gene in der *stk/stp*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp differenziell exprimiert ($p_{\text{adj}} \leq 0,05$). Von den 90 differenziell exprimierten Genen der *stk*-Mutante waren 31 Gene in der *stp*-Mutante und alle 90 Gene in der Doppelmutante ebenfalls signifikant verändert. Außerdem waren alle 249 differenziell exprimierten

Gene der *stp*-Mutante auch in der Doppelmutante verändert. 31 Gene waren in allen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp differenziell exprimiert und werden im folgenden Abschnitt näher behandelt.

4.3.1.1 Vergleichende Transkriptom-Analyse zwischen den *S. aureus* Mutanten und dem Wildtyp

Im folgenden Abschnitt werden 18 von 31 Genen behandelt, welche in allen Mutanten signifikant verändert exprimiert wurden (Abbildung 21). Da für die restlichen 13 Gene keine Funktionen in den Datenbanken hinterlegt waren, wurden diese Gene in dieser Betrachtung nicht mit einbezogen.

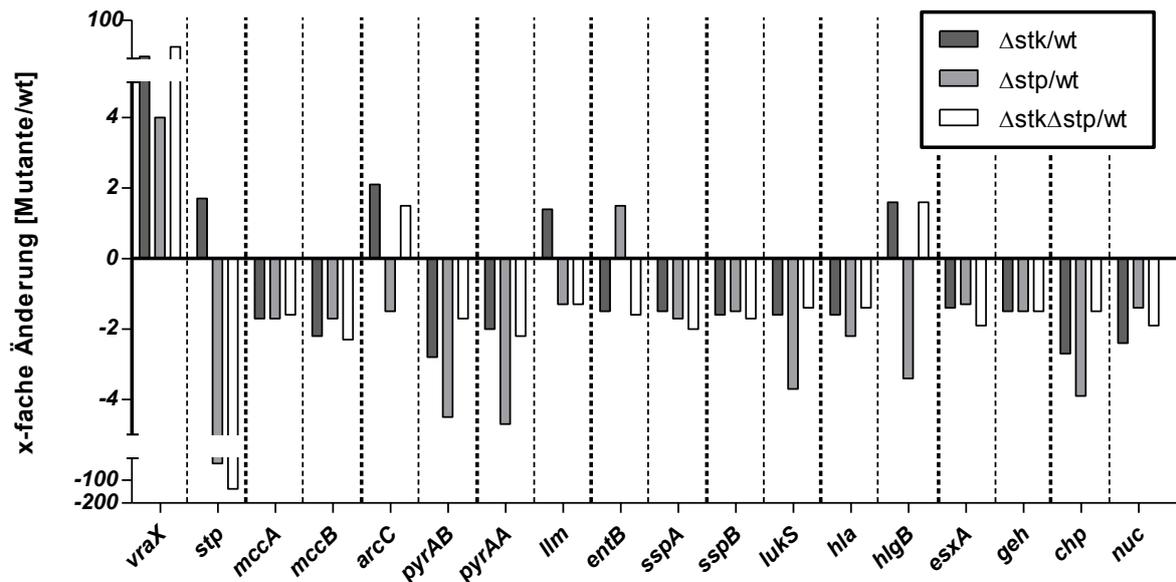


Abbildung 21: Differenziell exprimierte Gene in allen Mutanten.

Die Abbildung zeigt 18 von 31 Genen, die in allen Mutanten signifikant verändert waren ($p_{adj} \leq 0,05$) und mindestens einen Wert ≥ 2 oder ≤ -2 aufwiesen. Signifikant veränderte Gene mit unbekannter Funktion wurden nicht in diese Abbildung mit einbezogen.

Die codierende Sequenz für das Protein VraX war das einzige Gen, welches in allen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich stärker exprimiert wurde (10-fach in Δstk , 4-fach in Δstp und 35-fach in $\Delta stk\Delta stp$). VraX ist ein Regulator des VraTSR-Dreikomponentensystems, welches auf Zellwandstress und Antibiotikastress reagiert. In allen Mutanten waren die Transkripte der Cysteinsynthese *mcca* und *mccb* um das 1,6- bis 2,3-fache verringert. MccA katalysiert die Reaktion von Homoserin zu Cystathionin und MccB die Reaktion von Cystathionin zur Aminosäure Cystein (Abbildung 38). Die Gene sekretorischer Virulenzfaktoren wie die der Thermonuklease *nuc*, des inhibitorischen Chemotaxisproteins *chp*, der Lipase *geh* und der Serinproteasen *sspA* und *sspB* waren genauso wie die Toxine *hla*, *lukS* und dem Effektor des Type-7-Sekretionssystems *esxA* ebenfalls in allen Mutanten geringer exprimiert. Auch die Gene der Carbamylphosphat-Synthase *pyrAA* und *pyrAB* aus der Pyrimidinsynthese waren in allen Mutanten und insbesondere in der *stp*-Mutante (4,4- bzw. 4,7-fache) geringer exprimiert. Hingegen war das Gen der Carbamatkinase *arcC* aus dem Harnstoffzyklus wie auch das Gen des Toxins *hlgB* in der *stp*-Mutante um das 3,2- bzw. 3,4-fache verringert und in *stk*- und *stk/stp*-Mutante hingegen erhöht. Die Isochromatase *entB* war dagegen in der *stp*-Mutante erhöht und in der

stk- und *stk/stp*-Mutante verringert. Die Transkriptmenge der Glycosyltransferase *llm* und der Phosphatase *stp* waren in der *stk*-Mutante erhöht und in *stp*- und *stk/stp*-Mutante verringert. Auf die Gene des *stk*-Operons wie *stp* wird gesondert im Abschnitt 4.3.1.5 eingegangen.

4.3.1.2 Vergleichende Transkriptom-Analyse zwischen der *stk*-Mutante und dem Wildtyp

In der *stk*-Mutante war die Expression von 90 Genen im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert (Abbildung 20). Davon wurden 14 Gene verstärkt (Tabelle 16) und 23 Gene vermindert (Tabelle 17) exprimiert (≥ 2 oder ≤ -2 ; $p_{\text{adj}} \leq 0,05$). Die restlichen 53 signifikant veränderten Gene erfüllten nicht die Kriterien ($2 > x < 2$) und wurden aufgrund der Fülle an veränderten Transkripten in dieser Analyse nicht mit einbezogen. Die Gene des Harnstoffzyklus *arcC* und *argH* sowie der Arginin/Ornithin-Antiporter *arcD* wiesen eine 2,0- bis 2,2-fach verstärkte Expression auf. Außerdem waren die Gene der Acetoin-synthese *alsS* und *alsD* um das 2,1- bzw. 1,5-fache stärker exprimiert. Die Acetolactat-Synthase AlsS und -Decarboxylase AlsD sind Enzyme des Kohlenhydratüberfluss-Mechanismus und verhindern die Akkumulation des sauren Pyruvats durch die Bildung des neutralen Acetoin. Weiterhin wurde eine verstärkte Genexpression der Kälteschockproteine (*cspB* und *cspC*), dem Antiholin-Holin-Operon mit den Genen *IrgA* (1,7-fach) und *IrgB* (2,1-fach), sowie des *vraX*-Gens (10-fach) und des Adhäsins *Clumping factor clfB* (2,3-fach) beobachtet. Die Gene von verschiedenen Transportern wie *glnQ* und *NWMN_0813* waren um das 2,9- bzw. 4,5-fache stärker exprimiert. Außerdem konnte eine verstärkte Expression der Methyltransferasen *nasF* und *rumA* jeweils um das 2,2-fache beobachtet werden.

Die *stk*-Mutante zeigte eine verringerte Expression einiger Gene des polycistronischen Operons der Kapselsynthese wie *capA* (2,1-fach), *capB* (2,0-fach) und *capC* (1,7-fach). Die Expression weiterer Gene der Kapselsynthese wie *capD-P* waren unverändert. Weiterhin war die Expression der Eisen/Mangan-Transportergene *mntA/B/C* um das 2,2- bis 2,4-fache verringert, genauso wie das Gen des Cystein-Transporters *tcyP* (2,0-fach). Neben der wohl verringerten Cystein-Aufnahme durch TcyP war auch die Cystein-Synthese durch *mccA* und *mccB* um das 1,7- bzw. 2,2-fache verringert. In der *stk*-Mutante waren die Transkripte der Carbamylphosphat-Synthase *pyrAA/AB* (2,0- bzw. 2,8-fach) vermindert und demzufolge die Carbamylphosphat-Synthase aus Glutamin reduziert. Die Expression weiterer Gene des polycistronischen Pyrimidin-Operons waren unverändert. Jedoch wurde eine verminderte Expression des dicistronischen *pyrE/F*-Operons (2,9- bzw. 3,3-fach) beobachtet, was zu einer verminderten Synthese von UMP aus Orotat und PRPP führte (Abbildung 37). Das zusätzliche Gen *saeP* des *sae*-Operons wies eine 2,6-fach reduzierte Expression in der *stk*-Mutante auf. SaeP kontrolliert gemeinsam mit SaeQ das Zweikomponentensystem SaeRS, welches die Kapselsynthese und Aureolysine inhibiert und Virulenzfaktoren wie Exotoxine, Adhäsine, Lipasen und Proteasen aktiviert. Einige dieser Virulenzgene wie *hIb* (3,0-fach), *nuc* (2,4-fach), *chp* (2,7-fach) und *ssaA* (2,0-fach) waren ebenfalls in der *stk*-Mutante weniger exprimiert. Darüber hinaus war die Genexpression des globalen Regulators

sarZ um das 2,1-fache reduziert. *SarZ* gehört zur Familie der redoxsensitiven *SarA/MgrA*-Transkriptionsfaktoren, welche der reversiblen Phosphorylierung durch *Stk* und *Stp* unterliegen. *SarZ* reguliert viele zelluläre Prozesse wie z.B. Peroxidstress und Virulenz. Einige Gene mit unbekannter Funktion wie beispielsweise *NWMN_0404* (4,5-fach) und *NWMN_2204* (3,3-fach) waren z.T. deutlich reduziert in der *stk*-Mutante.

4.3.1.3 Vergleichende Transkriptom-Analyse zwischen der *stp*-Mutante und dem Wildtyp

In der *stp*-Mutante war die Expression von 249 Genen im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert (Abbildung 20) und davon wurden 48 Gene und 3 tRNA-Gene verstärkt (Tabelle 18) und 37 Gene vermindert exprimiert (Tabelle 19). Signifikant veränderte Gene, die die Kriterien nicht erfüllten, wurden aufgrund der Fülle an veränderten Transkripten in dieser Analyse nicht mit einbezogen. Die *stp*-Mutante zeigte eine verstärkte Genexpression von *sbnA* (1,9-fach), *sbnB* (2,4-fach), *sbnE* (2,1-fach) und *sbnH* (1,8-fach) des *sbn*-Operons. Die *Sbn*-Proteine synthetisieren das Siderophor Staphyloferrin B, welches extrazelluläres Eisen bindet, das schließlich vom *SirABC*-Transporter wieder aufgenommen wird (Abbildung 39). Die vermehrte Eisenaufnahme zeigte sich auch in der verstärkten Genexpression des *sst*-Eisentransporters. Hierbei war die Expression der Gene *sstB* (1,8-fach), *sstC* (2,8-fach) und *sstD* (1,5-fach) erhöht, während das Gen *sstA* keine veränderte Expression aufwies. Neben der vermehrten Eisenaufnahme waren auch Synthesewege einiger Aminosäuren verstärkt exprimiert. Im Gegensatz zur reduzierten Cystein-Synthese in der *stk*-Mutante zeigte die *stp*-Mutante eine verstärkte Synthese von Methionin. Ausgehend von der gesteigerten *metI* (2,3-fach) und *metC* (1,8-fach) Genexpression wird vom Acetylhomoserin über Cystathion das Homoserin synthetisiert. Allerdings war die Genexpression der Methionin-synthetisierenden Enzyme *metE* und *metF* unverändert. Darüber hinaus war auch das Gen *hisZ* (2,3-fach) der Histidin-Synthese und das Gen der Indol-3-Glycerolphosphat-Synthase *trpC* (2,2-fach) aus der Tryptophan-Synthese stärker exprimiert. Das *bioA*-Gen der Biotin-Synthese war um das 2,4-fache stärker exprimiert, während die weiteren Gene des hexacistronischen Biotin-Operons unverändert waren. Außerdem war das Gen für PTS-Transporteruntereinheit IIA zur Mannitol-Aufnahme *mtIA* doppelt so stark exprimiert, das Gen der Tagatose-1,6-Bisphosphataldolase *lacD* 2,1-fach und das *vraX*-Gen 4-fach so stark exprimiert. Neben dem Transglycosylase-Gen *sceD* waren einige Phagengene (*NWMN_1882/_1904/_1908*) und unbekannte Gene verstärkt exprimiert. Darüber hinaus waren zwei Transkripte der Valin- und ein Transkript der Serin-tRNA um das 2,2- bis 2,4-fache stärker exprimiert.

Die *stp*-Mutante zeigte eine deutliche Reduktion der Gene der Pyrimidin-Synthese, was die verringerten Pyrimidin-Konzentrationen erklärt (Abbildung 37). Das Uracil-Permease-Gen *pyrP* und die Pyrimidin-Synthesegene *pyrAA/AB*, *pyrB*, *pyrC*, *pyrE* und *pyrF* waren um das 3- bis 4,7-fache reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz zur *stk*-Mutante scheint die *stp*-Mutante keinen

Kohlenhydratüberschuss zu haben, da die Gene der Acetoin synthese *alsS* und *alsD* um das 2,0- bzw. 2,2-fache vermindert exprimiert waren. Im Widerspruch zur vermehrten Eisenaufnahme, war das Gen des intrazellulären Eisenspeichers Ferritin *ftn* halb so stark exprimiert. Außerdem war das Zink-regulierende *czrAB*-Operon um das 2,0- bzw. 1,6-fache vermindert exprimiert. Gleichermaßen wie in der *stk*-Mutante war das Virulenzfaktor-regulierende *saePQRS*-Operon schwächer exprimiert. Die verminderte Expression der Gene *saeP* (1,9-fach), *saeQ* (1,6-fach), *saeR* (1,7-fach) und *saeS* (2,1) hat einen Einfluss auf die Sekretion von Virulenzfaktoren. Denn die Virulenzgene des Chemotaxis-Inhibitorproteins *chp* (3,9-fach), Fibrinogen-bindende Proteins *efb* (2,3-fach) und des Gens des Immunglobulin-bindende Proteins *sbi* (2,4-fach) waren ebenfalls vermindert exprimiert. Darüber hinaus waren die Gene der Hämolyse *hla* (2,2-fach), *hly* (3,3-fach), *hlyB* (3,4-fach) und *hlyC* (3,1-fach), sowie der Leukozidine *lukF* (2,3-fach) und *lukS* (3,7-fach), des Superantigens *ssl11* (3,9-fach) und des Phenol-löslichen Modulins *psmβ1* (2,5-fach) auch weniger stark exprimiert. Die *stp*-Mutante zeigte außerdem eine geringe Genexpression des *opuC*-Operons, welches einen Glycin-Betain/Cholin-ABC-Transporter codiert. Die Gene *opuCA*, *opuCC* und *opuCD* zeigten ein um 2,0-, 1,6-, bzw. 2,1-fache verringerte Expression. Die Expression von *opuCB* blieb jedoch auf dem Wildtyp-Niveau. Neben der verminderten Genexpression des Fruktose-Transporters *fruA* (2,1-fach) waren auch einige metabolische Enzyme wie die Sulfitreduktase *piuB* (2,4-fache), die Pyruvatformiat-Lyase *pflA* (3,0-fache) und die Phosphatidyl-Phosphodiesterase *plc* (2,4-fache) weniger exprimiert.

4.3.1.4 Vergleichende Transkriptom-Analyse zwischen der *stk/stp*-Mutante und dem Wildtyp

In der *stk/stp*-Mutante war die Expression von 754 Genen im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert (Abbildung 20) und davon wurden 129 Gene verstärkt (Tabelle 20) und 24 Gene sowie 2 tRNA-Gene vermindert exprimiert (Tabelle 21). Signifikant veränderte Gene, die die Kriterien nicht erfüllten ($2 > x < 2$), wurden aufgrund der Fülle an veränderten Transkripten in dieser Analyse nicht mit einbezogen. Die *stk/stp*-Mutante zeigte ähnlich wie die *stp*-Mutante eine verstärkte Expression von Genen, welche für eine vermehrte Eisenaufnahme codieren (Abbildung 39). So waren die Gene *sbnA* (4,7-fach), *sbnB* (4,7-fach), *sbnC* (1,5-fach), *sbnE* (3,6-fach), *sbnG* (3,6-fach) und *sbnH* (1,8-fach) der Staphyloferrin B-Synthese verstärkt exprimiert. Interessanterweise war die Expression der Gene *sbnD*, *sbnF* und *sbnI* innerhalb des *sbn*-Operons unverändert. Trotz der vermehrten Expression der *sbn*-Gene und möglicherweise damit verbundenen verstärkten Sekretion von Staphyloferrin B waren die Gene des entsprechenden Staphyloferrin B-Rezeptors *sirABCD* unverändert exprimiert. Katechole und Katecholamine können ebenfalls Eisenquellen für *S. aureus* sein. Die Gene des entsprechenden ABC-Rezeptors *sstB* und *sstC* waren um das 2,4- bzw. 3,8-fache stärker exprimiert. Jedoch zeigten die Gene *sstA* und *sstD* des *sstABCD*-Operons eine unveränderte Genexpression. Außerdem waren die Gene *febA* (2,1-fach) und *febB* (2,0-fach) des *febABC*-Operons, welches die FebC-Eisenpermase und das

Eisen-bindende Lipoprotein FebA codiert, vermehrt exprimiert. Jedoch konnte keine vermehrte Expression von *febC* festgestellt werden. Der Häm-Rezeptor Isd ist das vorherrschende Eisenaufnahmesystem aus Häm und Hämoglobin in *S. aureus*. Die Gene *isdB* und *isdH*, welche Hämoglobin binden und das Eisen herauslösen, waren um das 2,3- bzw. 2,8-fache erhöht. Dennoch waren die Gene des entsprechenden Isd-Rezeptor *isdE/F* und der Häm-Chaperone *isdA/C* in ihrer Expression unverändert. Das Gen *mtsB* eines weiteren Häm-Transporters war doppelt so stark exprimiert wie im Wildtyp. Allerdings waren die weiteren Gene des *mtsABC*-Operons unverändert exprimiert. Der als Peptid-Transporter annotierte Opp1-Proteinkomplex wird in der Literatur auch als möglicher Eisen/Nickel-Transporter diskutiert. Neben den unveränderten Genen *opp1C/D/F* waren *opp1A* und *opp1B* um das 3,1- bzw. 2,4-fache vermehrt exprimiert. Die Aufnahme von extrazellulären, anorganischen Phosphat erfolgt u.a. durch den Phosphat-spezifischen Transporter Pst. Die Pst-codierenden Gene *pstA* (2,0-fach), *pstB* (2,1-fach), *pstC* (1,9) und das Phosphat-bindende Chaperon-Gen *pstS* (1,5-fach) waren verstärkt exprimiert. Darüber hinaus waren weitere Transportergene wie der Peptidtransporter *rlp* (2,2-fach) und *oppA* (2,3-fach), Natrium/Wasserstoff-Antiporter *mnhA* (2,0-fach), Glycin-Betain/Cholin-ABC-Transporter *opuCB* (2,1-fach), Glutamin Transporters *glnQ* (2,6-fach) und *glnP* (1,6-fach) stärker exprimiert. Die Gene des Galaktose- und Galaktiol-PTS-Transporters *lacF* (2,2-fach) bzw. *gatC* (2,9-fach) waren im Gegensatz zu den weiteren PTS-Komponenten *lacE* bzw. *gatA/B* vermehrt exprimiert. Eine vermehrte Galaktose-Aufnahme könnte durch die erhöhte Expression der Tagatose-6-Phosphat Kinase *lacC* (1,6-fach) und Tagatose-1,6-Biphosphat Aldolase *lacD* (3,6-fach), welche den Abbau von Tagatose-6-Phosphat zu Glycerinphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat katalysieren, kompensiert werden. Einige Gene des Fettsäureabbaus wie *fadE* (1,7-fach), *fadD* (2,6-fach) und *fadX* (3,8-fach) waren ebenfalls stärker exprimiert. Allerdings war die Genexpression der Acetyl-CoA Acetyltransferase FadA und Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase FadB unverändert. Wie in der *stp*-Mutante war in der *stk/stp*-Mutante ausgehend von Acetylhomoserin eine verstärkte Synthese von Methionin zu beobachten. Die Gene *metI* (3,5-fach), *metC* (2,7-fach), *metE* (2,7-fach), aber nicht *metF* waren stärker exprimiert. Demgegenüber war der gegenläufige Syntheseweg von Homocystein zu Cystein durch die Gene *mccA* (1,6-fach) und *mccB* (2,3-fach) verringert. Darüber hinaus waren die Gene der Lipoproteine *lpl7*, *lpl5n*, *lpl13* sowie des Toxins *ss19* und einiger Phagenproteine stärker exprimiert. In der Doppelmutante war das *polysaccharide intercellular adhesin*-codierende *ica*-Operon stärker exprimiert. Das *icaA*- und *icaD*-Gen, welche Gene für die Produktion von *N*-Acetyl-Glucosamin-Oligomere codieren, waren um das 3,1-fache bzw. 2,8-fache verstärkt exprimiert.

In der *stk/stp*-Mutante war ähnlich zu den anderen Mutanten eine verminderte Pyrimidin-Synthese zu beobachten. Die Expression der Gene *pyrAA* (2,2-fache), *pyrAB* (1,7-fache) und *pyrC* (1,8-fache) war vermindert. Die *stk/stp*-Mutation führte wie in der *stk*-Mutante zu einer verminderten Kapsel-

synthese. Die Gene *capA/B/C/D*, *capG/H*, *capK/L* und *capO/P* des Kapselsynthese-Operons waren zwischen 1,4- bis 2,8-fach vermindert exprimiert. Die Expression weiterer Kapselsynthesegene wie *capE/F* und *capI/J*, *capM/N* waren unverändert. Trotz der verstärkten Eisenaufnahme der *stk/stp*-Mutante waren die Gene *mntA* (2,2-fach), *mntB* (2,2-fach) und *mntC* (1,6-fach) des Eisen/Mangan ABC-Transporters schwächer exprimiert. Außerdem war die Fruktose-Aufnahme verringert. Die Laktose wird durch die Fruktose-Permease *fruA*, welche 1,8-fach schwächer exprimiert wurde, als Fruktose-1-Phosphat aufgenommen. Anschließend wird das Fruktose-1-Phosphat durch die Fruktose-1-Phosphat Kinase in Fruktose-1,6-Biphosphat umgewandelt und der Glycolyse oder Gluconeogenese zugeführt. Das Gen der Fruktose-1-Phosphat Kinase *fruB* (2,1-fach) war ebenfalls vermindert exprimiert. Neben den Prolin/Betain-Transporter *proP* waren in der Doppelmutante die Amidase *sle1* (2,1-fach) und das Peptidase-codierende *sspABC*-Operon 1,8- bis 2,1-fach schwächer exprimiert. Darüber hinaus waren die tRNA-Gene von Lysin und Glutamin um jeweils 2,0-fach schwächer exprimiert.

4.3.1.5 Transkriptom-Analyse des *Stk*-Operons

Die Gene *stk* und *stp* sind in einem polycistronischen Operon organisiert (Abbildung 1). Das Operon codiert ein Peptiddeformylase (*def*, *NWMN_1125*), ein Methionyl-tRNA-Formyltransferase (*fmt*, *NWMN_1126*), eine 16S rRNA-Methyltransferase (*sun*, *NWMN_1127*), eine 23S rRNA Methyltransferase (*rlmN*, *NWMN_1128*) sowie *Stp* (*stp*, *NWMN_1129*) und *Stk* (*stk*, *NWMN_1130*). Die beiden Gene *stk* und *stp* werden gemeinsam transkribiert. In der *stk*-Mutante waren die Gene *sun* (1,4-fach), *rlmN* (1,5-fach) und *stp* (1,7-fach) des Operons verstärkt exprimiert. Interessanterweise war *stk* ebenfalls in der *stk*-Mutante nachweisbar. Dies beruht auf ein Fragment von 395 Nukleotiden am 3'-Ende des *stk*-Leserasters, welches bei der Herstellung der *stk*- und *stk/stp*-Mutante an der Stelle des Gens belassen wurde [111]. In der *stp*-Mutante waren die Transkripte der Gene *sun* (1,5-fach), *stk* (1,5-fach) und *rlmN* (182-fach) sowie *stp* (27-fach) verringert. Erwartungsgemäß war aufgrund der *stp*-Deletion die *stp*-Transkriptmenge in der *stp*-Mutante (27-fach) deutlich reduziert. Die Doppelmutante wies erwartungsgemäß eine deutliche Verringerung der *stp*-Transkriptmenge (138-fach) auf.

4.3.2 Proteom-Analyse der *S. aureus* Stämme

In diesem Versuchsteil wurde untersucht, welchen Einfluss die deletierten Gene *stk* und *stp* auf die Proteinexpression der entsprechenden Mutanten ausüben. Die Mutanten und der Wildtyp wurden in TSB-Medium bis zu einer optischen Dichte von 2 kultiviert. Anschließend wurden die Proteine isoliert und mittels Massenspektrometrie detektiert und quantifiziert. Die Proteinexpression der Mutanten wurde dabei stets in das Verhältnis zum Wildtyp gesetzt. Als signifikante Veränderungen in der Proteinexpression wurden Proteine mit der x-fachen Änderung ≥ 2 oder ≤ -2 und einen q-Wert $\leq 0,05$ identifiziert.

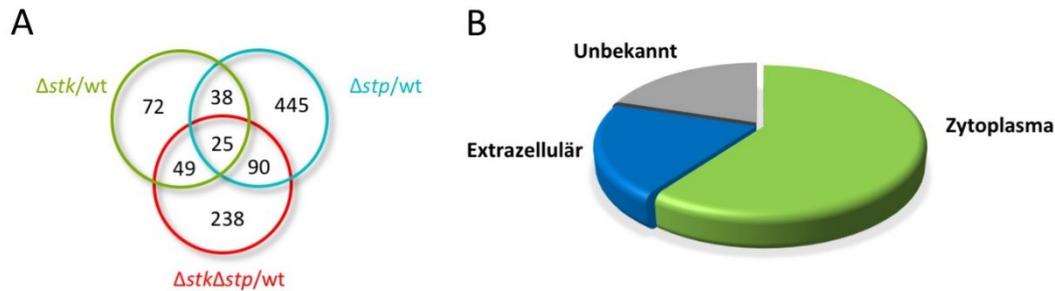


Abbildung 22: Auswertung der stammspezifischen Proteome.

(A) Das Venn-Diagramm fasst die Anzahl der signifikant veränderten Proteine in den einzelnen Mutanten mit den jeweiligen Überlappungen zusammen. (B) Das Diagramm zeigt die Lokalisation der 25 signifikant veränderten Proteine aller Mutanten.

Es konnten insgesamt 1940 Proteine der 2610 Protein-codierenden Gene von *S. aureus* NewmanHG quantifiziert werden. In den vergleichenden Proteom-Analysen waren 72 Proteine in der *stk*-Mutante, 445 Proteine in der *stp*-Mutante und 238 Proteine in *stk/stp*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp differenziell exprimiert (Abbildung 22A). Von den 72 differenziell exprimierten Proteinen der *stk*-Mutante waren 38 Proteine in der *stp*-Mutante und 49 Proteine in der Doppelmutante ebenfalls signifikant verändert. Außerdem waren von den 445 differenziell exprimierten Proteinen der *stp*-Mutante 90 Proteine ebenfalls in der Doppelmutante verändert. 25 Proteine waren in allen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp differenziell exprimiert und werden im Abschnitt 4.3.2.1 näher behandelt. Von diesen 25 in allen Mutanten differenziell exprimierten Proteinen waren 50 % im Zytoplasma und 25 % extrazellulär lokalisiert (Abbildung 22B). Für die restlichen 25 % der Proteine waren in den Datenbanken keine Lokalisationen hinterlegt.

4.3.2.1 Vergleichende Proteom-Analyse zwischen den *S. aureus* Mutanten und dem Wildtyp

Im folgenden Abschnitt werden 17 der 25 Proteine behandelt, die in allen Mutanten signifikant verändert exprimiert wurden (Abbildung 23). Für die restlichen 8 Proteine waren in den Datenbanken keine Funktionen hinterlegt, sodass diese Proteine in dieser Betrachtung nicht mit einbezogen wurden. Das Kapselsyntheseproteine CapB war das einzige Protein, welches in allen Mutanten deutlich schwächer exprimiert wurde im Vergleich zum Wildtyp (1,9-fach in Δstk , 2,4-fach in Δstp und 1,4-fach in $\Delta stk\Delta stp$). CapB ist eine Tyrosinkinase, welche das Protein UDP-Acetyl-Mannosamin-Dehydrogenase CagO phosphoryliert und so die Produktion der Polysaccharid-Kapselvorläufer reguliert. Die kleine Untereinheit der Carbamylphosphat-Synthase PyrAA aus der Pyrimidin-Synthese war in der *stp*- und *stk/stp*-Mutante jeweils um das 1,5-fache weniger stark exprimiert als im Wildtyp. Hingegen war die Expression von PyrAA in der *stk*-Mutante unverändert gegenüber dem Wildtyp. Die große Untereinheit der Carbamylphosphat-Synthase PyrAB zeigte ein ähnliches Expressionsprofil wie PyrAA, wobei PyrAB in der *stp*-Mutante aber nicht signifikant reduziert war. Die sekretorischen Virulenzfaktoren wie die Komponente B des γ -Hämolytins HlgB, die Serinprotease SspB und die beiden Fibrinogen-bindenden Proteine Efb (NWMN_1066 und NWMN_1069) waren in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante stärker und in

der *stp*-Mutante schwächer exprimiert. Die Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase AdhE war in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante 1,8-fach bzw. 3,1-fach stärker und in der *stp*-Mutante 3,5-fach schwächer exprimiert. Die Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase ist ein bifunktionelles Enzym, welches die Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenase-Funktion in sich vereint, und somit die Ethanol- und Acetat-Produktion unter aeroben Bedingungen kontrolliert.

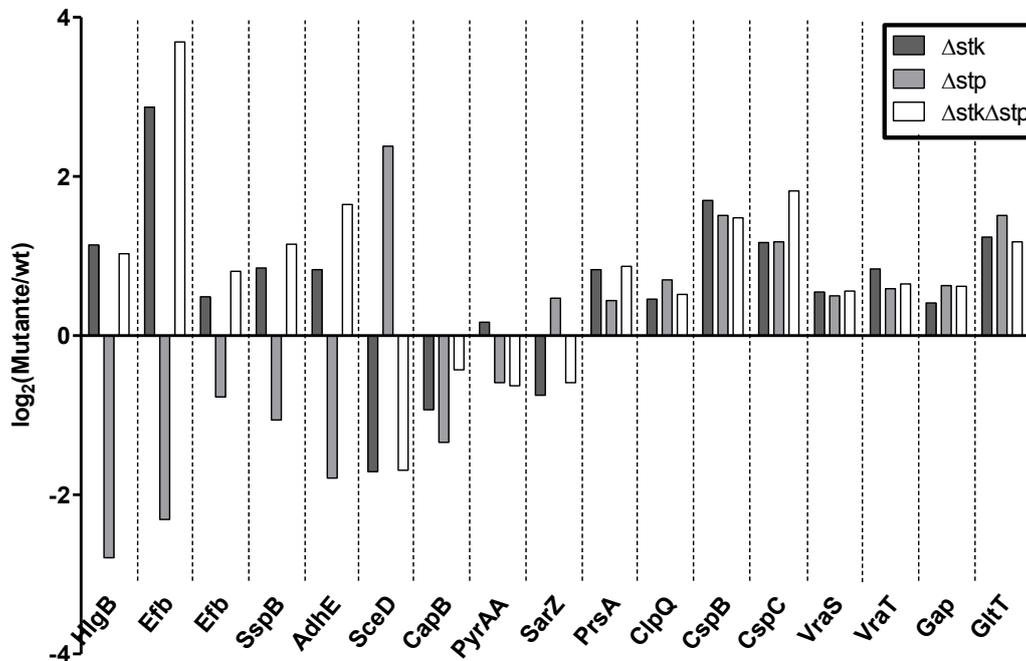


Abbildung 23: Differenzielle exprimierte Proteine in allen Mutanten.

Die Abbildung zeigt 17 von 25 Proteinen, die in allen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert waren (q -Wert $\leq 0,05$). Signifikant veränderte Proteine mit unbekannter Funktion wurden in dieser Abbildung nicht mit einbezogen.

Die Transglycosylase SceD spaltet PGN und beeinflusst somit die Teilung und den Zellwandumbau der bakteriellen Zellen. SceD war in der *stp*-Mutante 5,2-fach stärker und in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante jeweils um das 3,2-fache schwächer exprimiert als im Wildtyp. Der Regulator SarZ war ebenfalls stärker in der *stp*-Mutante und schwächer in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante exprimiert. SarZ ist ein zentraler Transkriptionsregulator vom MgrA/SarR-Typ und aktiviert einige Virulenzfaktoren wie Hla und die RNA III. Des Weiteren waren einige Proteine wie das extrazelluläre Chaperon PrsA, das Proteasomenprotein ClpQ, die Kälteschockproteine CspB und CspC, die Aldehyddehydrogenase Gap und der Glutamat-Transporter GltT in allen Mutanten stärker exprimiert als im Wildtyp. Außerdem waren die Proteine des Zellwandstimulons um die Histidinkinase VraS und dem Transporter VraT in allen Mutanten stärker exprimiert als im Wildtyp.

4.3.2.2 Vergleichende Proteom-Analyse zwischen der *stk*-Mutante und dem Wildtyp

In der *stk*-Mutante war die Expression von 72 Proteinen gegenüber dem Wildtyp signifikant verändert (Abbildung 22) und davon wurden 9 Proteine verstärkt (Tabelle 22) und 5 Proteine vermindert

(Tabelle 23) exprimiert (≥ 2 oder ≤ -2 ; q -Wert $\leq 0,05$). Die restlichen 58 signifikant veränderten Proteine erfüllten nicht die Kriterien ($2 > x < 2$) und wurden daher in der Analyse nachrangig betrachtet. Die *stk*-Mutante zeigte gegenüber dem Wildtyp eine verstärkte Expression einiger Virulenzproteine. So war das Fibrinogen-bindende Protein Efb 7,3-fach, das Phenol-lösliche Modulin Psm α 1 4-fach, und die γ -Hämolyisin-Komponenten HlgB und HlgC 2,2- bzw. 2,4-fach stärker exprimiert als im Wildtyp. Weiterhin wurde eine verstärkte Expression des Glutamat-Transporters GltT um das 2,3-fache und der Kälteschockproteine CspB und CspC um das 3,3- bzw. 2,3-fache der Wildtyp-Expression beobachtet. Entgegen der verstärkten Expression von Virulenzfaktoren in der *stk*-Mutante war eine verminderte Expression von zellwandaktiven Enzymen zu beobachten. Die Transglycosylase SceD und die N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase Sle1 waren in der *stk*-Mutante um das 3,3- bzw. 2,7-fache weniger stark exprimiert gegenüber dem Wildtyp.

4.3.2.3 Vergleichende Proteom-Analyse zwischen der *stp*-Mutante und dem Wildtyp

Die *stp*-Mutante wies gegenüber dem Wildtyp eine veränderte Expression von 445 Proteinen auf (Abbildung 22) und davon wurden 23 Proteine verstärkt (Tabelle 24) und 33 Proteine vermindert (Tabelle 25) exprimiert (≥ 2 oder ≤ -2 ; q -Wert $\leq 0,05$). Die restlichen 389 signifikant veränderten Proteine erfüllten nicht die Kriterien ($2 > x < 2$) und wurden aufgrund der großen Anzahl an veränderten Proteinmengen in der Analyse nachrangig betrachtet. In der *stp*-Mutante waren im Vergleich zur *stk*-Mutante deutlich mehr Proteine differenziell exprimiert. Dabei war ersichtlich, dass die *stp*-Mutante gegenüber der *stk*-Mutante einen z.T. gegenteiligen Effekt auf die Proteinexpression ausübte. So war die Transglycosylase SceD um das 5,2-fache und die Kälteschockproteine CspB und CspC um das 2,8- bzw. 2,3-fache gegenüber dem Wildtyp erhöht. Ein erhöhter Glutamat-Bedarf der *stp*-Mutante wurde durch die erhöhte Expression des Glutamat-Transporter GltT um das 2,9-fache und der beiden Glutamat-Synthase-Untereinheiten GltB und GltD um das 2,2- bzw. 1,8-fache deutlich. Die Glutamat-Synthase katalysiert die Oxidasereaktion von α -Ketoglutarat und Glutamin zu Glutamat. Darüber hinaus war die Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase Asd als wichtiges Enzym der Biosynthese zahlreicher Aminosäuren wie Lysin, Methionin, Leucin und Isoleucin in der *stp*-Mutante um das 2,3-fache erhöht gegenüber dem Wildtyp. Ein erhöhter Bedarf an Zink und Eisen lässt sich anhand der erhöhten Expression des Zink-bindenden Lipoproteins ZinT um das 2,3-fache und der Eisentransporter SirA, PhuD, SstD, Opp-1A und HtsA erkennen. Die Eisentransporter waren in der *stp*-Mutante jeweils um das 2,0-fache gegenüber dem Wildtyp exprimiert. Diese Transporter binden das extrazelluläre Eisen aus verschiedenen Quellen wie das Staphyloferrin A und B, Ferrichrome und Katechole (Abbildung 39). Darüber hinaus war das immundominante Antigen IsaB (3,3-fach), die Farsenyltransferase CtaB (3,2-fach), die Quinoloxidase-Untereinheit III (2,8-fach) und das Zellteilungsprotein DivIB (2,2-fach) in der *stp*-Mutante stärker exprimiert im Vergleich zum Wildtyp.

Die *stp*-Mutante zeigte eine deutlich reduzierte Expression von Virulenzfaktoren. Die γ -Hämolysin-Komponente HlgB und HlgC waren in der *stp*-Mutante um das 6,9- bzw. 5,2-fache vermindert exprimiert gegenüber dem Wildtyp. Darüber hinaus war die Proteinmenge an Sbi (5,3-fach), Efb (5,0-fach), SsaA (4,6-fach), die Proteinase SspB (2,1-fach) und den Leukozidinen LukF und LukS um das 3,1- bzw. 2,7-fache reduziert in der *stp*-Mutante. Das Kapselsyntheseprotein CapB war ebenfalls um das 2,5-fache reduziert gegenüber dem Wildtyp. Interessanterweise war das Operon um den Virulenz-regulator SaeR in der *stp*-Mutante reduziert. So wiesen die Histidinkinase SaeS (1,7-fach), der Antwortregulator SaeR (1,5-fach), und die assoziierten Proteine SaeQ (2,1-fach) und SaeP (2,8-fach) eine verminderte Expression auf. Entgegen der verstärkten Expression vieler Eisentransporter war der Eisentransporter MntA und MntC um das 3,7- bzw. 2,3-fache reduziert. Die Expression der Unter-einheiten des Glycin-Betain/Prolin-Transporters OpuCA und OpuCC war in der *stp*-Mutante um die Hälfte reduziert gegenüber dem Wildtyp. Die deutlichste Reduktion der Proteinexpression (10,6-fach) betraf die im *Stk*-Operon codierte Methyltransferase Sun (NWMN_1127). In der *stp*-Mutante war die Expression einiger Kohlenhydrat- und Aminosäure-Synthesenzyme im Vergleich zum Wildtyp reduziert. So war die Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase AdhE (3,5-fach), Biphosphoglycerat-Mutase GpmA (2,5-fach), α -Amylase MalA (2,4-fach) und die Argininsuccinat-Lyase ArgH (3,6-fach) in der *stp*-Mutante reduziert. Die Expression des zellwandaktiven Enzyms Sle1 war in der *stp*-Mutante ebenfalls um das 2,4-fache gegenüber dem Wildtyp vermindert.

4.3.2.4 Vergleichende Proteom-Analyse zwischen der *stk/stp*-Mutante und dem Wildtyp

In der *stk/stp*-Mutante war die Expression von 238 Proteinen gegenüber dem Wildtyp signifikant verändert (Abbildung 22) und davon wurden 18 Proteine verstärkt (Tabelle 26) und 7 Proteine vermindert (Tabelle 27) exprimiert (≥ 2 oder ≤ -2 ; q-Wert $\leq 0,05$). Die restlichen 213 signifikant veränderten Proteine erfüllten nicht die Kriterien ($2 > x < 2$) und wurden aufgrund der großen Anzahl an veränderten Proteinmengen in dieser Analyse nachrangig betrachtet. Die *stk/stp*-Mutante zeigte wie die *stk*-Mutante gegenüber dem Wildtyp eine verstärkte Expression einiger Virulenzfaktoren. So war das Fibrinogen-bindende Protein Efb 12,9-fach, das Phenol-lösliche Modulिन Psm α 1 5,5-fach, die Proteinase SspB 2,2-fach und das γ -Hämolysin HlgB und HlgC 2,1- bzw. 2,5-fach stärker exprimiert als im Wildtyp. Die Kälteschockproteine CspB (2,8-fach) und CspC (3,5-fach), die Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase AdhE (3,1-fach) und der Glutamat-Transporter GltT (2,3-fach) waren ebenfalls in der Doppelmutante stärker exprimiert. Die Expression des Proteins IsaB war wie in der *stp*-Mutante auch in der Doppelmutante um das 2,2-fache gegenüber dem Wildtyp erhöht. Hingegen war die Transglycosylase SceD in der *stk/stp*-Mutante um das 3,2-fache reduziert. Außerdem wurde eine verminderte Expression des Prolin/Betain-Transporter in der *stk/stp*-Mutante beobachtet.

4.3.3 Interaktion von Stk

Um Interaktionspartner von Stk zu eruieren, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurde der α Stk-Antikörper in ein *S. aureus* NewmanHG Wildtyp-Lysat gegeben. Mithilfe von Antikörper-bindenden Protein G-Beads wurden die α Stk-Antikörper zusammen mit Stk und an Stk-gebundenen Proteinen aus dem Lysat extrahiert. Die extrahierten Proteine wurden anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert und quantifiziert. Als Negativ- oder Hintergrundkontrollen dienten einerseits eine Immunpräzipitation mit dem Δ stk-Lysat und andererseits eine Immunpräzipitation ohne Antikörperzugabe mit dem Wildtyp-Lysat. Die in den Negativkontrollen angereicherten Proteine wurden als Stk-Interaktionspartner ausgeschlossen.

Die Anreicherung von Stk mithilfe der Immunpräzipitation konnte dank des α Stk-Western Blots bestätigt werden (Pfeil in der Abbildung 24A). Die starke Anreicherung von Stk (100 kDa) war ebenfalls als Bande im Coomassie-Gel erkennbar und konnte mithilfe der Massenspektrometrie ebenfalls als Stk identifiziert werden. Im Western Blot waren ebenfalls die leichte (25 kDa) und schweren Antikörperkette (50 kDa) als Hintergrundsignal erkennbar. Es konnten 30 Interaktionspartner von Stk identifiziert werden, welche in der Abbildung 24B und Tabelle 28 aufgeführt wurden. Dabei wurden hauptsächlich Membranproteine als Interaktionspartner der Membrankinase Stk identifiziert. Stk wurde im Wildtyp-Lysat gegenüber dem Δ stk-Lysat um das 85-fache angereichert und ist somit das am meisten extrahierte Protein aus dem Wildtyp-Lysat. Dies bestätigte das gewonnene Bild aus dem Coomassie-Gel und Western Blot (Abbildung 24A). Die Immunpräzipitation zeigte eine 37-fache Anreicherung vom hypothetischen Protein NWMN_0969 im Vergleich zum Δ stk-Lysat. Damit war dieses Protein das mit Stk am meisten extrahierte Protein und stellt somit einen wichtigen Interaktionspartner von Stk dar. Neben zahlreicher hypothetischen Proteinen mit unbekannter Funktion konnten Histidinkinasen (AgrC, ArlS, WalK), Transporterproteine (EssC, MgtE, PmtA) sowie Zellzyklus- und Zellteilungsproteine (GpsB, FtsW, FtsK) als Stk-Interaktionspartner identifiziert werden. Einige Stk-Interaktionspartner wie AgrC, EssC und MprF sind bekannte Virulenzfaktoren in *S. aureus*. Im Gegensatz zu den eben aufgezeigten Stk-Interaktionspartnern wurde der Virulenzfaktor Spa aufgrund seiner Antikörperbindenden Eigenschaften stärker in der Negativkontrolle (Δ stk) als im Wildtyp-Lysat angereichert und hatte daher ein negatives Vorzeichen im Quotienten wt/ Δ stk.

Interessanterweise interagiert Stk mit der Membran-assoziierten Histidinkinase WalK des Zweikomponentensystems WalRK, das den Zellwandmetabolismus und die Autolyse über die Expression von Zellwandhydrolasen reguliert. Stk interagiert mit einigen von diesen Zellwandhydrolasen wie Sle1 und möglicherweise Atl (q-Wert > 0,05.). Darüber hinausgehend interagiert Stk mit dem Protein WalH, welches wohl die Aktivität des WalRK-Zweikomponentensystem reguliert.

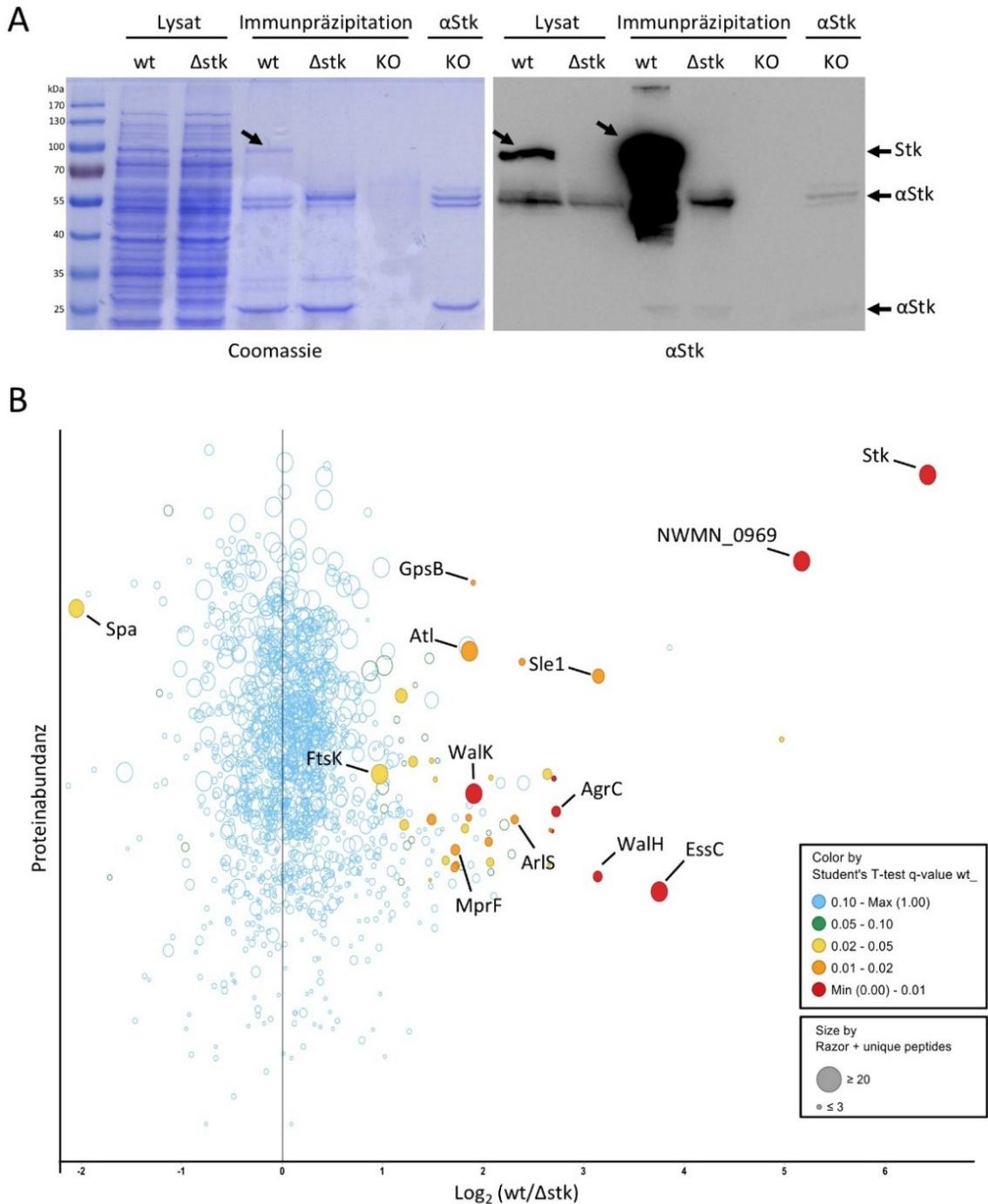


Abbildung 24: Interaktom von Stk.

(A) Der Nachweis der Stk-Anreicherung mithilfe der α Stk-Immunpräzipitation (IP) konnte sowohl mit dem Coomassie-Gel als auch mit dem α Stk-Western Blot erbracht werden (Pfeil in Spur 3). Die Lysate von *S. aureus* NewmanHG wt und Δ stk wurden jeweils in den ersten beiden Spuren aufgetragen. Aus diesen Wildtyp-Lysaten konnten Stk und dessen Interaktionspartner mittels α Stk-Antikörper und Antikörper-bindenden Protein G-Kügelchen angereichert werden (Spur 3 bis 5). Als Negativkontrollen dienten die IP mit dem Δ stk-Lysat (Spur 5) oder die IP ohne Antikörper mit dem Wildtyp-Lysat (KO) (Spur 6). In der Spur 7 wurde nur der α Stk-Antikörper aufgetragen. Die leichte und schwere Antikörperkette ist im Western Blot und Coomassie-Gel erkennbar. (B) Der Plot zeigt die Interaktionspartner von Stk. Die identifizierten Interaktionspartner sind abhängig von ihrer Signifikanz mit einem entsprechenden Farbcode versehen (t-Test, n=5, Farbcodierung siehe Legende). Die Größe der Farbkugel charakterisiert die Anzahl der identifizierten Peptide eines Proteins in der Probe. Alle identifizierten Stk-Interaktionspartner sind in der Tabelle 28 aufgeführt.

4.3.4 Sekretom-Analyse der *S. aureus* Stämme

In einigen Studien wurde nachgewiesen, dass Stk und Stp durch die reversible Phosphorylierung globaler Regulatoren wie SarA, MgrA und SpoVG einen Einfluss auf die Virulenz von *S. aureus* ausüben. Daher wurden die sekretierten Proteine aller Stämme erfasst und verglichen. Bei der Probenaufarbeitung der Proteom-Proben (Abschnitt 3.5.1 und 4.3.1) wurden 2 ml Zellkulturüberstand gewonnen und dieser nach Filtration und mehreren Waschschritten mit zwei Peptidasen verdaut. Nach der Reinigung des Peptidgemisches wurden die sekretierten Proteine mittels Massenspektrometrie gemessen und quantifiziert.

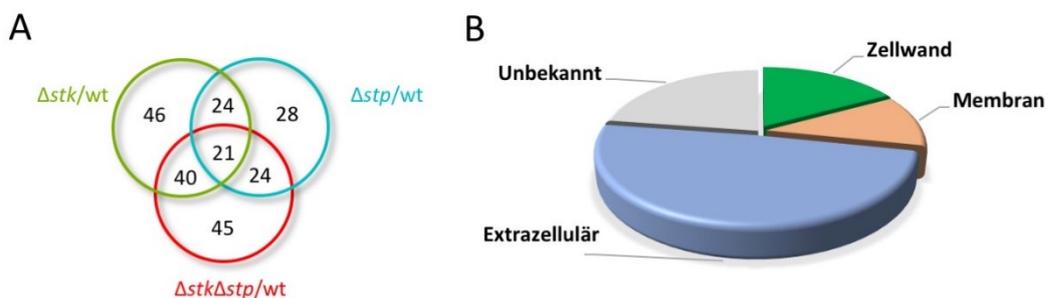


Abbildung 25: Auswertung der stammspezifischen Sekretome.

(A) Das Venn-Diagramm fasst die Anzahl der signifikant veränderten Proteine in den einzelnen Mutanten mit den jeweiligen Überlappungen zusammen. (B) Das Diagramm zeigt den Anteil aller 53 sekretierten Proteine nach deren Lokalisation.

Es konnten insgesamt 757 Proteine über alle Proben detektiert werden. Von diesen 757 Proteinen wurden die 90 Proteine ausgewählt, für die ein Signalpeptid laut der SignalP-Datenbank vorhergesagt wurde. Sekretierte Proteine, die für mindestens einen Stamm signifikant verändert waren, wurden für die Analyse ausgewählt und sind in der Tabelle 29 aufgeführt. In der *stk*-, *stp*-, und *stk/stp*-Mutante waren von den insgesamt 53 sekretierten Proteinen 46, 28 bzw. 45 Proteine im Vergleich zum Wildtyp differenziell sekretiert (Abbildung 25A). 21 Proteine waren gegenüber dem Wildtyp in allen Mutanten signifikant verändert. Von den 53 sekretierten Proteinen waren 11 % in der Zellmembran, 17 % in der Zellwand und 49 % extrazellulär lokalisiert (Abbildung 25B). Für die restlichen 23 % der Proteine war in den Datenbanken keine Lokalisation vorhergesagt.

Die Sekretionsprofile der einzelnen Mutanten gegenüber dem Wildtyp sind in der Tabelle 29 zusammengefasst und ausgewählte Toxine, Pathogenitätsfaktoren und Zellwandhydrolasen sind in den Abbildung 26 und Abbildung 27 dargestellt. Die *stk*- und *stk/stp*-Mutante zeigten im Vergleich zum Wildtyp mit wenigen Ausnahmen das gleiche Sekretionsprofil. Sie sekretierten mit Ausnahme von LukF, MapW, Ehb, IsaA und Sle1 gleichermaßen oder weniger Proteine als der Wildtyp. Die *stp*-Mutante hingegen zeigte abhängig vom jeweiligen Protein gegenüber dem Wildtyp ein verändertes Sekretionsprofil. Die *stp*-Mutante sekretierte gegenüber dem Wildtyp weniger Poren-bildenden Toxine wie Hämolsine und Leukozidine (Abbildung 26). Auffallend dabei war die deutlich geringere Sekretion von Hla (21-fach), HlgA (13-fach, n.s.), HlgB (4,9-fach) und HlgC (5,3-fach). In der *stk*- und *stk/stp*-

Mutante wurden die Toxine Hla (1,4- bzw. 3,5-fach), HlgA (3,2- bzw. 4,6-fach, n.s.), HlgB (1,5- bzw. 3,2-fach) und HlgC (2- bzw. 5,5-fach) im Vergleich zum Wildtyp weniger sekretiert. Interessanterweise sekretierte die *stp*-Mutante etwas mehr vom Enterotoxin Ssl11 (1,6-fach) im Vergleich zum Wildtyp. Hingegen wurde von der *stk*- und *stk/stp*-Mutante weniger von der Staphylokinase Sak (4,9- bzw. 9,8-fach) und den Enterotoxinen Sep (3,7- bzw. 9,2-fach) und Ssl11 (2,7- bzw. 5,7-fach) sekretiert.

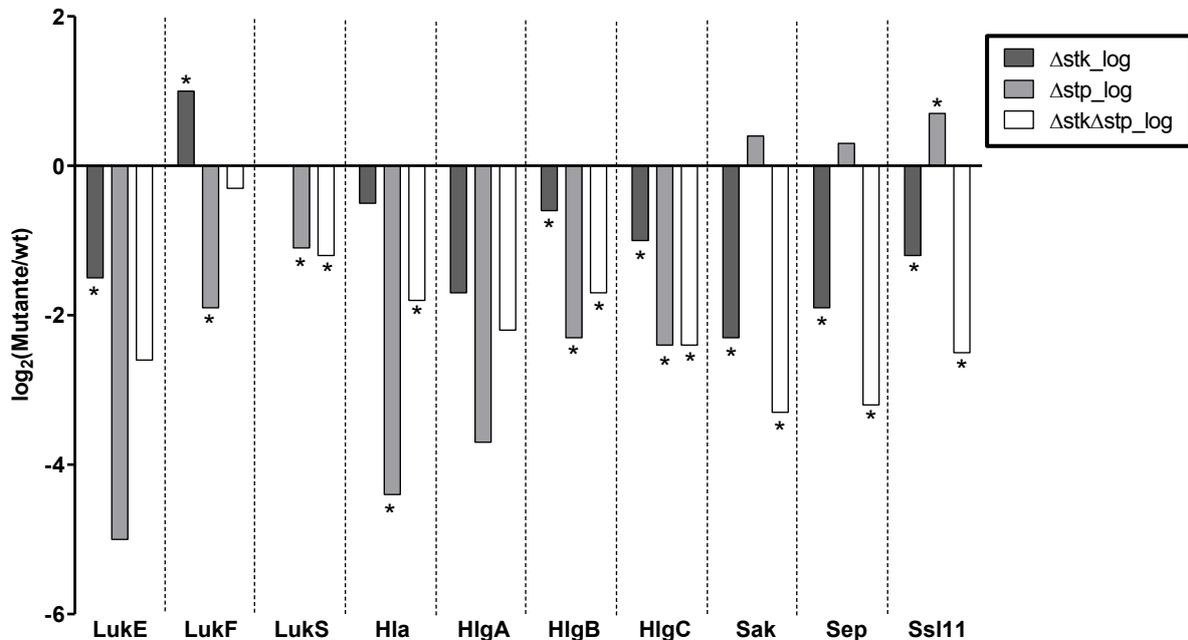


Abbildung 26: Sekretierte Toxine der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Die Abbildung zeigt die Toxin-Konzentrationen der Mutanten gegenüber dem Wildtyp. Signifikant veränderte Toxine (t-Test, n=5, q-Wert < 0,05) sind mit einem Stern (*) markiert.

Wie in der Abbildung 27 ersichtlich, sekretierte die *stk*- und *stk/stp*-Mutante signifikant weniger Adhärenzfaktoren wie die Fibrinogen-bindenden Adhäsine ClfA (6,1- bzw. 9,8-fache), ClfB (4,3- bzw. 11,3-fach) und Efb (2,5- bzw. 4,6-fach) sowie die Fibronectin-bindenden Proteine FnbA (2,1- bzw. 3,7-fach) und FnbB (3,0- bzw. 6,5-fach). Hingegen sekretierte die *stp*-Mutante mit Ausnahme von ClfB die doppelte Menge dieser Adhäsine im Vergleich zum Wildtyp. Die beiden Antikörper-bindenden Proteine Spa und Sbi wurden ebenfalls von der *stp*-Mutante um das 2,1- bzw. 3,7-fache mehr sekretiert als im Wildtyp. Dagegen sekretierten die *stk*- und *stk/stp*-Mutante von Spa (3,0- bzw. 5,3-fach) und von Sbi jeweils 2,3-fach weniger gegenüber dem Wildtyp (Tabelle 29). Weitere immunmodulatorische Proteine wie Chp, Scn und Flr wurden von allen Mutanten zum Teil deutlich weniger sekretiert (2,3- bis 17,1-fache) als vom Wildtyp. Die Sekretion der Serinproteasen SplA und SplB war in alle Mutanten reduziert gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 27). So wurden die Proteasen in der *stk*-Mutante etwas um das 1,5- bzw. 1,3-fache, in der *stk/stp*-Mutante um das 3,5- bzw. 3,2-fache und in der *stp*-Mutante deutlich weniger (n.s.) sekretiert.

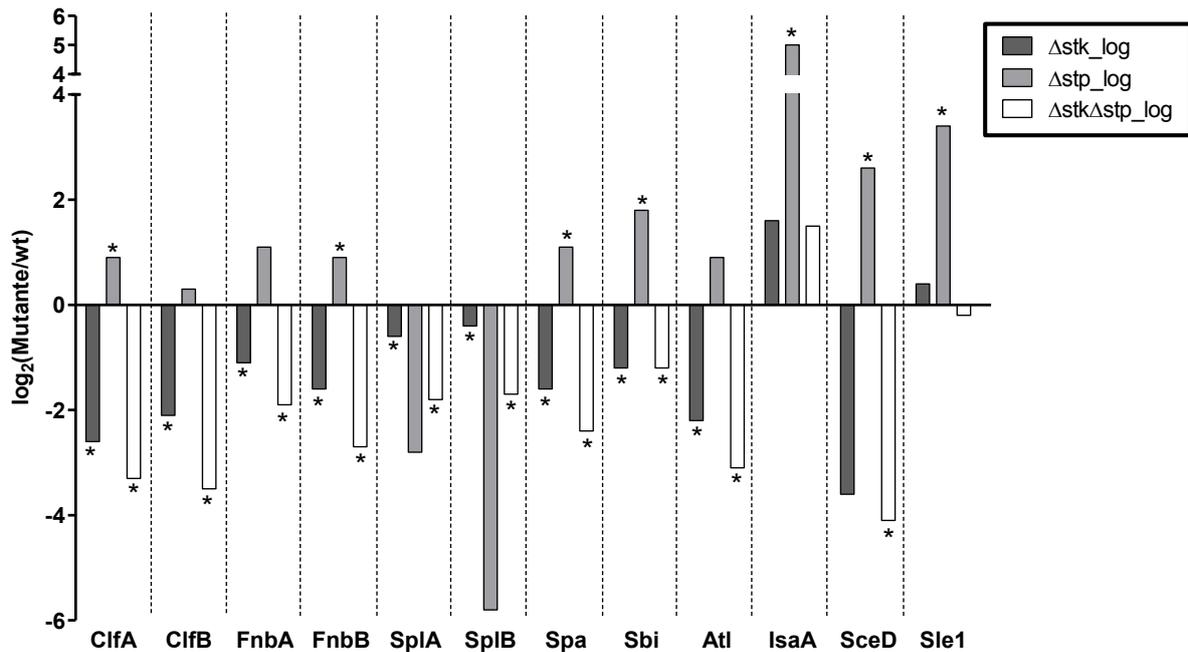


Abbildung 27: Sekretierte Virulenzfaktoren und Zellwandhydrolasen der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Die Abbildung zeigt die Konzentrationen ausgewählter *S. aureus*-Virulenzfaktoren und -Zellwandhydrolasen der Mutanten gegenüber dem Wildtyp. Signifikant veränderte Proteine (t-Test, n=5, q-Wert < 0,05) sind mit einem Stern (*) markiert.

Neben den Adhäsinen sekretierte die *stp*-Mutante deutlich mehr Zellwand-modulierende Enzyme als der Wildtyp (Abbildung 27 und Tabelle 29). So wird die Transglycosylase SceD und die Amidase Sle1 um das 6,1- bzw. 10,6-fache stärker sekretiert. Demgegenüber sekretiert die *stk*- und *stk/stp*-Mutante vom Enzym SceD (12,1- bzw. 17,1-fach) und vom bifunktionellen Autolysin Atl (4,6- bzw. 8,6-fach) deutlich weniger im Vergleich zum Wildtyp. Interessanterweise sekretierten alle Mutanten mehr von der Transglycosylase IsaA. So sekretiert die *stk*- und *stk/stp*-Mutante dreimal mehr und die *stp*-Mutante 32-mal mehr IsaA gegenüber dem Wildtyp.

Die *stk*-Deletion hatte auch einen Einfluss auf die Sekretion von Proteinen des Metabolismus, der Signaltransduktion und auf einige Proteine mit bisher unbekannter Funktion (Tabelle 29). Die *stk*- und *stk/stp*-Mutanten sekretierten z.T. deutlich weniger von den Phosphodiesterasen GlpQ (6,5- bzw. 14,9-fach) und Plc (-3,5- bzw. -9,8-fach), den Eisenaufnahmesystemen SstD (2,1- bzw. 2,8-fach) und IsdA (4,0- bzw. 9,2-fach) und des Cystein-Transporters TcyA (1,4- bzw. 2,0-fach) im Vergleich zum Wildtyp. Die *stp*-Mutante sekretierte diese Proteine mit Ausnahme der vermehrten Sekretion des Eisentransporters SstD (2,6-fach, n.s.) und IsdA (1,9-fach) im gleichen Maße wie der Wildtyp. Die Sekretom-Analyse der Mutanten offenbarte einerseits eine gegenläufige Sekretion von Pathogenitätsfaktoren und Zellwandenzymen, andererseits ein gemeinsames Sekretionsprofil bei Toxinen, Serinproteasen und IsaA im Vergleich der *stp*-Mutante zu der *stk*- und *stk/stp*-Mutante.

4.3.5 Mutanten-spezifische Antikörperantwort im murinen Infektionsmodell

In diesem Versuchsteil wurde die stammspezifische Expression von Oberflächen-assoziierten und sekretierten *S. aureus*-Proteinen untersucht, welche eine Immunantwort in den vakzinierten Mäusen hervorriefen. Dazu wurden Mäuse mit den Wildtyp- und Mutantenstämmen vakziniert und die entsprechenden Mausseren gewonnen. Die Seren wurden anschließend auf den *Staph-Toxin-Array-Ag03* der Firma *Alere Technologies GmbH* (Jena) gegeben. Mithilfe des Arrays erfolgte ein indirekter Nachweis der immunogenen Staphylokokken-Proteine anhand der von der Maus produzierten Antikörper. Die Bindung der Mausantikörper an die Staphylokokken-Antigene des Arrays wurde mithilfe von Anti-Mausantikörper und einem entsprechenden Detektionssystem bestimmt. Der Array war mit 63 *S. aureus*-spezifischen Antigenen immobilisiert. Das Antigenrepertoire des Arrays umfasste neben zytosolischen und extrazellulären Proteinen auch verschiedene Virulenzfaktoren, wie beispielsweise Toxine, Superantigene und Komplement-inhibierende Proteine. Neben den bereits bekannten Proteinen wurden zusätzlich Proteine mit unbekannt Funktionen aus teilweise verschiedenen *S. aureus*-Stammhintergründen auf den Array platziert [107, 108].

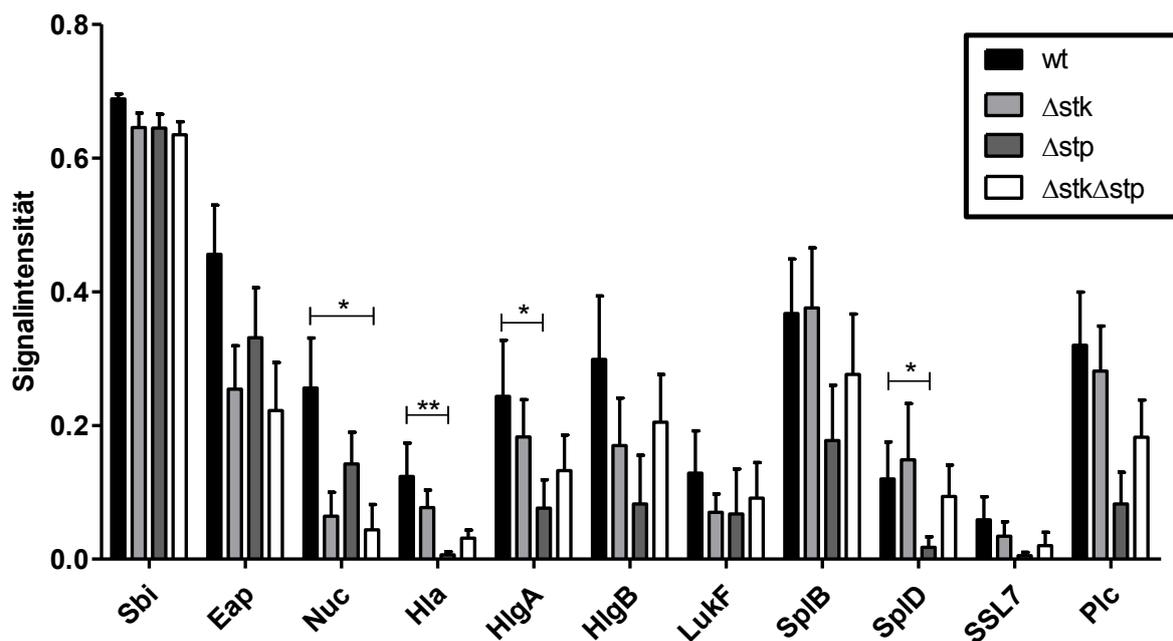


Abbildung 28: Stammspezifische Antikörperantwort im murinen Infektionsmodell.

Die Mäuse (n=8) wurden dreimal intravenös mit einer sublethalen Dosis (5×10^6 Bakterien) der *S. aureus* NewmanHG-Stämme vakziniert, die Seren gewonnen und mittels *Staph-Toxin-Array-Ag03* die stammspezifische Antikörperantwort bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung der jeweiligen Antigene ab einer Signalintensität von $\geq 0,3$ für mindestens einen Probenwert. Die statistische Signifikanz wurde mittels nicht parametrischem, ungepaartem *Mann-Whitney-Test* berechnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Die Signalintensitäten des Arrays lagen zwischen 0,00 und 0,81, wobei Signalintensitäten ab 0,30 für mindestens einen Probenwert aller Stämme als spezifische Antikörperantworten gewertet wurden. Es konnten für 11 der 63 *S. aureus*-Antigene eine Antikörperantwort innerhalb der vier Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Die Antikörperantwort auf Antigene des *S. aureus* NewmanHG-Wildtyps war

im Vergleich zu den Mutanten stets stärker ausgeprägt. Für die *stp*-Mutante konnte für das extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap) und die Thermonuklease (Nuc) eine stärkere Antikörperantwort nachgewiesen werden als für die *stk*- und *stk/stp*-Mutante. Im Gegensatz dazu war die Antikörperantwort auf die Poren-bildenden Toxine Hla, HlgA/B, LukF, dem Superantigen SSL7, den Serinproteasen SplB/D und der Lipase Plc der *stp*-Mutante schwächer ausgeprägt gegenüber den anderen Stämmen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *stp*-Mutante konnte für Hla (p -Wert = 0,004), HlgA (0,040) und SplD (0,024), sowie zwischen Wildtyp und der *stk/stp*-Mutante für Nuc (0,018) ermittelt werden. Die unterschiedlich starke Immunantwort auf die Antigene deutet auf eine veränderte Expression bzw. Sekretion der Antigene der verschiedenen *S. aureus*-Stämmen hin.

Für Stk, Stp und zytosolische Proteine wie Tig, PurA, GreA und CitC konnte keine Immunantwort für alle *S. aureus*-Stämme festgestellt werden. Das β -Hämolysin Hlb konnte im Antikörperprofil nicht detektiert werden, da das Protein aufgrund einer Insertion eines Prophagen ins *hlyB*-Gen im Stamm *S. aureus* NewmanHG nicht exprimiert wird. Darüber hinaus waren Immunantworten auf alle nicht-charakterisierten Proteine sowie Proteine die nur in anderen *S. aureus*-Stämmen vorkommen (z.B. Sek, Sei, Seb, Sec) erwartungsgemäß nicht nachweisbar. Das stärkste Signal lieferte für alle Stämme das IgG-Antikörper-bindende Protein Sbi. Während das Sbi-Fragment ohne Antikörper-bindende Domäne (Sbi III-IV) kein Signal lieferte, zeigte sich beim kompletten Sbi-Protein (Sbi I-IV) in allen *S. aureus*-Stämmen und bei naiven Kontrollmäusen ein Signal. Dies deutet daraufhin, dass das Sbi-Protein auf dem Array die Anti-Maus-Detektionsantikörper bindet und somit eine unspezifische Reaktion hervorruft. Daher ist das Sbi-Signal nicht auswertbar.

4.3.6 Stk und Stp beeinflussen die Hämolyse

Die Transkriptom- und Proteom-Analysen der verschiedenen Mutanten offenbarten eine differenzielle Expression von α - und γ -Hämolyسين. Daher wurde in diesem Versuchsteil überprüft, ob die veränderte Hämolyse-Expression der Mutanten in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen (NewmanHG, HG003 und 8325) einen entsprechenden Phänotyp auf Blutplatten hervorruft. Dazu wurden die Mutanten und der Wildtyp der jeweiligen *S. aureus*-Stämmen auf eine Schafblutplatte pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Durchmesser des Lysehofes dokumentiert. Die *stk*-Mutanten zeigte eine ähnlich starke Hämolyse wie die entsprechenden Wildtypen. Einzig *S. aureus* 8325 Δ *stk* wies gegenüber dem Wildtyp eine stärkere Hämolyse auf. Die *stp*-Mutanten aller *S. aureus*-Stämme zeigten eine deutlich schwächere Hämolyse als der entsprechende Wildtyp. Hingegen war die Hämolyse der Doppelmutanten stärker ausgeprägt gegenüber dem entsprechenden Wildtyp und der *stk*- und *stp*-Mutanten.

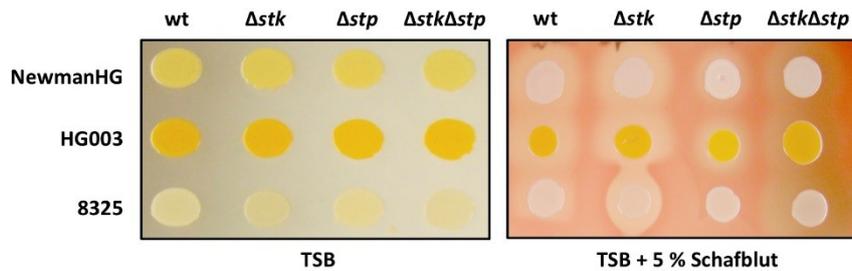


Abbildung 29: Hämolyseverhalten verschiedener *S. aureus*-Stämme.

Kolonien des Wildtyps und der Mutanten der *S. aureus*-Stämme NewmanHG, HG003 und 8325 wurden auf eine TSB-Platte und Blutagarplatte gegeben und für einen Tag bei 37 °C inkubiert. Anhand der Durchmesser der Lysehöfe konnte das Hämolyseverhalten der Stämme bewertet werden. Die *stp*-Mutanten aller *S. aureus*-Stämme zeigten eine deutlich schwächere Hämolyse als der entsprechende Wildtyp.

4.3.7 Metabolom-Analysen der *S. aureus*-Stämme

In einer früheren Studie wurde nachgewiesen, dass die Deletion von *stk* und *stp* einen Einfluss auf die Zellwandsynthese sowie den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel hat [73]. Daher wurden die intrazellulären Metaboliten der *S. aureus*-Stämme in der logarithmischen und stationären Wachstumsphasen analysiert. Die löslichen Metaboliten wurden isoliert und anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die Messung und die Identifizierung der Metaboliten wurden von Daniel Schultz (AG Lalk, Universität Greifswald) durchgeführt.

Es konnten die intrazellulären Metaboliten der Zellwandsynthese sowie die Purinnukleotide (ATP, ADP, AMP, IMP, GTP, GDP und GMP), Pyrimidinnukleotide (UTP, UDP, UMP, CTP, CDP und CMP), einige phosphorylierte Kohlenhydrate (Fru-1,6-BP, PRPP, Rib-5-P und 6-P-Gluconat) und Nukleotid-Zucker (UDP-Glukose, CDP-Glycerol und CDP-Ribitol) in beiden Wachstumsphasen identifiziert und quantifiziert werden (Abbildung 31). Auf die Metaboliten der Zellwandsynthese wird gesondert in Abschnitt 4.2.4 eingegangen. Weitere Metaboliten konnten unter den gewählten Analysebedingungen nicht identifiziert werden. Zur Evaluierung des Extraktions- und Analyseprotokolls wurde die Energieladung (EC) aus dem Adenosin-Nukleotiden berechnet. Die Energieladung der Zelle berechnet sich nach der Formel:

$$\text{Energieladung (EC)} = \frac{(\text{ATP} + 0,5 \times \text{ADP})}{(\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})}$$

Aufgrund des hohen Umsatzes dieser Metaboliten charakterisiert der EC-Quotient den physiologischen Status der Bakterienzelle. Bei guten Metabolitenextraktionen aus exponentiell wachsenden Bakterienzellen sollte der EC-Quotient zwischen 0,8 und 1,0 liegen [73]. Die gemittelte Energieladung der Metabolitenextraktionen aus den Bakterienzellen der logarithmischen Phase lag bei 0,938 bis 0,946 und der stationären Phase bei 0,538 bis 0,773 (Abbildung 30). Die Konzentrationen aller Metaboliten waren in der logarithmischen Phase höher als in der stationären Phase (Abbildung 31). Die Ribonukleotid-Triphosphate (ATP, GTP, UTP, CTP) kamen im Vergleich zu den Ribonukleotid-

Mono- und Diphosphaten in beiden Wachstumsphasen am häufigsten vor. Dabei war ATP das am häufigsten nachgewiesene Metabolit aller Stämme. In der logarithmischen Phase war der Ribonukleotid-Triphosphat-Spiegel mit Ausnahme von GTP in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante höher als im Wildtyp und der *stp*-Mutante. Der GTP-Spiegel war hingegen im Wildtyp und der *stp*-Mutante höher. Die Ribonukleotid-Triphosphat-Konzentrationen in allen Stämmen reduzierten sich in der stationären Phase. In der stationären Phase waren die Ribonukleotid-Triphosphate in der *stp*-Mutante gegenüber dem Wildtyp um das Vierfache reduziert. Der ATP-Spiegel aller Stämme war in der logarithmischen Phase annähernd gleich und verringerte sich in der stationären Phase um den Faktor 8. Der ATP-Spiegel war in der stationären *stp*-Mutante um das 2,6-fache geringer gegenüber dem Wildtyp. Die Konzentration der Ribonukleotid-Diphosphate (ADP, GDP, CTP, UDP) stieg im Übergang von logarithmischen in die stationäre Phase leicht an. Die Ribonukleotid-Monophosphat-Konzentrationen (AMP, GMP, IMP, UMP, CMP) waren in beiden Wachstumsphasen kaum nachweisbar. Der AMP-Spiegel stieg in der stationären Phase bei allen Stämmen an, wobei der Anstieg in den *stk*- und *stk/stp*-Mutante geringer war als im Wildtyp und der *stp*-Mutante.

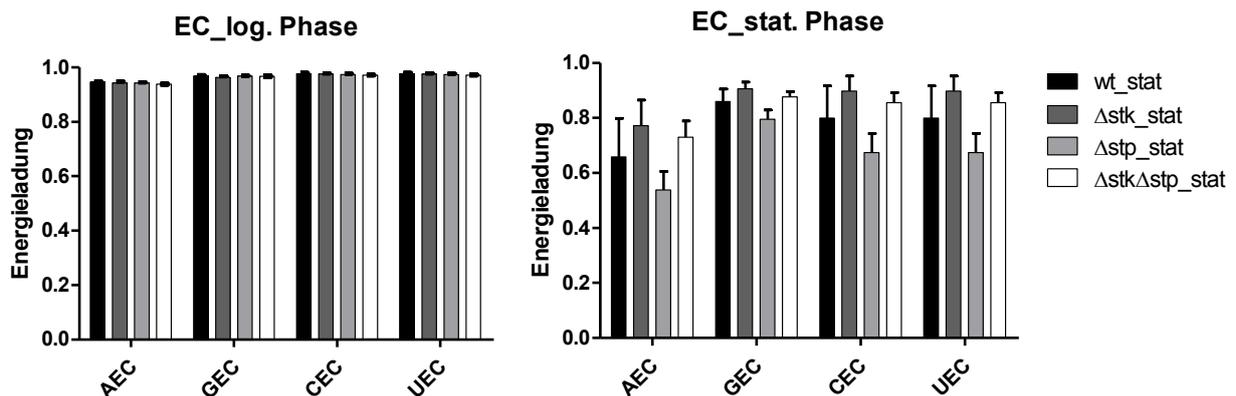


Abbildung 30: Energieladungen der *S. aureus*-Stämme.

Die Balkendiagramme repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung der Ribonukleotid-Energieladung der Stämme, die nach der Formel berechnet wurden: $XEC = \frac{[(XTP) + 0,5 \times (XDP)]}{[(XTP) + (XDP) + (XMP)]}$; X = Adenosin, Guanosin, Uridin, Cytidin

Ein Maß für das Ribonukleotid-Missverhältnis in der stationären Phase dokumentierten die entsprechenden Energieladungen (EC) der verschiedenen Ribonukleotide Adenosin (AEC), Guanosen (GEC), Uridin (UEC), Cytidin (CEC). Während die Energieladungen in der logarithmischen Phase bei den Stämmen konstant zwischen 0,94 – 0,98 lagen, sanken diese aufgrund des Missverhältnisses zwischen Triphosphaten und Mono-/Diphosphaten in der stationären Phase ab (Abbildung 30). Das Ribonukleotid-Missverhältnis in der *stp*-Mutante war im Vergleich zu den anderen Stämmen am deutlichsten ausgeprägt. In der *stp*-Mutante sanken die Energieladungen von 0,94 in der logarithmischen Phase auf 0,54 (AEC), 0,80 (GEC), 0,44 (UEC) und 0,68 (CEC) in der stationären Phase ab. Im Wildtyp und in der *stk*- sowie *stk/stp*-Mutante war das Ribonukleotid-Verhältnis mit einer minimalen Energieladung von 0,70 deutlich stabiler. Die GEC und UEC aller Stämme waren im

Übergang von der logarithmischen in die stationäre Phase stabiler. Die aufgezeigten Veränderungen der Metaboliten zeigten deutlich, dass durch die Reduktion von ATP und UTP und den damit einhergehenden Anstieg von ADP und UDP es zur einen massiven Veränderung des Energiehaushaltes insbesondere in der *stp*-Mutante kam.

In dieser Metabolomstudie konnten die phosphorylierten Kohlenhydrate Fruktose-1,6-Bisphosphat (Fru-1,6-BP), Ribose-5-Phosphat (Rib-5-P), 6-Phosphogluconat (6-P-Gluconat) und Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) identifiziert und quantifiziert werden. Das Glykolyse- und Gluconeogenese-Intermediat Fru-1,6-BP war in der logarithmischen Phase das abundanteste Kohlenhydrat. Hingegen waren Zwischenprodukte des Pentosephosphatweges 6-P-Gluconat und Rib-5-P niedrig abundant in der logarithmischen Phase. 6-P-Gluconat ist ein Zwischenprodukt des Kohlenhydratstoffwechsels und kommt in Pentosephosphatweg und im Entner-Doudoroff-Weg vor.

Rib-5-P ist ein Zwischenprodukt im Pentosephosphatweg und spielt eine wichtige Rolle bei der Synthese von Nukleotiden, Coenzymen und Aminosäuren. PRPP wird aus Rib-5-P und ATP hergestellt und kommt als Zwischenprodukt im Stoffwechsel der Nukleotid- und Aminosäuresynthese vor. Diese vier Kohlenhydrate wurden in der stationären Phase bis zum Detektionslimit aufgebraucht. Es waren keine Unterschiede in der Metabolitkonzentration zwischen dem Wildtyp und den Mutanten nachweisbar.

Die Cytidindiphosphat-Verbindungen CDP-Glycerol und CDP-Ribitol sind wichtige Substrate für den Aufbau von Teichonsäuren in der bakteriellen Zellwand. Beide Verbindungen nahmen im Übergang von der logarithmischen in die stationäre Phase ab. In den *stk*- und *stk/stp*-Mutanten waren die beiden Nukleotid-Zucker in beiden Wachstumsphasen im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In der *stp*-Mutante war insbesondere das CDP-Ribitol gegenüber dem Wildtyp reduziert. UDP-Glucose spielt eine wichtige Rolle im Glucose-Stoffwechsel und ist der Baustein der Glycogensynthese. In der *stk*- (0,13) und *stk/stp*-Mutante (0,12) war UDP-Glucose in der logarithmischen Phase im Vergleich zum Wildtyp (0,09) leicht erhöht. In der stationären Phase war UDP-Glucose kaum nachweisbar.

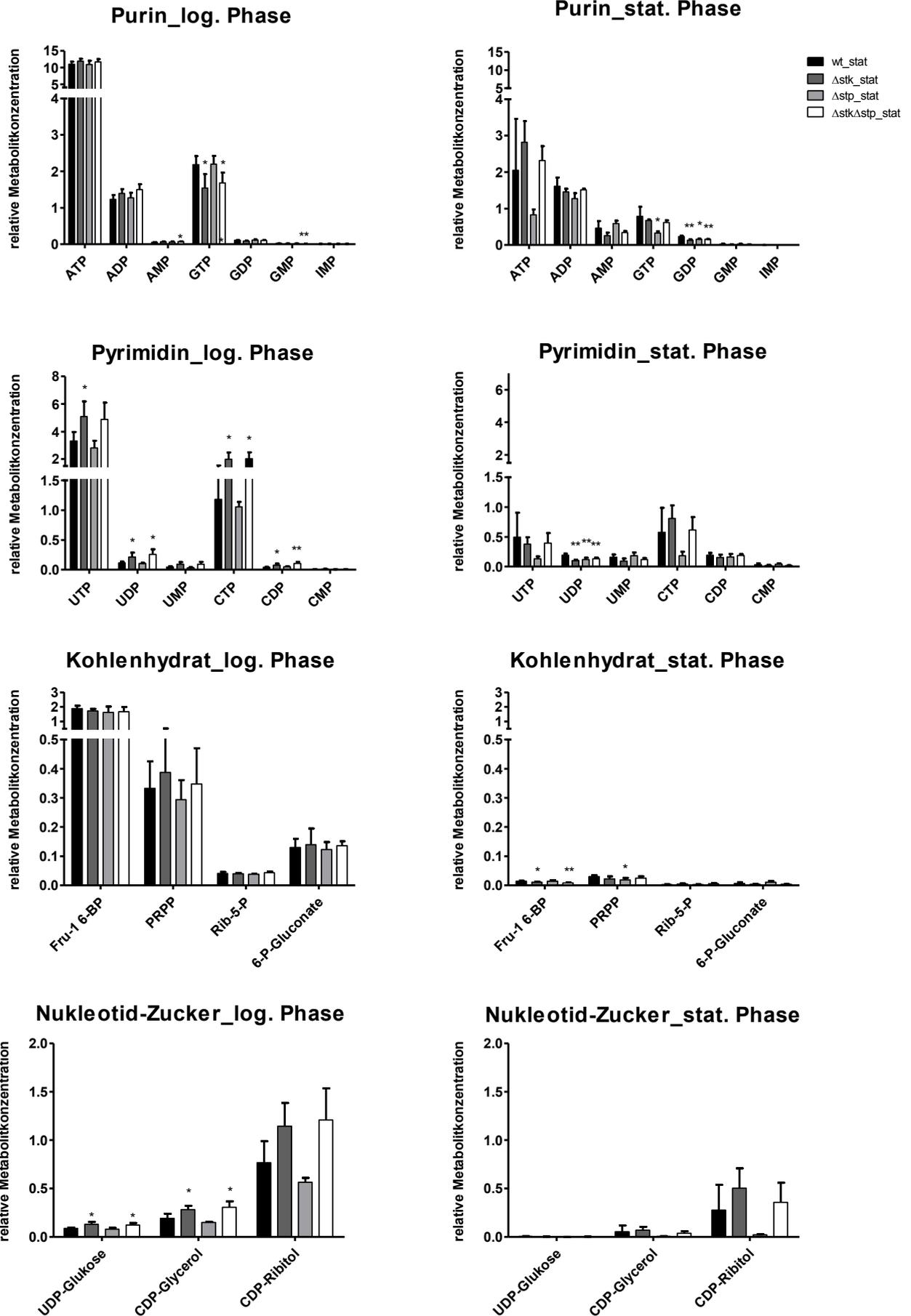


Abbildung 31: Metabolitkonzentrationen der *S. aureus*-Stämme.

Die Balkendiagramme repräsentieren die relative Metabolitkonzentration bezogen auf einen internen Standard. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung (n=4). Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Test berechnet (* p < 0,05, ** p < 0,01). Abkürzungen: ATP, ADP, AMP...Adenosin-Tri-/Di-/Monophosphat, IMP...Inosinmonophosphat; GTP, GDP, GMP...Guanosin-Tri-/Di-/Monophosphat, CTP, CDP, CMP...Cytidin-Tri-/Di-/Monophosphat, UTP, UDP, UMP...Uridin-Tri-/Di-/Monophosphat, Fru-1,6-BP, Fruktose-1,6-Biphosphat, PRPP...Phosphoribosylpyrophosphat, Rib-5-P...Ribose-5-Phosphat

4.3.8 Analyse von Protein-Protein-Interaktion mittels bakteriellem Zwei-Hybrid-Systems

Zur Identifizierung und Validierung potentieller Interaktionspartner von Stk und Stp wurde das bakterielle Zwei-Hybrid-System (B2H) der Firma *Euromedex* verwendet. Die Vektoren potentieller Interaktionspartner wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert oder von den Arbeitsgruppen Daniel Lopez (IMIB, Würzburg) und Simon Foster (Universität Sheffield, England) bereitgestellt (Tabelle 31). Das Prinzip des B2H-Systems ist in Abschnitt 3.13 beschrieben. Protein-Protein-Interaktionen waren durch Blaufärbung der Kolonien auf einer Indikatorplatten erkennbar.

4.3.8.1 Die PASTA-Domänen von Stk sind wichtig für die Dimerisierung von Stk

Die in der Zellmembran-lokalisierte Kinase Stk interagiert mit sich selbst (Abbildung 32) und schwach mit der Phosphatase Stp (Abbildung 32C). Die schwache Stk-Stp-Interaktion basierte auf einer späten, und blassen Blaufärbung der entsprechenden Kolonien. Der β -Galaktosidase-Assay wies mit 97 MUG-Einheiten ebenfalls einen leicht über dem Schwellenwert (90 MUG) erhöhten Wert auf (Abbildung 17) und daher ist die Stk-Stp-Interaktion als schwach positiv zu werten. Die Homodimerisierung von Stk wird aufgrund der hohen 232 MUG Einheiten (p < 0,01) im β -Galaktosidase-Assay bestätigt (Abbildung 17).

Zur Charakterisierung der Stk-Stk-Dimerisierung wurden Stk-Fragmente von Christian Schenk (AG Ohlsen, Masterarbeit) hergestellt, bei denen sequentiell die extrazellulären Domänen (C-terminale Subdomäne und die PASTA-Domänen 1 bis 3) entfernt wurden (Abbildung 32A). Bei dieser Analyse zeigte sich, dass Stk₁₋₆₆₄ trotz der Entfernung der C-terminalen Subdomäne (Stk₁₋₅₇₆), der dritten PASTA-Domäne (Stk₁₋₅₁₃) sowie der dritten und zweiten PASTA-Domänen (Stk₁₋₄₄₄) in der Lage war zu interagieren. Durch die Entfernung aller extrazellulären Domänen konnte die intrazelluläre Kinase-Domäne (Stk₁₋₃₃₅) nicht mehr mit Stk₁₋₆₆₄ interagieren.

Die für die Aktivierung der Kinase wichtigen Threonine Thr₁₆₄ und Thr₁₆₆ in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne wurden durch einen phospho-ablativen Aminosäureaustausch mit Alanin von Christian Schenk verändert. Diese Aminosäureaustausche (T164A, T166A und T164A/T166A) hatte keinen Einfluss auf die Dimerisierung von Stk (Abbildung 32B).

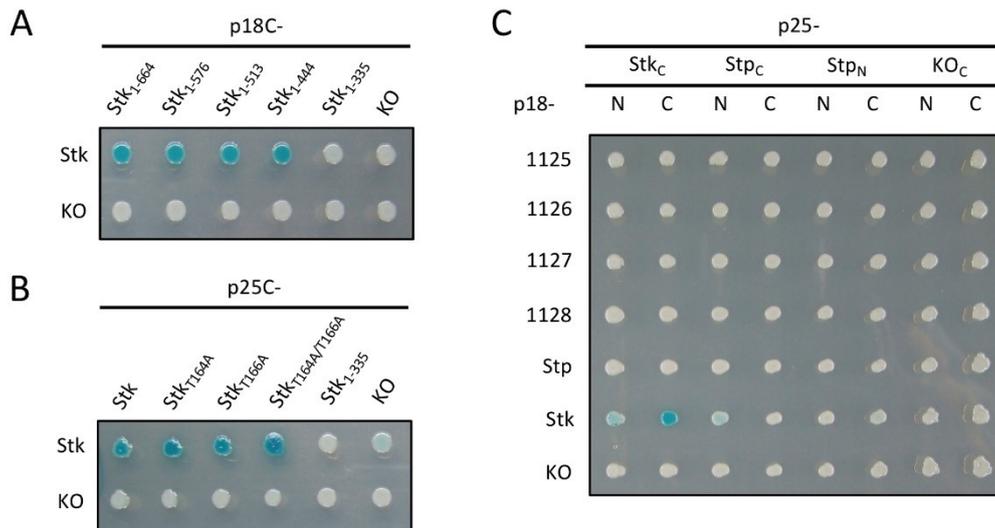


Abbildung 32: Charakterisierung der Stk-Stk-Interaktion mittels B2H.

(A) Stk interagiert mit Stk (Stk₁₋₆₆₄) sowie mit verschiedenen Fragmenten von Stk. Dem Stk-Fragment Stk₁₋₅₇₆ fehlt die C-terminale Subdomäne, Stk₁₋₅₁₃ fehlt zusätzlich die PASTA 3-Domäne, Stk₁₋₄₄₄ die PASTA 2-Domäne und Stk₁₋₃₃₅ die PASTA 1-Domäne. (B) Der Threonin-Alanin-Austausch von T₁₆₄A und T₁₆₆A, sowie T₁₆₄A und T₁₆₆A in der Aktivierungsschleife von Stk hatte keinen Einfluss auf die Dimerisierung. (C) Stk interagiert nur mit sich selbst und schwach mit Stp, aber mit keinem anderen Protein aus dem *stp/stk*-Operon. Für B2H-Analysen wurden die Co-Transformanten auf X-Gal-Indikatorplatten gestempelt. Blaue Kolonien zeigen die Rekonstitution der Adenylatzyklase aufgrund der Protein-Protein-Interaktion der Fusionsproteine in einen Δ *cyd* *E. coli* BTH101-Stamm. Es wurde eine Positivkontrolle bestehend aus den Kontrollplasmiden pKT25-*zip*/pUT18-*zip* durchgeführt, aber nicht in dieser Abbildung dargestellt. Die Testung der einzelnen Vektoren mit den leeren Vektoren p25C und p18C dient als Negativkontrolle (KO). Jede Interaktion wurde mindestens dreimal getestet.

4.3.8.2 *Stk* und *Stp* interagieren nicht mit Proteinen aus dem *stp/stk*-Operon

Die Gene *stp* und *stk* sind beide am 3'-Ende eines polycistronischen Operons mit vier weiteren Genen lokalisiert. Da diese Gene in Staphylokokken hoch konserviert sind, besteht die Annahme, dass diese Proteine möglicherweise miteinander interagieren. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden die Proteine des Operons in die p18N- und p18C-Vektoren kloniert und ein B2H-Assay durchgeführt (Abbildung 32C). Stk und Stp interagierten mit keinem der Proteine des Operons Def (NWMN_1125), Fmt (NWMN_1126), Sun (NWMN_1127) und RlmN (NWMN_1128). Stk interagiert lediglich mit sich selbst und schwach mit Stp. Aufgrund der fehlenden Phosphorylierung an den getesteten Zielproteinen interagiert Stp in der B2H-Analyse mit keinem Protein außer Stk.

4.3.8.3 *Stk* interagiert mit den verschiedensten Proteinen

Im folgenden Abschnitt wurde mithilfe der B2H-Analysen nach potentiellen Interaktionspartnern von Stk und Stp gesucht. Es wurde untersucht, ob Stk und Stp mit Proteinen von Zweikomponentensystemen (WakK, GraRS, VraSR), Histidinkinasen (SrrB, PhoR, HssS, AgrC, NsaS, Arls, SaeS), Proteinen des Flotillin-Operons (NWMN_1475, FloA, NfeD), Typ-7-Sekretionssystemproteinen (EssABC, EsaA), Transporterproteinen (SecA, SecDF, PmtA/C), Strukturproteinen (MreC/D, FtsZ) und weiteren Proteinen (EbpS, Cls1/2, CvfA, ClpC, ComK, Mdh) interagiert. Darüber hinaus wurde neben SepF, MecA, FtsH, SrtA und DtlD weitere Proteine der Zellwandsynthese- und Zellteilungsproteine auf potentielle Stk- und

Stk-Interaktionen getestet. Die Interaktion von Stk und Stp mit Zellwandsynthese- und Zellteilungsproteine ist einem gesonderten Abschnitt gewidmet (Abschnitt 4.2.5). Außerdem sollten aus der Literatur bekannte Stk-Zielproteine (CcpA, VraR, GraR, PurA, WalRK) sowie Proteine aus der Interaktomstudie (NWMN_0969, NWMN_1518, MprF, EssC, GpsB, AgrC, ArlS, WalK, PmtA, FtsK, FtsW) (Abschnitt 4.3.3) validiert werden.

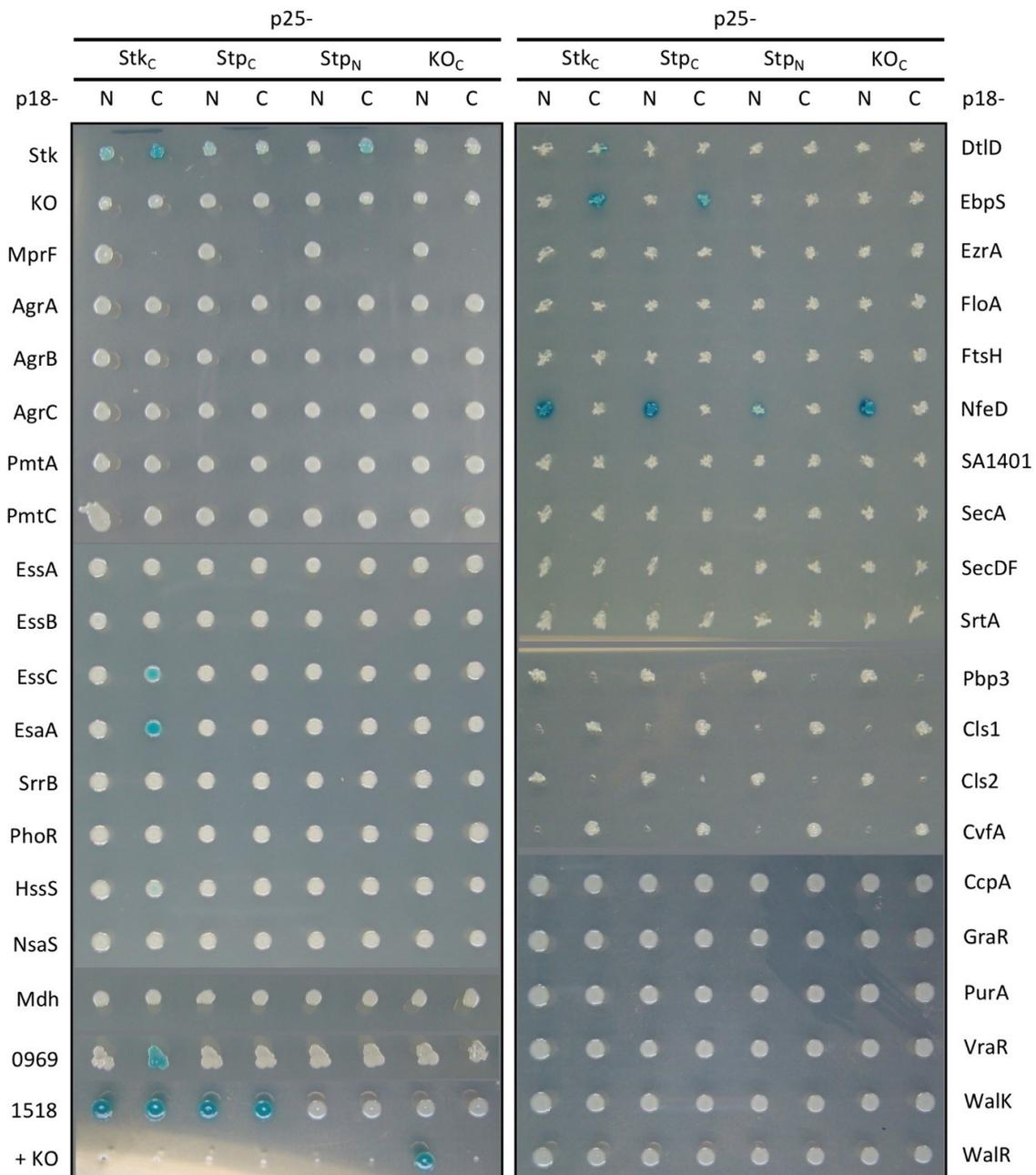


Abbildung 33: Testung und Validierung potentieller Interaktionspartner von Stk und Stp mittels B2H.

In dieser B2H-Analyse wurden N- und C-terminale T18-Fusionsproteine (p18N- und p18C-Plasmid) mit Stk und Stp (p25N/C-Stk/Stp) auf Protein-Protein-Interaktionen getestet. Einige Plasmide wurden dankenswerterweise von der AG Lopez (IMIB, Würzburg) bereitgestellt. Blaue Kolonien zeigen Protein-Protein-Interaktionen der getesteten Fusionsproteine auf einer Indikatorplatte an. Als Positivkontrolle dienten die Kontrollplasmide pKT25-*zip*/pUT18-*zip* (+KO). Die Testungen der einzelnen Vektoren mit den leeren Vektoren p25C und p18C dienten als Negativkontrolle (KO). Jede Interaktion wurde mindestens dreimal getestet. Für MprF, Pbp3, Cls1, Cls2 und CvfA gab es jeweils nur ein p18N- oder p18C-Plasmid, sodass jeweils eine Leerstelle auf der Indikatorplatte zu sehen ist.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die STPK Stk und die STPP Stp in *S. aureus* charakterisiert. Dazu wurden monoklonale α Stk-Antikörper hergestellt, mit denen anschließend Lokalisations- und Interaktionsstudien durchgeführt wurden. Bei der Suche nach neuen Interaktionspartnern von Stk und Stp gerieten insbesondere die Proteine der Zellwandsynthese in den Fokus dieser Arbeit. Durch die Anwendung verschiedener Techniken konnte der auffällige Zellwandphänotyp der *stp*-Mutante aufgeklärt werden. Die wesentlichen Erkenntnisse bezüglich der Regulation der Zellwandsynthese durch Stk und Stp konnten in einem Modell zusammengeführt werden. Zudem wurden die *stk*-, *stp*- und *stk/stp*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mit verschiedenen *Omic*s-Technologien analysiert. Dabei wurden vergleichende Analysen des Transkriptoms, Proteoms, Metaboloms und Sekretoms durchgeführt.

5.1 Molekulare Charakterisierung von Stk und Stp

5.1.1 Charakterisierung des monoklonalen Stk-Antikörpers

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig monoklonale Antikörper hergestellt, die sich spezifisch gegen die Kinase Stk richten. Frühere Arbeiten nutzten Maus- bzw. Hasen-Antiseren zur Detektion von Stk in verschiedenen Staphylokokken- und der Streptokokken-Lysaten [86, 112, 113]. Die in dieser Arbeit hergestellten α Stk-Antikörper wurden zur Kontrolle der *stk*-Deletion in den Mutanten, zur Bestimmung der Stk-Expression in *S. aureus*-Lysaten und als Stk-Fangantikörper in der Immunpräzipitation eingesetzt. Monoklonale Antikörper binden im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern an ein einziges Epitop des Antigens. Sie besitzen somit eine hohe Spezifität gegen das Antigen und weisen eine gute Reproduzierbarkeit dieser Antigen-Antikörperbindung auf. Durch die angewandte Hybridomtechnik lassen sich monoklonale Antikörper bei entsprechendem Bedarf in deutlich höheren Mengen herstellen. In dieser Arbeit wurden durch Western Blot, Dot Blot und ELISA fünf α Stk-Antikörper ausgewählt, welche spezifisch an Stk binden. Der Antikörper 2 (Klon 10-3-4) band an die intrazelluläre Kinasedomäne von Stk, wohingegen die Antikörper 1, 3, 4 und 5 an die extrazellulären PASTA-Domänen von Stk banden. In den Western Blot-Analysen wurde aus Gründen der Reproduzierbarkeit stets der Antikörper 3 (Klon 14-5-4) als α Stk-Antikörper verwendet. In einigen Versuchen wurde außerdem der Kinasedomäne-bindende Antikörper 2 (Klon 10-3-4) als α Stk_{KD} verwendet. Das polyklonale α Stp-Antiserum (α Stp) stammt aus den Vorarbeiten von Stefanie Krieger (AG Ohlsen) und wurde durch wiederholte Vakzinierung von Mäusen mit Stp gewonnen.

Die *stk*- bzw. *stp*-Mutanten (Δ *stk*, Δ *stp* und Δ *stk* Δ *stp*) in den verschiedenen Stammhintergründen (NewmanHG, HG003, 8325, SH1000, COL) wurden ebenfalls von Stefanie Krieger hergestellt [63, 94,

114]. Mithilfe der α Stk/ α Stp-Antikörper konnte der Nachweis auf Proteinebene erbracht werden, dass Stk in der *stk*-Mutante, Stp in der *stp*-Mutante sowie beide Proteine in der Doppelmutante nicht exprimiert werden. Im Wildtyp der verschiedenen *S. aureus*-Stämme waren Stk und Stp stets nachweisbar. Stp wurde erwartungsgemäß bei einer molekularen Masse von 28 kDa nachgewiesen. Das theoretische Molekulargewicht für Stk liegt laut Datenbanken bei 75 kDa. Interessanterweise war Stk im Western Blot unter denaturierenden Bedingungen bei 100 kDa nachweisbar. Diese Diskrepanz im molekularen Gewicht wird vermutlich durch die zahlreichen Phosphorylierungen an Stk hervorgerufen. Darüber hinaus könnte Stk unvollständig denaturiert sein, oder Stk ist in einem Proteinkomplex assoziiert. Unter nativen Bedingungen wies Stk ein molekulares Gewicht von 250 kDa auf. Das Ergebnis lässt den Schluss zu, dass Stk in einem Proteinkomplex assoziiert ist. In *B. subtilis* interagiert die STPK PrkC mit den Zellteilungsproteinen GpsB, DivIVA und EzrA im Septum der Zelle, welche dort maßgeblich die Aktivität von PrkC beeinflussen [115]. Demzufolge könnte Stk ebenso mit Zellteilungsproteinen in einem Proteinkomplex vorliegen, die möglicherweise die Aktivität von Stk regulieren. Denkbar wäre auch eine gemeinsame Lokalisation von Stk und Stp, die durch ein noch nicht identifiziertes Protein vermittelt wird.

In den Western Blot-Analysen von *S. aureus*-Lysaten waren stets Hintergrundsignale bei 50 kDa und 55 kDa erkennbar. Diese Signale beruhen in *S. aureus* auf den Antikörper-bindenden Proteinen Spa und Sbi. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mithilfe von Martina Selle (AG Ohlsen) Doppel- bzw. Dreifachmutanten hergestellt, die neben der *stk*-, *stp*- oder *stk/stp*-Deletion auch eine *spa*-Deletion in *S. aureus* NewmanHG aufweisen, um so die störenden Hintergrundsignale zu reduzieren. Die entsprechenden Mutanten (Δ *stk* Δ *spa*, Δ *stp* Δ *spa* und Δ *stk* Δ *stp* Δ *spa*) konnten für vergleichende Studien nicht verwendet werden, da die *stk/spa*-Mutante eine Mutation im *agrC*-Gen aufweist. Diese Mutation führt zu einer verkürzten AgrC-Variante, welche die typische Hämolyse der *stk*-Mutante verhindert und somit einen veränderten Phänotyp aufweist. Die *stk/spa*-Mutante wurde nur für die Immunpräzipitation verwendet, da hierbei die Antikörper-bindenden Eigenschaften von Spa störender sind, als der veränderte Phänotyp der *stk/spa*-Mutante.

5.1.2 Stk und Stp sind in der Zellmembran lokalisiert

Stk ist laut Datenbanken ein Membranprotein, welches eine Transmembrandomäne besitzt, die die intrazelluläre Kinasedomäne mit den extrazellulären PASTA-Domänen verbindet. Die Western Blot-Analyse der verschiedenen Zellfraktionen offenbarte, dass Stk in der Membran und der Zellwand lokalisiert ist. Die schwache Stk-Bande in der Zytoplasmafraktion geht vermutlich auf Rückstände der Membranfraktion im Zytoplasma durch eine unzureichende Ultrazentrifugation hervor. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse einer Studie von Debarbouille *et al.* (2009), die ebenfalls die Lokalisation von Stk in der Membran, im Zytoplasma und in der Zellwand belegen [60]. Immun-

fluoreszenz-Studien zeigen, dass Stk und dessen orthologe STPKs vorrangig in der septalen Membran von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *M. tuberculosis* lokalisiert sind [66, 116, 117]. Eine Deletion aller PASTA-Domänen führt zu einer Delokalisation der STPKs aus dem Septum [66, 116]. Im Gegensatz dazu sind die PASTA-Domänen in *B. subtilis* irrelevant für die septale Lokalisation der STPK PrkC [118].

In der Studie von Miller *et al.* ist Stk im Zellkulturüberstand nachgewiesen worden. Die Autoren postulieren, dass das sekretierte Stk möglicherweise in die Wirtszelle gelangt und dort durch Phosphorylierung die Funktion von verschiedenen Wirtsproteinen beeinflusst [84]. Das Eindringen und das Umprogrammieren der Wirtszelle während einer Infektion wurde bereits für die beiden STPKs YpkA von *Yersinia pestis* und PknG von *M. tuberculosis* beschrieben [119, 120]. In der Miller-Studie konnten mithilfe eines Peptid-Mikroarrays 68 humane Zielproteine von Stk identifiziert werden, welche zahlreiche Prozesse in der Wirtszelle steuern [84]. Dem kann man entgegen halten, dass sowohl in dieser Arbeit als auch in weiteren Studien Stk nicht im Überstand nachgewiesen werden konnte [60]. Auch die Sekretomdaten der Mutanten sowie die fehlende Antikörperantwort auf Stk im murinen Infektionsmodell lässt die postulierte Sekretion von Stk zweifelhaft erscheinen. Der Befund von Miller *et al.* lässt sich vermutlich auf noch intakte Zellen oder Membranrückstände mit Stk im Zellkulturüberstand zurückführen. Diese Kontaminationen hätte man mittels Ultrafiltration und Ultrazentrifugation umgehen können.

Die Phosphatase Stp ist laut Datenbanken ein zytosolisches Protein, das keine Membrandomäne besitzt. Stp war daher erwartungsgemäß nicht in der Zellwand, im Überstand und im Sekretom nachweisbar und verursachte daher im Infektionsversuch keine Antikörperantwort. Interessanterweise offenbarte die Lokalisationsstudie, dass Stp in der Membran und nicht im Zytoplasma lokalisiert ist. Eine Immunfluoreszenz-Studie von Ulrych *et al.* zeigt, dass die Pneumokokken-STPP PhpP im Zytoplasma lokalisiert und insbesondere im Bereich des Septums angereichert ist. Dabei ist die PhpP-Lokalisation am Septum abhängig vom Vorkommen der aktiven Kinase StkP. Beide Enzyme StkP/PhpP bilden ein funktionelles Paar für die Signalweiterleitung [121]. Möglicherweise ist Stp mit Stk oder einem anderen Membranprotein an der Membran gemeinsam lokalisiert und befindet sich somit im direkten Reaktionsbereich von Stk. So könnte Stp die aktive, autophosphorylierte Kinase Stk oder deren phosphorylierte Zielproteine wieder dephosphorylieren und somit ein Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung herstellen.

5.1.3 In der *stp*-Mutante akkumulieren phosphorylierte Proteine

Um die Auswirkungen von Stk und Stp auf das Phosphoproteom der Bakterienzelle zu untersuchen, wurden mittels Anti-Phosphothreonin-Western Blots das Phosphoproteom des Wildtyps und der Mutanten in verschiedenen Wachstumsphasen analysiert. Der verwendete polyklonale Phosphothreonin-Antikörper detektiert phosphorylierte Proteine, die unabhängig von der umgebenden

Aminosäuresequenz an Threoninresten phosphoryliert sind. Aufgrund der geringen Spezifität eignet sich dieser Antikörper, um möglichst viele phosphorylierte Proteine im Western Blot zu detektieren. In dieser Phosphoproteom-Studie konnte gezeigt werden, dass Stk im Wildtyp phosphoryliert ist. Diese *in vivo* Phosphorylierung wurde ebenfalls für StkP von *S. pneumoniae* beobachtet [121]. Die Phosphorylierung von Stk war zu jedem Zeitpunkt in den verschiedenen Wachstumsphasen erkennbar. Besonders stark war die Phosphorylierung von Stk in der logarithmischen Wachstumsphase ausgeprägt. In der logarithmischen Phase kommt es aufgrund des schnellen Wachstums zu einer verstärkten Zellwandsynthese und Zellteilung. Stk nimmt eine wichtige Rolle bei der Regulation dieser Prozesse ein [94]. Daher scheint Stk während der Phase des intensiven Wachstums und der Teilungen durch eine verstärkte Autophosphorylierung besonders aktiv zu sein. Die Autophosphorylierung fand an Ser₁₅₉, Thr₁₆₁, Ser₁₆₂, Thr₁₆₄ und Thr₁₆₆ der Aktivierungsschleife von Stk statt [62, 114]. Diese zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierungsstellen von Stk sind verantwortlich für die optimale Aktivität der Kinase. Hingegen ist die *Cis*-Autophosphorylierung am Thr₁₇₂ am GT/S-Motiv essentiell für die Selbstaktivierung der Kinase [62]. Die verschiedenen Phosphorylierungsstellen in der Aktivierungsschleife sind vermutlich abhängig von den Wachstumsphasen unterschiedlich stark phosphoryliert. Der entsprechende Phosphorylierungsgrad spiegelt möglicherweise die Aktivität von Stk wider. Im Wildtyp waren neben Stk noch weitere Proteine phosphoryliert. Diese Proteine sind keine Zielproteine von Stk, da diese Proteine auch in den *stk*- und *stk/stp*-Mutanten phosphoryliert waren. Vermutlich werden diese Proteine durch andere Kinasen phosphoryliert.

Es zeigte sich in der Western Blot-Analyse, dass das Phosphoproteom des Wildtyps mit Ausnahme der Stk-Phosphorylierung dem der *stk*- und *stk/stp*-Mutante gleicht. Dagegen unterscheidet sich das Phosphoproteom des Wildtyps von *S. suis* deutlich im Vergleich zur *stkP*-Mutante, da in *stkP*-Mutante keine phosphorylierte Proteine mittels Western Blot nachweisbar waren. Hingegen sind in der Phosphatase-Mutante (*ΔphpP*) von *S. suis* deutlich mehr phosphorylierte und z.T. auch hyperphosphorylierte Proteine detektiert worden [121]. Ein ähnlicher Phänotyp ist in der *stp*-Mutante erkennbar. Im Vergleich zum Wildtyp waren in der *stp*-Mutante mehr Proteine phosphoryliert. Der Phosphorylierungsgrad dieser Proteine nahm in den späteren Wachstumsphasen sukzessiv zu. Stk ist in der *stp*-Mutante deutlich stärker phosphoryliert und der Phosphorylierungsgrad von Stk nahm ebenfalls in den späten Wachstumsphasen zu.

Die Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass Stk *in vivo* stets eine Grundaktivität aufweist. Die aktive Kinase Stk phosphoryliert die Substrate, welche nach der Signalweiterleitung sofort durch Stp wieder dephosphoryliert werden und somit den nicht-phosphorylierten Ausgangszustand wieder herstellen. Vermutlich ist aufgrund der Anwesenheit von Stp im Wildtyp das Gleichgewicht der Phosphorylierung und Dephosphorylierung zugunsten der Phosphatase verschoben. Daher

unterscheidet sich das Phosphoproteom des Wildtyps kaum von dem der *stk*- und *stk/stp*-Mutante. Hingegen können in der *stp*-Mutante phosphorylierte Proteine nicht mehr dephosphoryliert werden, sodass diese Phosphoproteine in der Zelle allmählich akkumulieren. In der stationären Wachstumsphase teilen und erneuern sich die Bakterienzellen nicht mehr ausreichend, sodass die Phosphoproteine in den Zellen akkumulieren und so die Zellphysiologie stören.

5.1.4 Charakterisierung des *stp/stk*-Operons

stk und *stp* sind hoch konserviert in MRSA und MSSA [51]. Beide Gene sind in einem hexacistronischen Operon organisiert (Abbildung 1). Das Operon codiert eine Peptiddeformylase (*def*, *NWMN_1125*), eine Methionyl-tRNA-Formyltransferase (*fmt*, *NWMN_1126*), eine 16S rRNA-Methyltransferase (*sun*, *NWMN_1127*), eine 23S rRNA Methyltransferase (*rlmN*, *NWMN_1128*) sowie Stp (*NWMN_1129*) und Stk (*NWMN_1130*). Stp und Stk werden gemeinsam transkribiert. Das Stopp-Codon von *stp* und das Startcodon von *stk* überlagern sich in vier Nukleotiden (ATGA) [51, 63]. Bioinformatische Analysen prognostizieren einen Transkriptionsstartpunkt vor dem ersten Gen des Operons *def* sowie einen vor dem *stk*-Gen [122]. Somit wird vermutlich das komplette Operon (6,5 kbp) gemeinsam transkribiert. Außerdem wäre ein eigenes Transkript für *stk* zu erwarten. Die bioinformatischen Ergebnisse werfen daher folgende Fragen auf: Welcher Regulator induziert/reprimiert die Transkription des Operons? Wird die Aktivität des Regulators durch reversible Phosphorylierung mittels Stk und Stp reguliert? Hat *stk* einen eigenen Regulator, der unter bestimmten Bedingungen unabhängig vom Operon aktiviert wird? Besteht aufgrund der gemeinsamen Transkription ein funktioneller Zusammenhang zwischen den Genen des Operons? Diese Fragen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht bearbeitet. Jedoch liefern die angewandten Methoden einige neue Aspekte über die Transkripte und Proteine des Operons.

In der *stk*- und *stk/stp*-Mutante waren die Gene *sun* und *rlmN* etwas stärker exprimiert im Vergleich zum Wildtyp. Hingegen war die Proteinmenge von Fmt, Sun und RlmN gegenüber dem Wildtyp unverändert. In der *stp*-Mutante waren das Gen *fmt* unverändert, aber die Transkript- und Proteinmenge von *sun* (Sun) und *rlmN* (RlmN) waren deutlich reduziert. Möglicherweise wirkt sich die Deletion von *stp* massiv auf die Stabilität des Transkripts aus, oder die Deletion hat einen polaren Effekt auf die beiden vorgelagerten Gene. Die B2H-Analyse offenbarte, dass Stk nur mit Stp, aber mit keinem anderen Protein aus dem Operon interagiert. Stp interagierte mit Ausnahme von Stk mit keinem der getesteten Fusionsproteine in den B2H-Analysen. Möglicherweise ist die rRNA Methyltransferase RlmN dennoch ein Zielproteine von Stk und Stp, da für dieses Enzym eine *in vivo* Phosphorylierungsstelle am Thr₆₂ identifiziert wurde [31].

5.2 Stk und Stp regulieren die Zellwandsynthese in *S. aureus*

Die Zellwand erhält die Form der Bakterienzelle, schützt die Bakterien vor äußeren Umwelteinflüssen und hält den inneren Turgor stand. Die Synthese der Zellwand ist ein sehr komplexer und zeitlich sowie räumlich koordinierter Prozess. Obwohl die Hauptkomponenten der Zellwand schon lange bekannt sind, ist das komplexe regulatorische Netzwerk der Zellwandsynthese und der Zellteilung noch nicht ausreichend verstanden. Einen großen Einfluss auf die Regulierung und Koordination der Zellwandsynthese üben die Zweikomponentensysteme VraRS [123], GraRS [124] und WalRK [125] aus. Einige Studien stellten fest, dass Stk ebenfalls eine wichtige Rolle im Zellwandmetabolismus [51, 73] und in der Zellteilung einnimmt [51, 94]. Stk interagiert mit den Zweikomponentensystem VraSR [91], GraRS [90] und WalRK [66], was eine gemeinsame und damit koordinierte Regulation der Zellwandsynthese vermuten lässt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde analysiert, welchen Einfluss reversible Phosphorylierungen durch Stk und Stp auf die Regulation der Zellwandsynthese und Zellteilung haben.

5.2.1 Die *stp*-Mutante hat eine dickere Zellwand

Die Untersuchungsergebnisse legen nahe, dass Stk und Stp in der Regulation der Zellwandsynthese involviert sind. Dabei hatte die *stp*-Deletion einen größeren Einfluss auf die Zellwandzusammensetzung als die Deletion des *stk*-Gens. Die *stp*-Mutante hatte eine deutlich dickere Zellwand als der Wildtyp und die *stk*-Mutante. Dieser verdickte Zellwandphänotyp der *stp*-Mutante wurde auch in den MRSA-Stämmen N315 [51], MW2 [86] und USA300 [55] beobachtet. Der molekulare Mechanismus, welcher zu einer verdickten Zellwand führt, ist vielschichtig und umfasst Mutationen in vielen regulativen Signalwegen wie *vraSR* [126], *graRS* [126], *walRK* [126] und *stk/stp* [55]. Ebenso kann Nährstoffmangel, insbesondere eine Glycin-Depletion mit einem verdickten Zellwandphänotyp in Verbindung gebracht werden [127]. Der exakte Mechanismus scheint multifaktoriell zu sein und ist momentan noch nicht endgültig aufgeklärt.

5.2.2 In der *stp*-Mutante akkumulieren Muropeptide mit unvollständigen Interpeptidbrücken

Um die Ursache für die verdickte Zellwand der *stp*-Mutante zu finden, wurden die Muropeptide des PGNs der Stämme untersucht. Muropeptide bestehen aus dem Disaccharid MurNAc-GlcNAc, dem Stammpeptid *L*-Ala-*D*-Gln-*L*-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala und einer Pentaglycin-Interpeptidbrücke. In *S. aureus* katalysieren die FemXAB-Peptidyltransferasen die nicht-ribosomale Synthese der Interpeptidbrücke. Dabei werden schrittweise fünf Glycinmoleküle an das *L*-Lysin des Lipid II-Stammpeptids angelagert. Die Peptidyltransferase FemX lagert das erste Glycin, FemA das zweite und dritte, und FemB das vierte und fünfte Glycin an das Lipid II-Molekül und synthetisieren somit das Pentaglycin-Lipid II [128-130]. Das Schlüsselenzym in der Synthese der Interpeptidbrücke ist FemX, da einerseits die initiale

Anlagerung des ersten Glycins nicht durch FemA/B komplementiert werden kann und andererseits *femX* für *S. aureus* essentiell ist [131]. Eine konditionelle Repression von *femX* führt zur Akkumulation von unvollständigen Muropeptiden ohne Interpeptidbrücke [132]. Eine Deletion von *femA* oder *femB* führt zur Akkumulation von Muropeptiden mit Monoglycin- oder Triglycin-Interpeptidbrücken [133, 134]. Die unvollständigen Interpeptidbrücken der *femXAB*-Mutanten verringern den Quervernetzungsgrad des PGNs [132, 135]. Entgegen dieser *femXAB*-Studien hatte die Deletion von *stk* oder *stp* keinen Einfluss auf die Quervernetzung im PGN. Nach der Amidierung des *D*-Glu an der zweiten Stelle des Stammpeptids zu *D*-Gln durch die Enzyme MurT und GatD [136, 137] wird das Pentaglycin-Lipid II von der inneren zur äußeren Seite der Zellmembran transportiert. Dort wird das extrazelluläre Pentaglycin-Lipid II anschließend durch Transglycosylierung und Transpeptidation mittels Penicillin-Bindeproteinen in die wachsenden PGN-Stränge eingebaut.

Mit Ausnahme der stationären *stp*-Mutante glichen sich die Muropeptidprofile der verschiedenen Stämme in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase. Die Muropeptidprofile wiesen Muropeptid-Monomere, -Dimere, -Trimere und -Oligomere auf, wobei die Monomere über Pentaglycin-Interpeptidbrücken miteinander verbunden waren. Im PGN der *stp*-Mutante akkumulierten in der stationären Wachstumsphase Muropeptide mit unvollständigen Interpeptidbrücken. Insbesondere Muropeptide ohne Interpeptidbrücken, mit Monoglycin- oder Monoalanin-Interpeptidbrücken waren gegenüber den anderen Stämmen deutlich angereichert. Die Akkumulation der unvollständigen Muropeptide in der stationären *stp*-Mutante verursachte vermutlich die Verdickung der Zellwand. Ein vergleichbarer Muropeptid-Phänotyp wurde von Monteiro bei einem *S. aureus femX*-Überexpressionsstamm beobachtet [138]. In der Arbeit wurde FemX C-terminal (GFP-FemX) und N-terminal (FemX-GFP) an das grünfluoreszierende Protein (GFP) fusioniert und anschließend mit einem konstitutiven Promoter anstelle des *femX*-Gens in das Genom von *S. aureus* integriert. Die Expression des GFP-FemX-Fusionsproteins in *S. aureus* weist das typische Muropeptidprofil des Wildtyps auf. Hingegen führt die Expression des FemX-GFP-Fusionsproteins ähnlich wie in der *stp*-Mutante zur Akkumulation unvollständiger Muropeptide. Der Autor vermuteten, dass das FemX-GFP-Fusionsprotein eine verminderte katalytische Aktivität besitzt, da der entsprechende Expressionsstamm erstens empfindlicher gegenüber zellwandaktiven Antibiotika ist, zweitens ein verlangsamtes Wachstum hat und drittens unvollständigen Muropeptide aufweist [138]. Daher ist vermutlich eine veränderte Aktivität von FemX in der *stp*-Mutante ebenfalls für diesen Muropeptid-Zellwandphänotyp verantwortlich. Da die unvollständigen Muropeptide der *stp*-Mutante auch Monoglycin- und Monoalanin-Interpeptidbrücken aufwiesen, ist es denkbar, dass die Aktivität sowohl von FemX als auch FemA mittels reversibler Phosphorylierung durch Stk und Stp reguliert wird.

5.2.3 Die *stp*-Mutante ist resistenter gegenüber Lysostaphin

Im Hinblick auf die Verdickung der Zellwand und den veränderten Muropeptid-Phänotyp der *stp*-Mutante wurde die Stabilität der Zellwand mithilfe von Lysostaphin untersucht. Lysostaphin ist eine Endopeptidase, welche die Interpeptidbrücke von *S. aureus* zwischen dem dritten und vierten Glycin spaltet und folglich eine Lyse von *S. aureus* bewirkt [139]. Aufgrund der verkürzten und unvollständigen Interpeptidbrücken der Muropeptide war die *stp*-Mutante im Vergleich zu den anderen Stämmen weniger empfindlich gegenüber Lysostaphin. Die verminderte Empfindlichkeit der *stp*-Mutante gegenüber Lysostaphin wurde auch im Stamm *S. aureus* N315 beobachtet. Die N315 *stp*-Komplemente sowie die N315 *stk*-Mutante zeigten hingegen die gleiche Lysostaphin-Empfindlichkeit wie der Wildtyp [51]. Die stationäre NewmanHG *stp*-Mutante war im Vergleich zur logarithmischen Wachstumsphase aufgrund der veränderten Interpeptidbrücke etwas resistenter gegenüber Lysostaphin. Jedoch kann man einschränkend festhalten, dass nicht ausschließlich das Muropeptidprofil der *stp*-Mutante für die Lysostaphin-Resistenz verantwortlich ist. Vermutlich schützt ebenso die verdickte Zellwand die *stp*-Mutante vor der Lyse durch Lysostaphin, da die *stp*-Mutante in der logarithmischen Phase ein unverändertes Muropeptidprofil aufwies und im Vergleich mit den anderen Stämmen dennoch resistenter gegenüber Lysostaphin war.

5.2.4 *Stk* interagiert mit FemAB und phosphoryliert FemX

Auf Grundlage der mutmaßlichen reversiblen Phosphorylierung der FemXAB-Proteine durch *Stk* und *Stp* wurde überprüft, ob *Stk* bzw. *Stp* mit den FemXAB-Proteinen interagiert und diese auch phosphoryliert bzw. dephosphoryliert. B2H-Analysen zeigten, dass *Stk* mit FemA und FemB, aber nicht mit FemX interagiert. *Stp* interagiert lediglich mit *Stk*. Wie schon in vorausgegangenen Studien dokumentiert [140], bildeten FemA und FemB jeweils Homodimere und interagierten miteinander. Dagegen interagiert FemX weder mit sich selbst noch mit *Stk*, *Stp* oder FemA/B. Möglicherweise benötigt FemX das Substrat Lipid II, um an die Zellmembran rekrutiert zu werden und dort gegebenenfalls mit *Stk* zu interagieren. Darüber hinaus ist denkbar, dass das Fusionprotein FemX-T18 fehlerhaft synthetisiert wird, oder die entsprechende Protein-Protein-Interaktionsstelle von FemX durch die T18-Untereinheit maskiert wird. Lokalisationsstudien kommen zu dem Ergebnis, dass sowohl *Stk* als auch FemXAB bevorzugt in der septalen Membran von *S. aureus* vorkommen [66, 138] und daher Interaktionen zwischen den Proteinen räumlich möglich wären. Trotz der nicht erwiesenen Interaktion phosphorylierte *Stk* *in vitro* FemX am Thr₃₂, Thr₃₆ und Ser₄₁₅. Diese FemX-Phosphorylierungsstellen wurden durch *Stp* wieder dephosphoryliert. Hingegen war *Stk* bzw. *Stp* nicht in der Lage, FemA und FemB *in vitro* zu phosphorylieren bzw. zu dephosphorylieren. Bisher sind noch keine *in vivo* Phosphorylierungsstellen von FemX/A/B in Phosphoproteom-Studien identifiziert und in Datenbanken hinterlegt worden, sodass die biologische Relevanz der *in vitro* Phosphorylierungen nicht zweifelsfrei geklärt ist.

Die Phosphorylierungen an FemX von *S. aureus* (FemX_{SA}) verursachen möglicherweise strukturelle Veränderungen, welche zu einer veränderten Aktivität des Proteins führen könnten. Um strukturelle Veränderungen am FemX_{SA} zu untersuchen, wird die hochauflösende FemX-Kristallstruktur aus *Weissella viridescens* herangezogen [141].

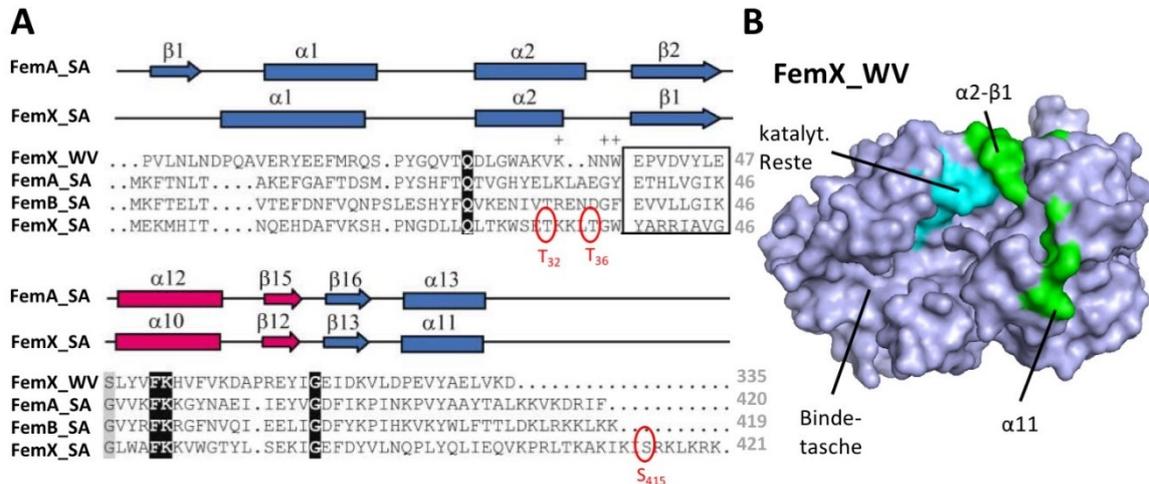


Abbildung 35: In vitro Phosphorylierungsstelle von FemX.

(A) Aminosäuresequenzen der FemX/A/B-Proteine von *S. aureus* (SA) und FemX von *W. viridescens* (WV). Gezeigt wird ein Ausschnitt der N- (oben) und C-terminalen Region (unten) von FemX/A/B basierend auf Biarrotte-Sorin *et al.* [141]. Die FemX_SA *in vitro* Phosphorylierungsstellen am Thr₃₂, Thr₃₆ und Ser₄₁₅ sind mit einem roten Kreis markiert. (B) Kristallstruktur von FemX_WV (PDB 1PN4). Die für die Bindung des Substrats wichtigen Aminosäurereste sind Cyan eingefärbt. Die *in vitro* Phosphorylierungsstellen von FemX_SA sind auf die Struktur von Fem_WV projiziert und Grün hervorgehoben.

FemX von *W. viridescens* (FemX_{WV}) ist eine L-Alanin-Transferase und besteht aus zwei äquivalenten Domänen, welche durch eine Bindetasche voneinander separiert sind. In der Tasche bindet das lösliche Substrat UDP-MurNAc-Pentapeptid und die Alanyl-tRNA, sodass nach einer Konformationsänderung die Übertragung des Alanins auf das Pentapeptid katalysiert wird. Die Kristallstrukturanalyse offenbart, dass Lys₃₆, Arg₂₁₁, Tyr₂₁₅ und Tyr₂₅₆ von FemX_{WV} wichtige Aminosäurereste für die Bindung des UDP-MurNAc-Pentapeptid sind. Das Lys₃₆ ist in der Schleife zwischen der α2-Helix und dem β1-Faltblatt lokalisiert und stabilisiert mit seiner ε-Aminogruppe die Diphosphate des UDPs vom Substrat UDP-MurNAc-Pentapeptid. Das FemX_{SA} besitzt in der α2/β1-Schleife zwei Lysine, die möglicherweise eine ähnliche Funktion ausüben. Interessanterweise werden diese Lysine von den beiden Threoninen Thr₃₂ und Thr₃₆ flankiert, welche durch *Stk in vitro* phosphoryliert wurden. Die dritte Phosphorylierungsstelle am Ser₄₁₅ liegt nahe der α11-Helix am C-Terminus von FemX_{SA} und kommt im Protein FemX_{WV} nicht vor. Die α11-Helix von FemX_{WV} ist wichtig für die Bindung des Uracil vom Substrat UDP-MurNAc-Pentapeptid, sodass das phosphorylierte Ser₄₁₅ von FemX_{SA} mutmaßlich die Bindung des Substrats beeinflusst. Möglicherweise regulieren *Stk* und *Stp* durch reversible Phosphorylierungen diese kritischen Substratbindestellen im FemX-Protein. Diese Hypothese müsste anhand von Kristallstrukturen und Bindungsstudien mit den Substraten für das Protein FemX_{SA} überprüft werden, da funktionelle und strukturelle Unterschiede zwischen beiden Protein FemX_{WV} und FemX_{SA} bestehen. So

überträgt FemX_{WV} ein Alanin mittels tRNA^{Ala} auf den löslichen Monosaccharid-Zellwandmetabolit, wohingegen FemX_{SA} ein Glycin auf das membrangebundene Lipid II überträgt. Die reversible Phosphorylierung von FemX durch Stk und Stp vermindert vermutlich die katalytische Aktivität von FemX, sodass weniger Muropeptide mit Interpeptidbrücken synthetisiert werden. Dies führt mutmaßlich zum Einbau der unvollständigen Muropeptide in die Zellwand, zur dicken Zellwand und zur verminderten Empfindlichkeit gegenüber Lysostaphin. Die Hemmung von FemX durch Stk und Stp wird nicht durch eine erhöhte Expression der *femXAB*-Transkripte und FemXAB-Proteine in der Zelle kompensiert.

5.2.5 Stk und Stp regulieren die Zellwandsynthese und Zellteilung

Anlässlich des veränderten Zellwandphänotyps der *stp*-Mutante und der Regulation der Fem-Proteine durch Stk und Stp wurde die Zellwandsynthese detailliert betrachtet. Dazu wurden die Enzyme und Metaboliten der Zellwandsynthese auf eine mögliche Regulation durch Stk und Stp untersucht. Die Metabolom-Analysen gaben einen tieferen Einblick in die Stk- und Stp-abhängige Regulation der Zellwandsyntheseenzyme. Dabei hatte erneut die *stp*-Mutante den auffälligsten Phänotyp der untersuchten *S. aureus*-Stämme. In der *stp*-Mutante akkumulierten nahezu alle Metaboliten der Zellwandsynthese (UDP-MurNAC bis UDP-MurNAC-Ala-Glu-Lys-Ala-Ala). Die Akkumulation könnte auf einen Rückstau der Metaboliten aufgrund der Stk/Stp-abhängigen Phosphorylierung und der damit einhergehenden reduzierten Aktivität der FemXAB-Proteine zurückzuführen sein. Die entsprechenden zellwandgebundenen PGN-Vorläufer wie Lipid I, Lipid II und die Lipid II-Derivate konnten aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht nachgewiesen werden, sodass die eigentlichen Substrate von FemXAB nicht quantifiziert werden konnten. Andererseits könnte die massive Akkumulation der erwähnten Metaboliten durch die reversible Phosphorylierung der Enzyme MurC, MurD und MraY verursacht sein. Die Phosphorylierung durch Stk hemmt diese Enzyme, sodass die entsprechenden Substrate sich in der Bakterienzelle anreichern. Wird beispielsweise die Ligase MurC durch Phosphorylierung gehemmt, so akkumuliert das entsprechende Substrat UDP-MurNAC in der stationären *stp*-Mutante deutlich. Die Hemmung der Synthetase MurD durch die Stk/Stp-abhängige Phosphorylierung verursachte einen starken Anstieg des Substrats UDP-MurNAC-Ala und eine verminderte Konzentration des Produktes UDP-MurNAC-Ala-Glu in der Bakterienzelle. In der *stp*-Mutante akkumulierte außerdem das Substrat UDP-MurNAC-Ala-Glu-Lys-Ala-Ala der Translokase MraY. Stk und Stp haben den stärksten Effekt auf die Aktivität von MurC, MurD und MraY, welcher durch die Zunahme und Abnahme der entsprechenden Metaboliten in den Mutanten charakterisiert wird. Hingegen wurden in der Studie von Liebeke *et al.* die Enzyme MurB, MurC und MurF als mögliche Zielproteine beschrieben [73]. Trotz der auffälligen metabolischen Veränderungen in den Mutanten interagierten Stk und Stp nicht mit den Zellwandsyntheseenzymen (GlmS/M/U, MurA-F) in B2H-Analysen. Stk interagierte lediglich mit dem membrangebundenen Protein MurG, aber nicht mit dem

Membranprotein MraY. Die Transferase MraY verankert das lösliche Park'sche Nukleotid an der inneren Zellmembran und produziert auf diese Weise das Lipid I. MurG katalysiert nachfolgend die Bindung von einem GlcNAc-Molekül an das Lipid I und synthetisiert somit das Lipid II-Molekül, welches anschließend durch die Fem-Protein modifiziert wird. *In vivo* Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen in GlmM, MurD und MraY belegen [31, 72], dass diese Enzyme in *S. aureus* durch reversible Phosphorylierung reguliert werden. Weitere Studien zeigen, dass StkP von *S. pneumoniae* und PknB von *M. tuberculosis* die Enzyme GlmM [50], GlmU [142] und MurC [143] regulieren und mit den Mur-Synthetasen MurC-F interagieren [144]. Ebenso führte die Phosphorylierung der erwähnten Zellwandsyntheseenzyme in der *stp*-Mutante zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber den Inhibitoren der Zellwandvorläufersynthese (Fosfomycin, *D*-Cycloserin und Tunicamycin). So inhibiert Fosfomycin MurA, indem das katalytisch wichtige Cystein irreversibel alkyliert wird. Das Antibiotikum *D*-Cycloserin hemmt dagegen die Alanin-Racemase Alr und *D*-Ala-*D*-Ala-Synthetase Ddl, sodass das Dipeptid *D*-Ala-*D*-Ala nicht mehr für die Synthese des Park'sche Nukleotid durch MurF zur Verfügung steht. Das Glycosidantibiotikum Tunicamycin ähnelt einem UDP-aktivierten Zucker und blockiert daher die MraY-Reaktion [145]. Dephosphorylierte Zellwandsyntheseenzyme der *stk*- und *stk/stp*-Mutanten waren im Vergleich zum Wildtyp hingegen genauso empfindlich gegenüber den aufgeführten Antibiotika. Die Antibiotikaempfindlichkeit, die Akkumulation der Metaboliten und die Phosphorylierungsstellen belegen, dass Stk und Stp die entsprechenden Zellwandsyntheseenzyme durch reversible Phosphorylierung regulieren.

Stk reguliert neben der Zellwandsynthese auch den Umbau der Zellwand, denn Stk interagiert mit den PGN-quervernetzenden Enzymen (Pbp1-3, RodA, FtsW), der Zellwandhydrolase LytH, der Transglycosylase Mgt und den Zellteilungsproteinen (DivIB, DivIC, EzcA). Interessanterweise hatten FemA und FemB ähnliche Interaktionspartner wie Stk. Studien mit anderen Bakterien zeigen ebenfalls, dass STPKs mit Penicillin-Bindeproteinen wie PBP2x [146], PBP2 [45] und PBPA [147] interagieren und diese z.T. phosphorylieren. Das Zellteilungsprotein DivIVA ist ein Zielprotein von PknB bzw. StkP in *M. tuberculosis* und *S. pneumoniae* und koordiniert die septale PGN-Synthese [39]. Das DivIVA-ähnliche Protein GpsB weist einige *in vivo* Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen in *S. aureus* auf [148, 149]. Laut Interaktom-Analyse ist GpsB trotz ausbleibender Interaktion in der B2H-Analyse ein Interaktionspartner von Stk. In *S. pneumoniae* kontrolliert GpsB die Lokalisation von StkP im Septum [149]. All diese Ergebnisse unterstützen die These, dass Stk und Stp auf verschiedenen Ebenen die Zellwandsynthese und die Zellteilung von *S. aureus* regulieren. Diese Stk- und Stp-abhängige Regulation ist nicht als An/Aus-Mechanismus, sondern eher als eine Feinabstimmung zusehen, welche eine effiziente Zellwandsynthese und Zellteilung garantiert.

5.2.6 Modell: Stk und Stp reguliert die Zellwandsynthese via FemX

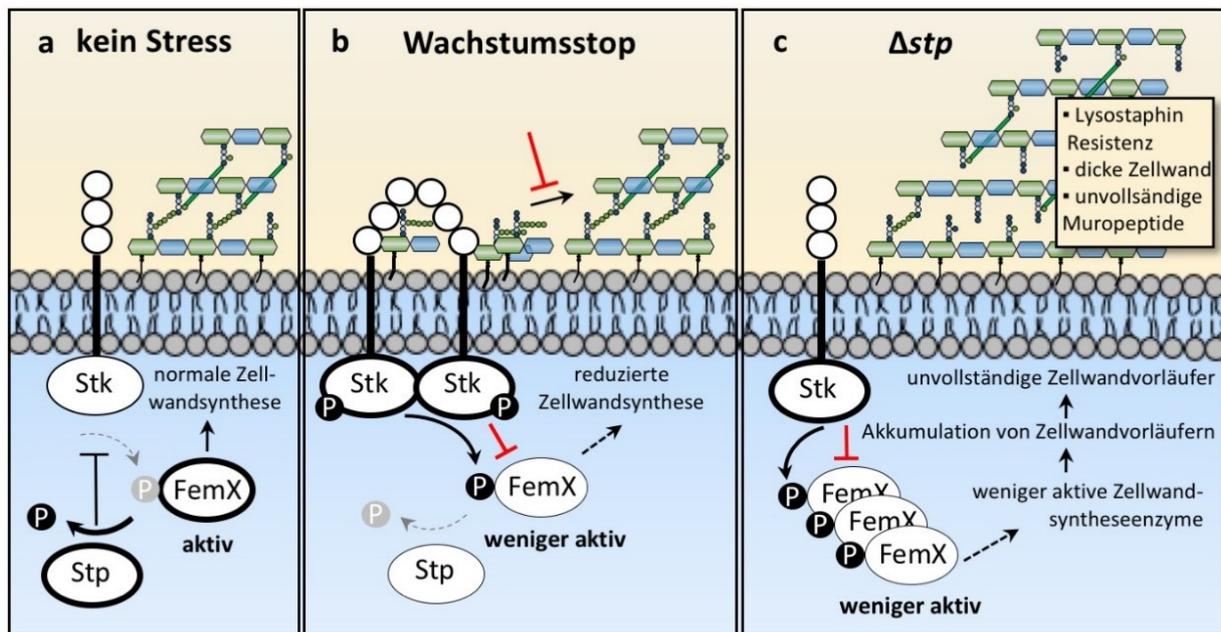


Abbildung 36: Modell der Regulation von FemX durch Stk und Stp.

(A) Während des regulären Wachstums ist die wenig phosphorylierte Kinase Stk kaum aktiv. Stp dephosphoryliert Stk, FemX und weitere Zellwandsyntheseenzyme. (B) Kommt es zu einem Wachstumsstopp der Zelle beispielsweise durch Nährstoffmangel akkumuliert Lipid II-Gly₅ an der äußeren Zellmembran. Die extrazellulären PASTA-Domänen von Stk binden das freie Lipid II-Gly₅ und aktivieren somit die Kinase. Aktives Stk phosphoryliert anschließend FemX und weitere Zellwandsyntheseenzyme, was die Zellwandsynthese vermindert. (C) Die *stp*-deletierten Zellen können nicht mehr FemX dephosphorylieren, sodass sich permanent phosphoryliertes FemX in der Zelle anreichert. Infolgedessen kommt es erstens zum Rückstau der Zellwandmetaboliten, zweitens zum Einbau unvollständiger Muropeptide in die Zellwand und drittens zur Verdickung der Zellwand, was zu verminderten Lysostaphin-Empfindlichkeit führt.

Das Modell zur Regulation von Zellwandsyntheseproteinen durch Stk und Stp basiert vorrangig auf den beobachteten Veränderungen in der *stp*-Mutante. Stellt die Bakterienzelle durch Stress das Wachstum ein, so wird Stk durch die Bindung von akkumuliertem Pentaglycin-Lipid II an die PASTA-Domänen aktiviert [66]. Die aktive Kinase Stk phosphoryliert daraufhin FemX und andere Zellwandsyntheseproteine wie beispielsweise MurD oder MraY. Die Phosphorylierung dieser Enzyme führt zu einer reduzierten Zellwandsynthese und ist somit ein physiologischer Rückkopplungsmechanismus der Zellwandsynthese. Die Phosphatase Stp dephosphoryliert anschließend diese Proteine und stellt damit das Gleichgewicht wieder her. Die *stp*-deletierten Bakterienzellen sind nicht mehr in der Lage, FemX zu dephosphorylieren, sodass permanent phosphoryliertes FemX in der Zelle akkumuliert. Das phosphorylierte und damit weniger aktive FemX synthetisiert deutlich weniger Glycin-Lipid II, sodass es erstens zum Rückstau der Zellwandmetaboliten kommt und zweitens unvollständige Muropeptide in das PGN eingebaut werden. Den verminderten Vernetzungsgrad der PGN-Stränge durch die fehlenden Interpeptidbrücken kompensiert die Bakterienzelle durch eine Verdickung der Zellwand. Die dicke Zellwand und die fehlende Interpeptidbrücke in der *stp*-Mutante führen zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Lysostaphin.

5.2.7 Stk und Stp regulieren die Zweikomponentensysteme der Zellwandsynthese

Einen großen Einfluss auf die Regulierung und Koordinierung des Zellwandmetabolismus und die Resistenz gegenüber zellwandaktiven Antibiotika üben Zwei- bzw. Dreikomponentensysteme wie VraTSR, GraRS und WalRK. Neuere Studien zeigen, dass Stk die Antwortregulatoren VraR [123], GraR [124] und WalR [125] phosphoryliert. Dies führt zur Aktivierung oder Inaktivierung des Antwortregulators, sodass Stk einen Einfluss auf die Expression des entsprechenden Regulons ausübt.

Das WalRK-Zweikomponentensystem spielt eine zentrale Rolle im Zellwandmetabolismus. Es ist weit verbreitet in *Firmicutes* und ist essentiell für das Wachstum von *S. aureus* [19]. Das pentacistrone Operon codiert das Gen *walR* für den Antwortregulator, *walk* für die Sensorkinase und die drei zusätzlichen Gene *walH*, *walI*, *walJ*. WalH und WalI sind Membranproteine, die die Aktivität von Walk negativ regulieren [150]. Die Sensorhistidinkinase Walk wird durch einen unbekanntem Mechanismus aktiviert. Die aktive Kinase unterliegt einer Autophosphorylierung und aktiviert anschließend den Antwortregulator WalR durch die Phosphorylierung des Asp₅₃ [66]. Der Antwortregulator WalR bindet anschließend an die entsprechenden Promotersequenzen und aktiviert oder reprimiert die entsprechenden Gene. Das WalR-Regulon umfasst Zellwandhydrolasen (*lytM*, *sle1*, *atl*, *fmtA/B*, *ssaA*, *isaA*, *sceD*) und Gene des Zellwandmetabolismus, der Biofilmbildung und der Antibiotikaresistenz [66, 125, 151]. Stk phosphoryliert WalR *in vitro* am Thr₁₀₁. Diese Phosphorylierungsstelle liegt nahe der Dimerisierungsstelle und beeinflusst somit die Bindung an die entsprechenden DNA-Sequenzen [66]. In *B. subtilis* phosphoryliert PrkC ebenfalls WalR *in vitro* und *in vivo* am Thr₁₀₁ und aktiviert dadurch die Gene des WalR-Regulons [152]. Die Thr-Phosphorylierung von WalR legt nahe, dass Stk/Stp mit dem Zweikomponentensystem WalRK auch *in vivo* interagiert, um so den Zellwandmetabolismus zu regulieren und zu koordinieren. In dieser Arbeit wurden durch die angewandten Methoden neue Indizien für die Interaktion der beiden Sensorsysteme sowie für die Expression des entsprechenden Regulons gesammelt. Die Untersuchungsergebnisse sowie eine weitere Studie in *S. pneumoniae* [153] zeigten, dass Stk mit der Sensorkinase Walk und WalH interagiert. Die gemeinsame septale Lage der drei Membranproteine erhärtet den Verdacht der Interaktion [150]. Eine direkte Phosphorylierung von Walk bzw. WalH durch Stk wurde bisher noch nicht beschrieben. Trotz der *in vitro* Phosphorylierung am Thr₁₀₁ [66] interagierten der Antwortregulator WalR und Stk in B2H-Analysen nicht miteinander. Möglicherweise benötigen beide Proteine Walk und die zusätzlichen Proteine WalHIJ, um miteinander interagieren zu können. Konstitutiv aktives WalR, welches durch phospho-mimetrischen Aminosäureaustausch von Asp₅₅ zu Glu₅₅ generiert wird, führt zur gesteigerten Expression von Zellwandmetabolismus-Genen (*lytM*, *sle1*, *atlA*, *ssaA*, *fmtA/B*), Regulatorgenen (*walR*, *saeSRQP*) und Virulenzgenen [151]. Unter der hypothetischen Annahme, WalR wäre auch in der *stp*-Mutanten am T₁₀₁ phosphoryliert, würde man den gleichen Effekt auf das WalR-Regulon vermuten. Die

Transkriptom- und Proteom-Analysen *stp*-Mutanten zeichnen jedoch ein nicht so klares Bild. Denn einerseits wurden die Transkripte *sceD*, *fmtB* sowie die Proteine SceD und LytH vermehrt exprimiert, aber andererseits wurden *sle1*, *fmtA* sowie Sle1 in der *stp*-Mutanten vermindert exprimiert. Die Expression weiterer Proteine des WalR-Regulons war unverändert. Erwartungsgemäß wurden viele Proteine des Zellwandmetabolismus (IsaA, Atl, SceD, Sle1 und verschiedene SsaA-Homologe [NWMN_0634/_2199/_2203]) in der *stp*-Mutante vermehrt sekretiert. Mit Ausnahme von IsaA wurden diese Proteine folgerichtig in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante vermindert sekretiert. Stk interagiert außerdem mit Atl, Sle1 und LytH, aber nicht mit dem SsaA-Homolog (NWMN_2466). Die verstärkte Expression und Sekretion sowie die Interaktion der Proteine des Zellwandmetabolismus in der *stp*-Mutanten lassen den Schluss zu, dass Stk neben WalR möglicherweise auch WalK und WalHIJ phosphoryliert und folglich gemeinsam mit WalRK den Zellwandmetabolismus reguliert. Diese synergistische Regulation des Zellwandmetabolismus durch Stk/Stp und WalRK ist ebenfalls im Modellorganismus *B. subtilis* beobachtet worden. Dennoch gibt es durch teilweise widersprüchliche Expressions- und Interaktionsprofile dieser Proteine den Verdacht, dass beide Sensorsysteme sowohl synergistisch als auch autark den Zellwandmetabolismus regulieren.

Das Vancomycin-Resistenz-assoziierte Sensorsystem VraTSR ist ein Dreikomponentensystem, welches durch zellwandaktive Antibiotika aktiviert wird [123]. Es reguliert in *S. aureus* neben Zellwandstress auch Agr-abhängige Virulenzfaktoren [154]. Das VraTSR-Operon codiert die Sensorkinase *vraS*, den Antwortregulator *vraR* und die Gene *vraT* und *vraU*, denen eine regulatorische Rolle zugeschrieben wird. Stk phosphoryliert den Antwortregulator VraR an den Threoninen Thr₁₀₆, Thr₁₁₉, Thr₁₇₅ und T₁₇₈. Die Phosphorylierungen an VraR reduzieren die DNA-Bindeeigenschaft, sodass Stk ein negativer Regulator von VraTSR ist [91]. Dies belegen auch Transkriptionsstudien von *S. aureus* 8325 Δ *stk*, denn die Gene *vraSR*, *pbp2*, *murZ* und *sgtB* des VraR-Regulons sind in der 8325 *stk*-Mutante vermindert exprimiert [63]. Hingegen war die Expression dieser Gene in der *S. aureus* NewmanHG *stk*- und *stk/stp*-Mutante unverändert. Jedoch war die Transkriptmenge der Gene *vraTSR*, *fmtA*, *sgtB* in der *stp*-Mutante erwartungsgemäß erhöht. Interessanterweise war das Gen *vraX* des *vraR*-Regulons in allen Mutanten, dass am stärksten exprimierte Gen der Transkriptomstudie. *vraX* codiert ein kleines Protein, welches mutmaßlich sekretiert wird. Es ist Teil des Zellwandstress-Stimulons, welches die Resistenz gegenüber Glycopeptid-Antibiotika vermittelt [155]. Die genaue Funktion von VraX ist nicht bekannt. Trotz der unveränderten Genexpression des *vraR*-Regulons ist die Menge der Proteine VraTSR, FmtA, SgtB in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante leicht erhöht. Die verstärkte Expression einiger *vraR*-Regulogene in der *stp*-Mutante spiegelte sich folgerichtig auch in der gesteigerten Proteinmenge von VraTS und VraF wieder. Die beobachtete Interaktion von Stk und der Glycosyltransferase Mgt (bzw. auch als SgtB bezeichnet) sowie die verstärkte Expression der Gene und Proteine des *vraR*-Regulons in der *stp*-Mutante sprechen für eine reversible VraR-Phosphorylierung durch Stk/Stp *in vivo*.

Das GraRS-Zweikomponentensystem vermittelt eine Resistenz gegenüber kationisch-antimikrobiellen Peptide und ist folglich in der Stressantwort, Virulenz und im Zellwandsignalsystem involviert. Das System wird durch oxidativen Stress, sauren pH-Wert und hohe Temperaturen aktiviert [124]. Außerdem ist GraRS wichtig für das Überleben von *S. aureus* im Phagolysosomen von Makrophagen. Die Sensor kinase GraS wird durch den geringen pH-Wert im Phagolysosom aktiviert. Die aktive Sensor kinase aktiviert anschließend GraR, welches die Expression der Gene *mprF*, *dltABCD* und *vraFG* induziert [124]. Stk interagiert synergistisch mit dem GraRS-Zweikomponentensystem, indem Stk den Antwortregulator GraR am Thr₁₂₈ und Thr₁₃₀ phosphoryliert. Dies induziert das *dltABCD*-Operon, welches die Ladung der Zellwandteichonsäuren durch den Einbau von Alaninen modifiziert [90]. Einen wesentlichen Anteil an der Resistenz gegenüber kationisch-antimikrobiellen Peptiden hat der Stk-Interaktionspartner MprF (FmtC). MprF produziert das positiv geladene Lysylphosphatidylglycerol, indem es ein Lysin an das membrangebundene Phosphatidylglycerol transferiert, und infolgedessen die positive Oberflächenladung an der Membran die kationisch-antimikrobiellen Peptide abstößt. Die Expression des *dlt*-Operons war in der *stk*-Mutante erwartungsgemäß unverändert. Dagegen war das Expressionsprofil der Doppelmutante widersprüchlich. Einerseits waren die Gene *mprF* und *dltXAB* vermindert exprimiert, andererseits war *dltC* stärker exprimiert. Diese widersprüchliche *dltC*-Expression der Doppelmutante spiegelte sich auch in der leicht erhöhten DltC-Proteinmenge wieder. Möglicherweise besitzt das *dltC*-Gen einen zusätzlichen Promotor und wird daher im Gegensatz zu den anderen Genen im *dlt*-Operon in allen Mutanten stärker induziert als im Wildtyp. Das Gen codiert für ein putatives *D*-Alanin-Transportprotein, welches mutmaßlich neben der Modifikation der Zellwandladung noch weitere Funktionen in der Zelle besitzt. Da Stk das GraR-Regulon positiv reguliert, war die Expression von *dltC* in der *stp*-Mutante erwartungsgemäß leicht erhöht. Jedoch waren die Gene des Regulons *mprF*, *dltXABD* und *vraFG* unverändert. Entgegen der stärkeren Expression von *vraFG* in *S. aureus* 8325 Δ *stk* [63] exprimieren die *S. aureus* NewmanHG-Mutanten die beiden Gene auf dem Wildtyp-Niveau.

Die Auswertung dieser Ergebnisse belegt, dass Stk und Stp die Zwei- bzw. Dreikomponentensysteme GraRS, WalRK und VraTSR durch die Phosphorylierung des Antwortregulators regulieren. Die Phosphorylierung der Antwortregulatoren bewirkt eine veränderte Expression des entsprechenden Regulons. Dies deckte sich teilweise mit den Transkriptom- und Proteomdaten. Darüber hinaus interagiert Stk mit den entsprechenden Genprodukten (z.B. Atl, Sle1, Mgt) und den Regulatorproteinen der Komponentensysteme wie WalH. Allerdings liegen teilweise widersprüchliche Expression- und Interaktionsprofile dieser Proteine vor, infolgedessen beide Sensorsysteme Stk/Stp und Zweikomponentensysteme sowohl synergistisch als auch autark den Zellwandmetabolismus regulieren. An dieser Stelle empfehlen sich weitere Untersuchung der Stk/Stp-Interaktion mit den Zellwandhydrolasen und dessen Einfluss auf die Zellwandmorphologie und der Zellwandzusammen-

setzung in *S. aureus*. Außerdem könnte eine direkte Interaktion und Phosphorylierung der Sensor-kinasen und deren Regulatoren mit der entsprechenden Auswirkung auf die Zellwand näher untersucht werden.

5.3 Stk und Stp beeinflussen Virulenz in *S. aureus*

Stk und Stp sind die am besten untersuchten bakteriellen STPKs/STPPs in Bezug auf deren Rolle in der Virulenz und deren direkten Einfluss auf die Expression von Virulenzfaktoren. Die *stk*-Mutanten unterschiedlicher Stammhintergründe sind in verschiedenen Mausinfektionsmodellen virulenter als die Wildtypstämme. Hingegen verursachen die *stp*-Mutanten der unterschiedlichen Stämme weniger Entzündungen in den Organen und weniger letale Verläufe und sind folglich weniger virulent [60, 61, 64, 75, 76]. Die meisten Studien zeigen, dass Stk ein negativer und Stp ein positiver Regulator der Virulenz in *S. aureus* ist. In dieser Arbeit werden weitere Belege für die Stk- bzw. Stp-abhängige Regulation von Virulenzfaktoren präsentiert, welche sich nahtlos in das Wissen der Literatur einfügen.

In *S. aureus* regulieren zahlreiche Regulatoren wie AgrA, SarA/Z, MgrA, SigB, Rot, ArlRS und SaeRS die Expression von Toxinen, Adhäsinen, Immunmodulatoren und weitere Virulenzfaktoren. Diese Virulenzregulatoren interagieren miteinander abhängig von inneren und äußeren Einflüssen in einem hierarchischen Prinzip und wirken so synergistisch oder antagonistisch auf die Expression der Virulenzfaktoren. Die Virulenzregulatoren MgrA, SarA und SarZ werden in *S. aureus* u.a. durch Stk und Stp sowie SigB reguliert. Die reversible Phosphorylierung von konservierten Cysteinen an diesen Transkriptionsfaktoren durch Stk/Stp verhindert deren Bindung an die entsprechenden Promotoren. Infolgedessen wird die Expression weiterer Regulatoren wie *agrA* und die Expression zahlreicher Virulenzfaktoren gehemmt [76]. Darüber hinaus ist Stk ein positiver Regulator der SigB-Aktivität. SigB wird durch Hitze oder oxidativen Stress aktiviert und hemmt wiederum MgrA und SarA [64]. Interessanterweise werden durch oxidativen Stress die wichtigen Cysteinreste von MgrA sowie SarA oxidiert. Dies hemmt deren DNA-Bindeeigenschaften und führt zu einer verminderten Expression der entsprechenden Virulenzfaktoren [76]. Daraus ergibt sich, dass Stk oder oxidativer Stress SigB aktivieren und infolgedessen die Virulenzregulatoren direkt oder über die SigB-Aktivität gehemmt werden. Wie bereits erwähnt führt eine Hemmung von MgrA, SarA und SarZ zu einer verminderten Expression von Virulenzfaktoren. Sun *et al.* zeigen in ihrer Studie, dass durch die *stp*-Deletion die Cystein-Phosphorylierungen an MgrA, SarA, und SarZ akkumulieren und infolgedessen deren DNA-Bindung an Promotoren der Virulenzgene partiell reduziert ist [76]. Dementsprechend waren die Hämolyse (α -, β - und γ -Toxin), Leukozidine (LukSF) und PSMs auf der Transkript- und Proteinebene in der *S. aureus* NewmanHG *stp*-Mutante deutlich reduziert. Die verminderte Toxin-Expression der *stp*-Mutante wurde auch für andere *S. aureus*-Stämme beschrieben [61, 76, 77]. Aufgrund der verminderten Expression in der *stp*-Mutante wurden diese Toxine auch weniger in das extrazelluläre

Milieu sekretiert. Dies hatte zur Folge, dass die Hämolyse von Erythrozyten im Schafblutagar deutlich reduziert war und die Mäuse weniger Antikörper gegen diese Toxine während einer Infektion bildeten. Anhand der verminderten Expression und Sekretion der Toxine lässt sich die Attenuierung der *stp*-Mutante in den verschiedenen Infektionsmodellen erklären. Hingegen wurden Adhäsine wie *Clumping factor* ClfA/B und Fibronektin-bindende Proteine FnbA/B von der *stp*-Mutante stärker sekretiert. Die verstärkte Sekretion der Adhäsine führte in der Maus folglich zu einer verstärkten Immunantwort gegenüber Proteinen wie dem Adhärenzprotein Eap und der Thermonuklease Nuc. Außerdem trug die verminderte Transkript- und Proteinmenge des Virulenzfaktor-regulierenden *saeSRQP*-Operons ebenfalls zur verminderten Virulenz der *stp*-Mutante bei. So waren neben den Toxinen auch weitere Gene bzw. Proteine des *saeR*-Regulons [156] wie das Fibrinogen-bindende Protein Efb, Immunglobulin-bindende Protein Sbi, Superantigen-ähnliche Protein Ssl11 und die Cysteinproteinase SspB ebenfalls schwächer exprimiert. Folglich kam es neben den Poren-bildenden Toxinen auch zu einer verminderten Antikörperantwort gegenüber dem Superantigen SSL7, der Serinproteasen SplB/D und der Lipase Plc.

Die *stk*-Mutante zeigte aufgrund der ausbleibenden Phosphorylierung der Virulenzregulatoren größtenteils ein entgegengesetztes Verhalten wie die *stp*-Mutante. Die entsprechend verringerte SigB-Aktivität in der *stk*-Mutante führt zu einer verstärkten Expression der Virulenzregulatoren AgrA und SarA sowie der Hämolytine in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen [63, 64]. Die *S. aureus* NewmanHG *stk*- und *stk/stp*-Mutanten wiesen eine gesteigerte Proteinmenge der Hämolytine (Hla und Hlg), von Psm α 1 und der Adhäsine (Efb und ClfB) auf. Trotz der gesteigerten Proteinmenge werden diese Proteine mit Ausnahme von ClfB weniger sekretiert als vom Wildtyp. Darüber hinaus werden auch die Adhärenzfaktoren ClfA/B, Efb, FnbA/B und die Antikörper-bindenden Proteine Spa und Sbi in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante weniger sekretiert. Möglicherweise wirkt sich die Deletion von *stk* auf das Sec-Transportsystem oder die entsprechenden Signalpeptidasen aus, sodass die Sekretion dieser Proteine gehemmt war. Die verminderte Sekretion der Toxine hatte keinen Einfluss auf die Hämolyse-Fähigkeit der *stk*- und *stk/stp*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch führte die verminderte Toxin-Sekretion der *stk*- und *stk/stp*-Mutanten erwartungsgemäß zu einer schwächeren Antikörperantwort gegenüber diesen Toxinen im Vergleich zum Wildtyp. Entgegen der vermehrten Proteinmenge wurden die Toxine (*hla*, *lukS*), aber auch die Serineproteasen (*sspA/B*) und das inhibitorische Chemotaxisprotein *chp* und die Lipase *geh* in allen Mutanten geringer exprimiert.

Der Transkriptionsfaktor SpoVG ist ein Modulator von Virulenzfaktoren und der Antibiotikaresistenz. Die Expression von *spoVG* wird u.a. auch durch SigB reguliert [157]. Neue Studien belegen, dass Stk die DNA-Bindeeigenschaften von SpoVG stimuliert und folglich die Zielgene (u.a. *capA*, *lip* und *nuc1*) stärker exprimiert werden [80]. Dieser Einfluss von Stk bzw. Stp ließ sich anhand der Transkriptom-

daten nur partiell bestätigen, denn die Thermonuklease *nuc* war entgegen der Erwartung in allen Mutanten geringer exprimiert. Zusätzlich waren die Gene der Kapselsynthese *capA-P* in der *stk*- und insbesondere in der *stk/stp*-Mutante reduziert. Eine verminderte Expression von Kapselsynthesegenen, wie für *S. aureus* 8325 Δ *stp* beschrieben [114], konnte für die NewmanHG *stp*-Mutante nicht nachgewiesen werden. Die bakterielle Kapsel ist ein wichtiger Virulenzfaktor, der die Zelle vor der Opsonisierung und der Komplementsystem-vermittelten Zellyse durch den Wirt schützt. Die Synthese der Kapsel in Staphylokokken und Streptokokken wird u.a. durch Tyrosin-Phosphorylierung der Tyrosinkinase Cap5B reguliert [158]. Möglicherweise ist Cap5B und nicht Stk/Stp für das unerwartete Expressionsprofil der Kapselsynthese verantwortlich. Der erwartete Phänotyp der publizierten SpoVG-Phosphorylierung durch Stk schlägt sich nicht in den Mutanten nieder. Offensichtlich ist SpoVG in der *stp*-Mutante nicht aktiv oder das SpoVG-Regulon wird von anderen Regulatoren beeinflusst. Neben der Kapsel trägt das Typ-7-Sekretionssystem (T7SS) zur Virulenz von *S. aureus* bei. T7SS moduliert die Immunantwort und ist in der Abszessbildung involviert. Das T7SS besteht aus vier Membranproteinen (EsaA, EssA/B/C), einem zytosolischen Regulator (EsaB) und einigen sekretierten Effektoren (EsaE/D/G und EsxA/B/C/D) [159]. Möglicherweise reguliert Stk und Stp die Aktivität des T7SS, da Stk mit den Membranproteinen EssB, EssC und EsaA interagiert. Das Effektorprotein EsxA wird durch EssC sekretiert [160]. Die Interaktion und die damit mutmaßlich einhergehende Phosphorylierung von EssC durch Stk in der *stp*-Mutante führten vermutlich zur gesteigerten Sekretion von EsxA. Bei ausbleibender Phosphorylierung von EssC in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante wurde EsxA weniger sekretiert. Außerdem wirkten sich die *stk*- und *stp*-Deletion auf die Genexpression des T7SS-Operons aus. So wurden die T7SS-Gene in den *stk*- und *stk/stp*-Mutanten weniger exprimiert. Die *stp*-Deletion bewirkte nur eine leicht verminderte Expression von *esxA* und *essA*, hatte aber sonst keinen Einfluss auf die Expression der weiteren T7SS-Gene.

Die Interaktion von Stk mit Virulenzregulatoren (AgrC, ArlS) und Transportsystemen (PmtA, EssC), die differenzielle Genexpression und Sekretion vieler Virulenzfaktoren, und die damit einhergehende differenzielle Immunantwort und Infektiosität der Mutanten belegen den maßgeblichen Einfluss von Stk und Stp auf die Virulenz von *S. aureus*. Die reversiblen Phosphorylierungen der verschiedenen Virulenzregulatoren durch Stk und Stp führen abhängig von bestimmten Wachstums- und Stressphasen zur synergistischen oder antagonistischen Regulation der Gene der entsprechenden Regulons. Denkbar ist auch eine direkte Phosphorylierung von Virulenzfaktoren durch Stk und Stp, um deren Aktivität zu regulieren. Beispielsweise ist eine *in vivo* Phosphorylierungsstelle von ClfB am Thr₅₁₃ beschrieben [31], welche möglicherweise auch durch Stk und Stp reguliert wird. Diese Arbeit liefert zahlreiche neue Aspekte, welche Auswirkung Ser/Thr-Phosphorylierung auf die Regulation der Virulenz ausübt.

5.4 Stk und Stp beeinflussen den Metabolismus in *S. aureus*

5.4.1 Die *stk*- und *stp*-Deletionen haben einen Einfluss auf die Pyrimidinsynthese

Nukleotide bestehen aus Purin- und Pyrimidinbasen, die durch eine glycosidische Bindung mit einem Pentosezucker verbunden sind. Die Nukleotide sind wichtige Bestandteile der DNA und RNA und üben darüber hinaus noch weitere Funktionen aus. So ist ATP auch ein wichtiger Energieträger für chemische Reaktionen, GTP ein regulatorisches Molekül sowie UTP und CTP Trägermoleküle von Zuckern für die Polysaccharidsynthese. Eine Studie aus dem Jahre 2009 von Donat *et al.* zeigt, dass Stk die Enzyme der Purinsynthese in *S. aureus* reguliert. Die Phosphorylierung der Adenylsuccinatsynthase PurA durch Stk vermindert die Aktivität des Enzyms [63]. Dies führt zur Hemmung der AMP-Synthese aus IMP im finalen Schritt der Purinsynthese. Die geringe PurA-Aktivität führt in der 8325 *stp*-Mutante zur Verminderung der Konzentration an AMP, ADP und ATP. Hingegen lässt die Deletion von *stk* die Konzentration dieser Metaboliten ansteigen [63, 73].

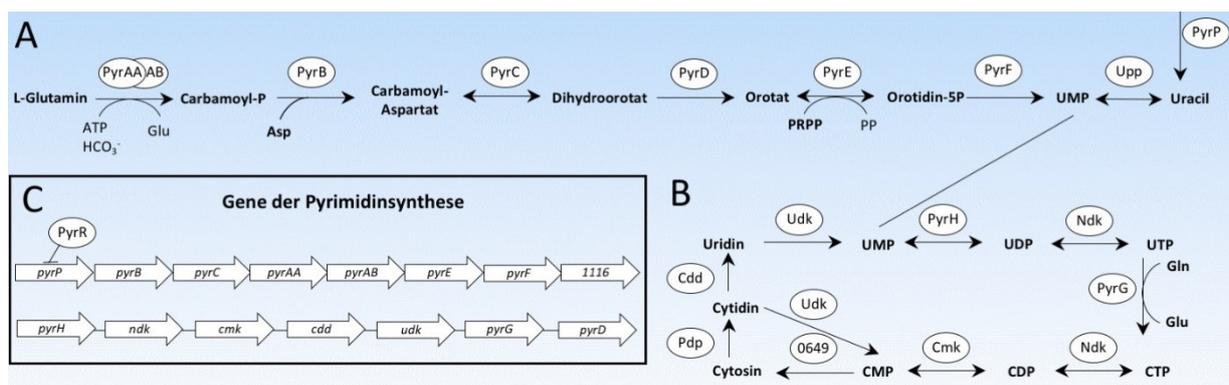


Abbildung 37: Pyrimidinsynthese in *S. aureus*.

(A) Der zentrale Metabolit der Pyrimidinsynthese ist UMP und kann einerseits *de novo* synthetisiert oder andererseits über den Membrantransporter PyrP aufgenommen werden. (B) Aus UMP werden anschließend die Pyrimidinnukleotide synthetisiert. (C) Die UMP-Synthesegene befinden sich in einem Operon, welches durch PyrR reguliert wird. Die weiteren Gene der Pyrimidinsynthese sind über das Genom verteilt.

In der *S. aureus* NewmanHG *stp*-Mutante wurden sämtliche Gene der Pyrimidinsynthese (Abbildung 37) deutlich schwächer exprimiert als im Wildtyp. Hingegen waren die Transkriptmengen der Purinsynthesegene im Vergleich zum Wildtyp entgegen der Erwartung unverändert. Unter den gewählten Bedingungen wurden nur die Pyrimidin- und nicht die Purinsynthese durch Stk und Stp beeinflusst. Möglicherweise wird in der *stp*-Mutante der Regulator der Pyrimidinsynthese PyrR durch Stk permanent phosphoryliert, sodass dies zur Hemmung der Pyrimidinsynthese führt. Unter physiologischen Bedingungen wird PyrR durch hohe Uridin-Konzentrationen aktiviert. Der aktivierte Regulator PyrR bindet an die mRNA des *pyr*-Operons, was zur Ausbildung einer Antiterminatorschleife und damit zum Abbruch der Transkription führt. Interessanterweise wurden die Konzentrationen der Nukleotidtriphosphate (ATP, GTP, CTP, UTP) in der *stp*-Mutante zugunsten der Nukleotidmono- und Diphosphate verschoben, sodass in der Mutante die energiearmen Nukleotid-

phosphate vermehrt vorkamen. Die Veränderung der Metaboliten war nicht so drastisch, wie die Transkriptomdaten es suggerieren. Ähnlich verminderte UTP- und CTP-Mengen sind ebenfalls in stationären *S. aureus* 8325 Δ *stp*-Zellen beobachtet worden [73]. Die Synthese von Zellwandteichonsäuren und PGN ist sehr energieaufwendig [161], da für die Synthese viele aktivierte Zucker-Moleküle wie UDP-GlcNAc, UDP-MurNAc und CDP-Glycerol benötigt werden. Zum Aufbau der dickeren Zellwand werden mehr aktivierte Zucker-Moleküle in der *stp*-Mutante verbraucht. Zusätzlich akkumulieren viele Vorläufermoleküle der PGN-Synthese in der *stp*-Mutante, sodass die darin gebundenen aktivierten Zucker dem Metabolismus entzogen werden. Dies führt vermutlich zur Absenkung des UTP- und CTP-Spiegels in der *stp*-Mutante. Möglicherweise führt das veränderte Verhältnis der Konzentration von UMP und UDP gegenüber UTP zusätzlich noch zur Aktivierung des PyrR-Regulators und demzufolge zur gehemmten Genexpression der Pyrimidinsynthese.

In der *stk*-Mutante waren die UMP-Synthesegene deutlich weniger exprimiert als im Wildtyp. Hingegen war das Expressionsprofil der UMP-Synthesegene in der Doppelmutante nicht so eindeutig, da nur die Gene am 5'-Ende des Operons vermindert exprimiert wurden. Die veränderten Transkriptmengen der beiden Mutanten spiegelten sich nicht in der entsprechenden Proteinabundanz wieder. Entgegen der Beobachtung in der *stp*-Mutante waren die Nukleotidtriphosphate in der *stk*- und *stk/stp*-Mutante abundanter als die Nukleotidmono- und Diphosphate. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die ausbleibende Phosphorylierung die Synthese der Nukleotide verstärkt. Einige Enzyme des Nukleotidstoffwechsels könnten möglicherweise durch reversible Phosphorylierung direkt in ihrer Aktivität reguliert werden. So weisen die Enzyme des finalen Nukleotidstoffwechsels wie die CTP-Synthase PyrG (Arg₁₀₄), Cytidineaminase Cdd (Thr₂), Nucleosiddiphosphatkinase Ndk (Arg₁₁₁) und Uracil-Phosphoribosyltransferase Upp (Thr₂₆) *in vivo* Phosphorylierungsstellen auf [31].

5.4.2 Die *stk*- und *stp*-Deletionen haben einen Einfluss auf den Cystein- und Methionin-Stoffwechsel

Die Aminosäure Cystein kommt im katalytischen Zentrum von zahlreichen Proteinen vor und ist durch die Ausbildung von Disulfidbindungen wichtig für die Faltung der Proteine. Darüber hinaus ist Cystein ein Vorläufer für Methionin, Thiamin, Biotin, Liponsäure sowie Coenzym A und M. Die Cystein-Aufnahme und -Synthese wird durch den Repressor CymR reguliert. CymR bildet einen regulatorischen Komplex mit CysK, welcher die Cysteinsynthese- und Transportergene reprimiert. Der CymR-CysK-Komplex wird durch den Cystein-Vorläufer O-Acetylserin dissoziiert und damit inaktiviert [162]. Interessanterweise waren die meisten Gene des CymR-Regulons (Abbildung 38), wie die Cysteintransporter (*tcyP*, *tcyABC*), der Methionin- und der Taurintransporter (*metNPQ* bzw. *ssuBAC*) sowie die Cysteinsynthesegene (*mccAB*, *cysM*) in der *stk*-, *stp*- und *stk/stp*-Mutanten vermindert exprimiert. Dies deutet auf eine verminderte Cysteinaufnahme und -synthese in den Mutanten hin.

Dieses unerwartete Expressionsprofil der Mutanten lässt eine geringe Konzentration von O-Acetylserin vermuten, sodass der CymR-CysK-Komplex aktiv ist und somit das CymR-Regulon reprimiert. Das O-Acetylserin wird durch die Serinacetyl-Transferase CysE aus Serin und Acetyl-CoA synthetisiert. Die Proteinmenge von CysE war in der *stp*- und *stk/stp*-Mutante vermindert, was wiederum die Vermutung der verminderten O-Acetylserin-Konzentration unterstützt. Möglicherweise wird die CysE-Enzymaktivität durch die reversible Phosphorylierung über Stk und Stp reguliert.

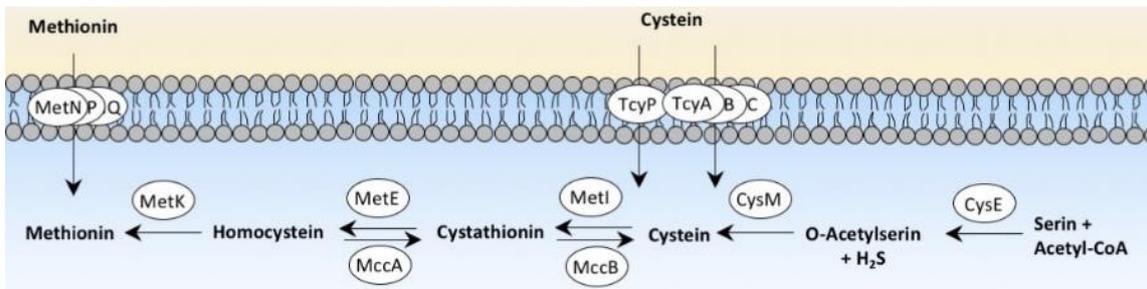


Abbildung 38: Cystein- und Methioninsynthese in *S. aureus*.

Die Cystathionin-β-Synthase MccA und die Cystathionin-γ-Lyase MccB synthetisieren aus Homocystein über Cystathionin die Aminosäure Cystein. Als Bestandteil des CymR-Regulons waren diese Cysteinsynthesegene in den Mutanten geringer exprimiert als im Wildtyp. Der entgegengesetzte Syntheseweg stellt über MetI, MetC und MetE aus Cystein Methionin her. Interessanterweise waren in der *stp*- und *stk/stp*-Mutante die Gene und die entsprechenden Proteine der Methioninsynthese *metI* und *metC* sowie mit Einschränkungen auch *metE* stärker exprimiert. Folglich ist in den beiden Mutanten eine verstärkte Methionin- aber eine verminderte Cysteinsynthese zu beobachten. An dieser Stelle empfiehlt sich eine Konzentrationsbestimmung der Aminosäuren Methionin und Cystein im Wildtyp und in den Mutanten.

5.4.3 Die *stk*- und *stp*-Deletionen beeinflussen die Eisenaufnahmesysteme

In *S. aureus* kommen neun Eisenaufnahmesysteme vor, die freies Eisen oder gebundenes Eisen in die Zelle aufnehmen können. Diese Systeme bestehen aus einem eisenbindenden Lipoprotein, ABC-Transporterproteine und einer energieliefernden ATPase. Der globale Eisenregulator Fur reprimiert mit Ausnahme des *mnt*-Operons alle Gene der Eisenaufnahmesysteme unter Eisen-gesättigten Bedingungen. Detaillierte Informationen über die Eisenaufnahmesysteme von *S. aureus* sind in der Übersichtsarbeit von J. Sheldon und D. Heinrichs zusammengetragen (Abbildung 39) [163].

Die *stp*-Mutante nimmt vermutlich vermehrt Eisen auf, da das *sbn*- und *sst*-Operon stärker exprimiert war als im Wildtyp. Die Sbn-Proteine synthetisieren das Siderophor Staphyloferrin B, welches extrazelluläres Eisen bindet und dieses schließlich vom SirABC-Transporter wieder aufgenommen wird. Die vermehrte Eisenaufnahme zeigte sich auch in der verstärkten Genexpression des Eisen- und Mangantransporters Sst. Interessanterweise waren die entsprechenden Lipoproteine der verschiedenen Eisen-

Doppelmutante ist vermutlich noch eine weitere Kinase oder das HssRS-Zweikomponentensystem in der Regulation des Repressors Fur beteiligt.

5.5 Fazit

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Stk und Stp entscheidende Regulatoren vieler Aspekte der Zellphysiologie von *S. aureus* sind. Die Arbeit zeigt, dass Stk und Stp als antagonistisches Paar maßgeblich das Phosphoproteom der Bakterienzelle prägen. Stk und Stp phosphorylieren bzw. dephosphorylieren ihre Substrate und verändern somit die Aktivität dieser Proteine. Dies hat zur Folge, dass auch die entsprechenden Synthesewege und der Phänotyp der Bakterienzelle beeinflusst werden. Substrate von Stk und Stp können einzelne Enzyme, globale oder spezifische Regulatoren, sowie die einzelnen Komponenten der Zweikomponentensysteme sein. In dieser Arbeit konnte FemX als Substrat von Stk und Stp identifiziert werden. Ein Rückkopplungsmechanismus zwischen der Lipid II-Synthese durch FemX und den finalen Einbau des Lipid II-Moleküls in die PGN-Stränge lässt eine Feinregulation an dieser Stelle der Zellwandsynthese durch Stk und Stp vermuten. Dieser Mechanismus erklärt den schon längere Zeit bekannten verdickten Zellwandphänotyp der *stp*-Mutante. Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit noch weiter potentielle Stk/Stp-Substrate der Zellwandsynthese und der Zellteilung identifiziert werden. Die Ergebnisse deuten auf eine zentrale Rolle von Stk und Stp in der Koordinierung der Zellwandsynthese, des Zellwandumbaus und der Zellteilung hin. Des Weiteren konnte durch die veränderte Expression und Sekretion von zahlreichen Virulenzfaktoren gezeigt werden, dass Stk und Stp die Virulenz von *S. aureus* regulieren. Darüber hinaus lassen sich aus den Daten erste Hinweise entnehmen, dass Stk und Stp eine Rolle in der Bildung von Biofilmen und in der Synthese von Zellwandteichonsäuren spielen. Stk und Stp regulieren darüber hinaus die Pyrimidinsynthese, die Eisenaufnahme sowie die Aufnahme und Synthese der Aminosäuren Methionin und Cystein. Viele Aspekte dieser Arbeit fügen sich nahtlos in das bekannte Wissen über STPKs und STPPs in *S. aureus* und anderer Bakterien ein.

6 Literaturverzeichnis

1. **Friedrich Götz, T.B., Karl-Heinz Schleifer,** *The Genera Staphylococcus and Micrococcus*, in *Prokaryotes*. 2006.
2. **Helmut Hahn, D.F., Stefan H.E. Kaufmann, Uwe Ullmann,** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 1999, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
3. **Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L.,** *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. *Lancet Infect Dis*, 2005. **5**(12): p. 751-62.
4. **Weidenmaier, C., Goerke, C., and Wolz, C.,** *Staphylococcus aureus determinants for nasal colonization*. *Trends Microbiol*, 2012. **20**(5): p. 243-50.
5. **Kayser F., B.E., Zinkernagel, R., Haller O., Deplazes P., Eckert J.,** *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. 2014: Thieme.
6. **Lowy, F.D.,** *Staphylococcus aureus infections*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(8): p. 520-32.
7. **Kirby, W.M.,** *EXTRACTION OF A HIGHLY POTENT PENICILLIN INACTIVATOR FROM PENICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCI*. *Science*, 1944. **99**(2579): p. 452-3.
8. **Eriksen, K.R.,** [*"Celbenin"-resistant staphylococci*]. *Ugeskr Laeger*, 1961. **123**: p. 384-6.
9. **Chambers, H.F. and Deleo, F.R.,** *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*. *Nat Rev Microbiol*, 2009. **7**(9): p. 629-41.
10. **Lakhundi, S. and Zhang, K.,** *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology*. *Clin Microbiol Rev*, 2018. **31**(4).
11. **Thampi, N., Showler, A., Burry, L., Bai, A.D., Steinberg, M., Ricciuto, D.R., . . . Morris, A.M.,** *Multicenter study of health care cost of patients admitted to hospital with Staphylococcus aureus bacteremia: Impact of length of stay and intensity of care*. *American Journal of Infection Control*, 2015. **43**(7): p. 739-744.
12. **Katayama, Y., Ito, T., and Hiramatsu, K.,** *A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000. **44**(6): p. 1549-1555.
13. **Maechler, F., Geffers, C., Schwab, F., Peña Diaz, L.A., Behnke, M., and Gastmeier, P.,** *Entwicklung der Resistenzsituation in Deutschland*. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 2017. **112**(3): p. 186-191.
14. **Saravolatz, L.D., Markowitz, N., Arking, L., Pohlod, D., and Fisher, E.,** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Epidemiologic observations during a community-acquired outbreak*. *Ann Intern Med*, 1982. **96**(1): p. 11-6.
15. **Saiman, L., O'keefe, M., Graham, P.L., 3rd, Wu, F., Said-Salim, B., Kreiswirth, B., . . . Della-Latta, P.,** *Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus among postpartum women*. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(10): p. 1313-9.
16. **Idelevich, E.A., Lanckohr, C., Horn, D., Wieler, L.H., Becker, K., and Köck, R.,** *Antibiotika-resistente Erreger in Deutschland*. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 2016. **59**(1): p. 113-123.
17. **Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., and Tenover, F.C.,** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility*. *J Antimicrob Chemother*, 1997. **40**(1): p. 135-6.

18. **Tenover, F.C., Biddle, J.W., and Lancaster, M.V.,** *Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in Staphylococcus aureus.* Emerg Infect Dis, 2001. **7**(2): p. 327-32.
19. **Villanueva, M., García, B., Valle, J., Rapún, B., Ruiz De Los Mozos, I., Solano, C., . . . Lasa, I.,** *Sensory deprivation in Staphylococcus aureus.* Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 523.
20. **Senn, M.M., Giachino, P., Homerova, D., Steinhuber, A., Strassner, J., Kormanec, J., . . . Bischoff, M.,** *Molecular Analysis and Organization of the σ^{B} Operon in *Staphylococcus aureus*.* Journal of Bacteriology, 2005. **187**(23): p. 8006-8019.
21. **Mijakovic, I. and Macek, B.,** *Impact of phosphoproteomics on studies of bacterial physiology.* FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(4): p. 877-92.
22. **Pereira, S.F., Goss, L., and Dworkin, J.,** *Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria.* Microbiol Mol Biol Rev, 2011. **75**(1): p. 192-212.
23. **Hanks, S.K. and Hunter, T.,** *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification.* FASEB J, 1995. **9**(8): p. 576-96.
24. **Kuo, J.F. and Greengard, P.,** *An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from Escherichia coli.* J Biol Chem, 1969. **244**(12): p. 3417-9.
25. **Garnak, M. and Reeves, H.C.,** *Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of Escherichia coli.* Science, 1979. **203**(4385): p. 1111-2.
26. **Laporte, D.C. and Koshland, D.E., Jr.,** *A protein with kinase and phosphatase activities involved in regulation of tricarboxylic acid cycle.* Nature, 1982. **300**(5891): p. 458-60.
27. **Munoz-Dorado, J., Inouye, S., and Inouye, M.,** *A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of M. xanthus, a gram-negative bacterium.* Cell, 1991. **67**(5): p. 995-1006.
28. **Stancik, I.A., Sestak, M.S., Ji, B., Axelson-Fisk, M., Franjevic, D., Jers, C., . . . Mijakovic, I.,** *Serine/Threonine Protein Kinases from Bacteria, Archaea and Eukarya Share a Common Evolutionary Origin Deeply Rooted in the Tree of Life.* J Mol Biol, 2018. **430**(1): p. 27-32.
29. **Janczarek, M., Vinardell, J.M., Lipa, P., and Karas, M.,** *Hanks-Type Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in Bacteria: Roles in Signaling and Adaptation to Various Environments.* Int J Mol Sci, 2018. **19**(10).
30. **Grangeasse, C., Nessler, S., and Mijakovic, I.,** *Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1602): p. 2640-55.
31. **Junker, S., Maabeta, S., Otto, A., Michalik, S., Morgenroth, F., Gerth, U., . . . Becher, D.,** *Spectral Library Based Analysis of Arginine Phosphorylations in Staphylococcus aureus.* Mol Cell Proteomics, 2018. **17**(2): p. 335-348.
32. **Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., . . . Barrell, B.G.,** *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence.* Nature, 1998. **393**(6685): p. 537-44.
33. **Ruggiero, A., De Simone, P., Smaldone, G., Squeglia, F., and Berisio, R.,** *Bacterial cell division regulation by Ser/Thr kinases: a structural perspective.* Curr Protein Pept Sci, 2012. **13**(8): p. 756-66.
34. **Av-Gay, Y. and Everett, M.,** *The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of Mycobacterium tuberculosis.* Trends Microbiol, 2000. **8**(5): p. 238-44.
35. **Wright, D.P. and Ulijasz, A.T.,** *Regulation of transcription by eukaryotic-like serine-threonine kinases and phosphatases in Gram-positive bacterial pathogens.* Virulence, 2014. **5**(8): p. 863-85.

36. **Chawla, Y., Upadhyay, S., Khan, S., Nagarajan, S.N., Forti, F., and Nandicoori, V.K.,** *Protein kinase B (PknB) of Mycobacterium tuberculosis is essential for growth of the pathogen in vitro as well as for survival within the host.* J Biol Chem, 2014. **289**(20): p. 13858-75.
37. **Young, T.A., Delagoutte, B., Endrizzi, J.A., Falick, A.M., and Alber, T.,** *Structure of Mycobacterium tuberculosis PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases.* Nat Struct Biol, 2003. **10**(3): p. 168-74.
38. **Barthe, P., Mukamolova, G.V., Roumestand, C., and Cohen-Gonsaud, M.,** *The structure of PknB extracellular PASTA domain from mycobacterium tuberculosis suggests a ligand-dependent kinase activation.* Structure, 2010. **18**(5): p. 606-15.
39. **Pensinger, D.A., Schaezner, A.J., and Sauer, J.D.,** *Do Shoot the Messenger: PASTA Kinases as Virulence Determinants and Antibiotic Targets.* Trends Microbiol, 2017.
40. **Shah, I.M., Laaberki, M.H., Popham, D.L., and Dworkin, J.,** *A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments.* Cell, 2008. **135**(3): p. 486-96.
41. **Manuse, S., Fleurie, A., Zucchini, L., Lesterlin, C., and Grangeasse, C.,** *Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis.* FEMS Microbiol Rev, 2016. **40**(1): p. 41-56.
42. **Labbe, B.D. and Kristich, C.J.,** *Growth- and Stress-Induced PASTA Kinase Phosphorylation in Enterococcus faecalis.* J Bacteriol, 2017. **199**(21).
43. **Pensinger, D.A., Boldon, K.M., Chen, G.Y., Vincent, W.J., Sherman, K., Xiong, M., . . . Sauer, J.D.,** *The Listeria monocytogenes PASTA Kinase PrkA and Its Substrate Yvck Are Required for Cell Wall Homeostasis, Metabolism, and Virulence.* PLoS Pathog, 2016. **12**(11): p. e1006001.
44. **Pan, J., Zha, Z., Zhang, P., Chen, R., Ye, C., and Ye, T.,** *Serine/threonine protein kinase PpkA contributes to the adaptation and virulence in Pseudomonas aeruginosa.* Microb Pathog, 2017.
45. **Ladwig, N., Franz-Wachtel, M., Hezel, F., Soufi, B., Macek, B., Wohlleben, W., and Muth, G.,** *Control of Morphological Differentiation of Streptomyces coelicolor A3(2) by Phosphorylation of MreC and PBP2.* PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0125425.
46. **Schultz, C., Niebisch, A., Schwaiger, A., Viets, U., Metzger, S., Bramkamp, M., and Bott, M.,** *Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of Corynebacterium glutamicum: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases.* Mol Microbiol, 2009. **74**(3): p. 724-41.
47. **Kennelly, P.J.,** *Protein Ser/Thr/Tyr phosphorylation in the Archaea.* J Biol Chem, 2014. **289**(14): p. 9480-7.
48. **Esser, D., Hoffmann, L., Pham, T.K., Brasen, C., Qiu, W., Wright, P.C., . . . Siebers, B.,** *Protein phosphorylation and its role in archaeal signal transduction.* FEMS Microbiol Rev, 2016. **40**(5): p. 625-47.
49. **Osaki, M., Arcondeguy, T., Bastide, A., Touriol, C., Prats, H., and Trombe, M.C.,** *The StkP/PhpP signaling couple in Streptococcus pneumoniae: cellular organization and physiological characterization.* J Bacteriol, 2009. **191**(15): p. 4943-50.
50. **Novakova, L., Saskova, L., Pallova, P., Janecek, J., Novotna, J., Ulrych, A., . . . Branny, P.,** *Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of Streptococcus pneumoniae and identification of kinase substrates.* FEBS J, 2005. **272**(5): p. 1243-54.
51. **Beltramini, A.M., Mukhopadhyay, C.D., and Pancholi, V.,** *Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a Staphylococcus aureus eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase.* Infect Immun, 2009. **77**(4): p. 1406-16.

52. **Madec, E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M., and Seror, S.,** *Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in Bacillus subtilis, implicated in developmental processes.* Mol Microbiol, 2002. **46**(2): p. 571-86.
53. **Gaidenko, T.A., Kim, T.J., and Price, C.W.,** *The PrpC serine-threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase Bacillus subtilis cells.* J Bacteriol, 2002. **184**(22): p. 6109-14.
54. **Archambaud, C., Gouin, E., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., and Dussurget, O.,** *Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of Listeria monocytogenes.* Mol Microbiol, 2005. **56**(2): p. 383-96.
55. **Passalacqua, K.D., Satola, S.W., Crispell, E.K., and Read, T.D.,** *A mutation in the PP2C phosphatase gene in a Staphylococcus aureus USA300 clinical isolate with reduced susceptibility to vancomycin and daptomycin.* Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(10): p. 5212-23.
56. **Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., . . . Mekalanos, J.J.,** *A virulence locus of Pseudomonas aeruginosa encodes a protein secretion apparatus.* Science, 2006. **312**(5779): p. 1526-30.
57. **Sajid, A., Arora, G., Singhal, A., Kalia, V.C., and Singh, Y.,** *Protein Phosphatases of Pathogenic Bacteria: Role in Physiology and Virulence.* Annu Rev Microbiol, 2015. **69**: p. 527-47.
58. **De Lencastre, H., Wu, S.W., Pinho, M.G., Ludovice, A.M., Filipe, S., Gardete, S., . . . Tomasz, A.,** *Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in Staphylococcus aureus strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin.* Microb Drug Resist, 1999. **5**(3): p. 163-75.
59. **Lomas-Lopez, R., Paracuellos, P., Riberty, M., Cozzone, A.J., and Duclos, B.,** *Several enzymes of the central metabolism are phosphorylated in Staphylococcus aureus.* FEMS Microbiol Lett, 2007. **272**(1): p. 35-42.
60. **Debarbouille, M., Dramsi, S., Dussurget, O., Nahori, M.A., Vaganay, E., Jouvion, G., . . . Duclos, B.,** *Characterization of a serine/threonine kinase involved in virulence of Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 2009. **191**(13): p. 4070-81.
61. **Burnside, K., Lembo, A., De Los Reyes, M., Iliuk, A., Binhtran, N.T., Connelly, J.E., . . . Rajagopal, L.,** *Regulation of hemolysin expression and virulence of Staphylococcus aureus by a serine/threonine kinase and phosphatase.* PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11071.
62. **Zheng, W., Cai, X., Li, S., and Li, Z.,** *Autophosphorylation Mechanism of the Ser/Thr Kinase Stk1 From Staphylococcus aureus.* Frontiers in Microbiology, 2018. **9**(758).
63. **Donat, S., Streker, K., Schirmeister, T., Raketle, S., Stehle, T., Liebeke, M., . . . Ohlsen, K.,** *Transcriptome and functional analysis of the eukaryotic-type serine/threonine kinase PknB in Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 2009. **191**(13): p. 4056-69.
64. **Tamber, S., Schwartzman, J., and Cheung, A.L.,** *Role of PknB kinase in antibiotic resistance and virulence in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300.* Infect Immun, 2010. **78**(8): p. 3637-46.
65. **Depardieu, F., Didier, J.P., Bernheim, A., Sherlock, A., Molina, H., Duclos, B., and Bikard, D.,** *A Eukaryotic-like Serine/Threonine Kinase Protects Staphylococci against Phages.* Cell Host Microbe, 2016. **20**(4): p. 471-481.
66. **Hardt, P., Engels, I., Rausch, M., Gajdiss, M., Ulm, H., Sass, P., . . . Grein, F.,** *The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of Staphylococcus aureus.* Int J Med Microbiol, 2017. **307**(1): p. 1-10.

67. **Rakette, S., Donat, S., Ohlsen, K., and Stehle, T.,** *Structural analysis of Staphylococcus aureus serine/threonine kinase PknB.* PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39136.
68. **Paracuellos, P., Ballandras, A., Robert, X., Kahn, R., Herve, M., Mengin-Lecreulx, D., . . . Gouet, P.,** *The extended conformation of the 2.9-A crystal structure of the three-PASTA domain of a Ser/Thr kinase from the human pathogen Staphylococcus aureus.* J Mol Biol, 2010. **404**(5): p. 847-58.
69. **Ruggiero, A., Squeglia, F., Marasco, D., Marchetti, R., Molinaro, A., and Berisio, R.,** *X-ray structural studies of the entire extracellular region of the serine/threonine kinase PrkC from Staphylococcus aureus.* Biochem J, 2011. **435**(1): p. 33-41.
70. **Yeats, C., Finn, R.D., and Bateman, A.,** *The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain.* Trends Biochem Sci, 2002. **27**(9): p. 438.
71. **Maestro, B., Novakova, L., Heseck, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., . . . Branny, P.,** *Recognition of peptidoglycan and beta-lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from Streptococcus pneumoniae.* FEBS Lett, 2011. **585**(2): p. 357-63.
72. **Basell, K., Otto, A., Junker, S., Zuhlke, D., Rappen, G.M., Schmidt, S., . . . Becher, D.,** *The phosphoproteome and its physiological dynamics in Staphylococcus aureus.* Int J Med Microbiol, 2013.
73. **Liebeke, M., Meyer, H., Donat, S., Ohlsen, K., and Lalk, M.,** *A metabolomic view of Staphylococcus aureus and its ser/thr kinase and phosphatase deletion mutants: involvement in cell wall biosynthesis.* Chem Biol, 2010. **17**(8): p. 820-30.
74. **Leiba, J., Hartmann, T., Cluzel, M.E., Cohen-Gonsaud, M., Delolme, F., Bischoff, M., and Molle, V.,** *A novel mode of regulation of the Staphylococcus aureus catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation.* J Biol Chem, 2012. **287**(52): p. 43607-19.
75. **Liu, Q., Fan, J., Niu, C., Wang, D., Wang, J., Wang, X., . . . Gao, Q.,** *The eukaryotic-type serine/threonine protein kinase Stk is required for biofilm formation and virulence in Staphylococcus epidermidis.* PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25380.
76. **Sun, F., Ding, Y., Ji, Q., Liang, Z., Deng, X., Wong, C.C., . . . He, C.,** *Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(38): p. 15461-6.
77. **Didier, J.P., Cozzone, A.J., and Duclos, B.,** *Phosphorylation of the virulence regulator SarA modulates its ability to bind DNA in Staphylococcus aureus.* FEMS Microbiol Lett, 2010. **306**(1): p. 30-6.
78. **Truong-Bolduc, Q.C., Ding, Y., and Hooper, D.C.,** *Posttranslational modification influences the effects of MgrA on norA expression in Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 2008. **190**(22): p. 7375-81.
79. **Truong-Bolduc, Q.C. and Hooper, D.C.,** *Phosphorylation of MgrA and its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 2010. **192**(10): p. 2525-34.
80. **Bischoff, M., Brelle, S., Minatelli, S., and Molle, V.,** *Stk1-mediated phosphorylation stimulates the DNA-binding properties of the Staphylococcus aureus SpoVG transcriptional factor.* Biochem Biophys Res Commun, 2016.
81. **Cluzel, M.E., Zanella-Cleon, I., Cozzone, A.J., Futterer, K., Duclos, B., and Molle, V.,** *The Staphylococcus aureus autoinducer-2 synthase LuxS is regulated by Ser/Thr phosphorylation.* J Bacteriol, 2010. **192**(23): p. 6295-301.

82. **Cameron, D.R., Ward, D.V., Kostoulias, X., Howden, B.P., Moellering, R.C., Jr., Eliopoulos, G.M., and Peleg, A.Y.,** *Serine/threonine phosphatase Stp1 contributes to reduced susceptibility to vancomycin and virulence in Staphylococcus aureus.* J Infect Dis, 2012. **205**(11): p. 1677-87.
83. **Chen, H., Wang, Q., Yin, Y., Li, S., Niu, D.K., and Wang, H.,** *Genotypic variations between wild-type and small colony variant of Staphylococcus aureus in prosthetic valve infectious endocarditis: a comparative genomic and transcriptomic analysis.* Int J Antimicrob Agents, 2018. **51**(4): p. 655-658.
84. **Miller, M., Donat, S., Rakette, S., Stehle, T., Kouwen, T.R., Diks, S.H., . . . Ohlsen, K.,** *Staphylococcal PknB as the first prokaryotic representative of the proline-directed kinases.* PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9057.
85. **Cheung, A. and Duclos, B.,** *Stp1 and Stk1: the Yin and Yang of vancomycin sensitivity and virulence in vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus strains.* J Infect Dis, 2012. **205**(11): p. 1625-7.
86. **Kant, S., Asthana, S., Missiakas, D., and Pancholi, V.,** *A novel STK1-targeted small-molecule as an "antibiotic resistance breaker" against multidrug-resistant Staphylococcus aureus.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 5067.
87. **Vornhagen, J., Burnside, K., Whidbey, C., Berry, J., Qin, X., and Rajagopal, L.,** *Kinase Inhibitors that Increase the Sensitivity of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus to beta-Lactam Antibiotics.* Pathogens, 2015. **4**(4): p. 708-21.
88. **Zheng, W., Liang, Y., Zhao, H., Zhang, J., and Li, Z.,** *5,5'-Methylenedisalicylic Acid (MDSA) Modulates SarA/MgrA Phosphorylation by Targeting Ser/Thr Phosphatase Stp1.* Chembiochem, 2015.
89. **Bruchhagen, C., Jarick, M., Mewis, C., Hertlein, T., Niemann, S., Ohlsen, K., . . . Ehrhardt, C.,** *Metabolic conversion of Cl-1040 turns a cellular MEK-inhibitor into an antibacterial compound.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 9114.
90. **Fridman, M., Williams, G.D., Muzamal, U., Hunter, H., Siu, K.W., and Golemi-Kotra, D.,** *Two Unique Phosphorylation-Driven Signaling Pathways Crosstalk in Staphylococcus aureus to Modulate the Cell-Wall Charge: Stk1/Stp1 Meets GraSR.* Biochemistry, 2013. **52**(45): p. 7975-86.
91. **Canova, M.J., Baronian, G., Brelle, S., Cohen-Gonsaud, M., Bischoff, M., and Molle, V.,** *A novel mode of regulation of the Staphylococcus aureus Vancomycin-resistance-associated response regulator VraR mediated by Stk1 protein phosphorylation.* Biochem Biophys Res Commun, 2014.
92. **Schleifer, K.H. and Kandler, O.,** *Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications.* Bacteriol Rev, 1972. **36**(4): p. 407-77.
93. **Kim, S.J., Chang, J., and Singh, M.,** *Peptidoglycan architecture of Gram-positive bacteria by solid-state NMR.* Biochim Biophys Acta, 2015. **1848**(1 Pt B): p. 350-62.
94. **Jarick, M., Bertsche, U., Stahl, M., Schultz, D., Methling, K., Lalk, M., . . . Ohlsen, K.,** *The serine/threonine kinase Stk and the phosphatase Stp regulate cell wall synthesis in Staphylococcus aureus.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 13693.
95. **Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., Nishi, H., Yamada, S., Ohara, M., Mccallum, N., . . . Sugai, M.,** *The gate controlling cell wall synthesis in Staphylococcus aureus.* Mol Microbiol, 2004. **53**(4): p. 1221-31.
96. **Grumann, D., Nubel, U., and Broker, B.M.,** *Staphylococcus aureus toxins--their functions and genetics.* Infect Genet Evol, 2014. **21**: p. 583-92.

97. **Oliveira, D., Borges, A., and Simoes, M.,** *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. Toxins (Basel), 2018. **10**(6).
98. **Vandenesch, F., Lina, G., and Henry, T.,** *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 12.
99. **Paharik, A.E. and Horswill, A.R.,** *The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response.* Microbiol Spectr, 2016. **4**(2).
100. **Kobayashi, S.D., Malachowa, N., and Deleo, F.R.,** *Pathogenesis of Staphylococcus aureus abscesses.* Am J Pathol, 2015. **185**(6): p. 1518-27.
101. **Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., and Hook, M.,** *Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus.* Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(1): p. 49-62.
102. **Monk, I.R. and Foster, T.J.,** *Genetic manipulation of Staphylococci-breaking through the barrier.* Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 49.
103. **Mainiero, M., Goerke, C., Geiger, T., Gonser, C., Herbert, S., and Wolz, C.,** *Differential target gene activation by the Staphylococcus aureus two-component system saeRS.* J Bacteriol, 2010. **192**(3): p. 613-23.
104. **Fuchs, S., Mehlan, H., Bernhardt, J., Hennig, A., Michalik, S., Surmann, K., . . . Mader, U.,** *AureoWiki The repository of the Staphylococcus aureus research and annotation community.* Int J Med Microbiol, 2018. **308**(6): p. 558-568.
105. **Baby, N., Faust, A.C., Smith, T., Sheperd, L.A., Knoll, L., and Goodman, E.L.,** *Nasal Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) PCR Testing Reduces the Duration of MRSA-Targeted Therapy in Patients with Suspected MRSA Pneumonia.* Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(4).
106. **Meyer, H., Liebeke, M., and Lalk, M.,** *A protocol for the investigation of the intracellular Staphylococcus aureus metabolome.* Anal Biochem, 2010. **401**(2): p. 250-9.
107. **Selle, M., Hertlein, T., Oesterreich, B., Klemm, T., Kloppot, P., Muller, E., . . . Ohlsen, K.,** *Global antibody response to Staphylococcus aureus live-cell vaccination.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 24754.
108. **Kloppot, P., Selle, M., Kohler, C., Stentzel, S., Fuchs, S., Liebscher, V., . . . Engelmann, S.,** *Microarray-based identification of human antibodies against Staphylococcus aureus antigens.* Proteomics Clin Appl, 2015. **9**(11-12): p. 1003-11.
109. **Kühner, D., Stahl, M., Demircioglu, D.D., and Bertsche, U.,** *From cells to muropeptide structures in 24 h: Peptidoglycan mapping by UPLC-MS.* 2014.
110. **Vidal-Aroca, F., Giannattasio, M., Brunelli, E., Vezzoli, A., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., and Bertoni, G.,** *One-step high-throughput assay for quantitative detection of beta-galactosidase activity in intact gram-negative bacteria, yeast, and mammalian cells.* Biotechniques, 2006. **40**(4): p. 433-4, 436, 438 passim.
111. **Streker, K.** *Charakterisierung neuer Zielstrukturen für die Antibiotikatherapie gegen Staphylococcus aureus und Entwicklung eines konditionalen In-vivo-Expressionssystems.* 2005.
112. **Beilharz, K., Novakova, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., and Veening, J.W.,** *Control of cell division in Streptococcus pneumoniae by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(15): p. E905-13.
113. **Zhang, C., Sun, W., Tan, M., Dong, M., Liu, W., Gao, T., . . . Zhou, R.,** *The Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinase STK Regulates the Growth and Metabolism of Zoonotic Streptococcus suis.* Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 66.

114. **Donat, S.** *Molekulare und funktionelle Charakterisierung der Ser/Thr-Kinase PknB und – Phosphatase Stp von Staphylococcus aureus.* 2009. Institut für Molekulare Infektionsbiologie.
115. **Pompeo, F., Foulquier, E., Serrano, B., Grangeasse, C., and Galinier, A.,** *Phosphorylation of the cell division protein GpsB regulates PrkC kinase activity through a negative feedback loop in Bacillus subtilis.* Mol Microbiol, 2015.
116. **Zucchini, L., Mercy, C., Garcia, P.S., Cluzel, C., Gueguen-Chaignon, V., Galisson, F., . . . Grangeasse, C.,** *PASTA repeats of the protein kinase StkP interconnect cell constriction and separation of Streptococcus pneumoniae.* Nat Microbiol, 2018. **3**(2): p. 197-209.
117. **Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., Boons, G.J., and Husson, R.N.,** *The extracytoplasmic domain of the Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr kinase PknB binds specific muropeptides and is required for PknB localization.* PLoS Pathog, 2011. **7**(7): p. e1002182.
118. **Pompeo, F., Byrne, D., Mengin-Lecreux, D., and Galinier, A.,** *Dual regulation of activity and intracellular localization of the PASTA kinase PrkC during Bacillus subtilis growth.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 1660.
119. **Park, H., Teja, K., O'shea, J.J., and Siegel, R.M.,** *The Yersinia effector protein YpkA induces apoptosis independently of actin depolymerization.* J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6426-34.
120. **Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., . . . Pieters, J.,** *Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages.* Science, 2004. **304**(5678): p. 1800-4.
121. **Ulrych, A., Holecikova, N., Goldova, J., Doubravova, L., Benada, O., Kofronova, O., . . . Branny, P.,** *Characterization of pneumococcal Ser/Thr protein phosphatase phpP mutant and identification of a novel PhpP substrate, putative RNA binding protein Jag.* BMC Microbiol, 2016. **16**(1): p. 247.
122. **Yu, S.H., Vogel, J., and Forstner, K.U.,** *ANNOgesic: a Swiss army knife for the RNA-seq based annotation of bacterial/archaeal genomes.* Gigascience, 2018. **7**(9).
123. **Kuroda, M., Kuroda, H., Oshima, T., Takeuchi, F., Mori, H., and Hiramatsu, K.,** *Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in Staphylococcus aureus.* Mol Microbiol, 2003. **49**(3): p. 807-21.
124. **Falord, M., Mader, U., Hiron, A., Debarbouille, M., and Msadek, T.,** *Investigation of the Staphylococcus aureus GraSR regulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways.* PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21323.
125. **Dubrac, S., Boneca, I.G., Poupel, O., and Msadek, T.,** *New insights into the Walk/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 2007. **189**(22): p. 8257-69.
126. **Hiramatsu, K., Kayayama, Y., Matsuo, M., Aiba, Y., Saito, M., Hishinuma, T., and Iwamoto, A.,** *Vancomycin-intermediate resistance in Staphylococcus aureus.* Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2014. **2**(4): p. 213-224.
127. **Zhou, X. and Cegelski, L.,** *Nutrient-dependent structural changes in S. aureus peptidoglycan revealed by solid-state NMR spectroscopy.* Biochemistry, 2012. **51**(41): p. 8143-53.
128. **Berger-Bachi, B. and Tschierske, M.,** *Role of fem factors in methicillin resistance.* Drug Resist Updat, 1998. **1**(5): p. 325-35.
129. **Schneider, T., Senn, M.M., Berger-Bachi, B., Tossi, A., Sahl, H.G., and Wiedemann, I.,** *In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of Staphylococcus aureus.* Mol Microbiol, 2004. **53**(2): p. 675-85.

130. **Ehlert, K., Schroder, W., and Labischinski, H.,** *Specificities of FemA and FemB for different glycine residues: FemB cannot substitute for FemA in staphylococcal peptidoglycan pentaglycine side chain formation.* J Bacteriol, 1997. **179**(23): p. 7573-6.
131. **Tschierske, M., Mori, C., Rohrer, S., Ehlert, K., Shaw, K.J., and Berger-Bachi, B.,** *Identification of three additional femAB-like open reading frames in Staphylococcus aureus.* FEMS Microbiol Lett, 1999. **171**(2): p. 97-102.
132. **Rohrer, S., Ehlert, K., Tschierske, M., Labischinski, H., and Berger-Bachi, B.,** *The essential Staphylococcus aureus gene fmhB is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9351-6.
133. **De Jonge, B.L., Sidow, T., Chang, Y.S., Labischinski, H., Berger-Bachi, B., Gage, D.A., and Tomasz, A.,** *Altered muropeptide composition in Staphylococcus aureus strains with an inactivated femA locus.* J Bacteriol, 1993. **175**(9): p. 2779-82.
134. **Henze, U., Sidow, T., Wecke, J., Labischinski, H., and Berger-Bachi, B.,** *Influence of femB on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 1993. **175**(6): p. 1612-20.
135. **Sharif, S., Kim, S.J., Labischinski, H., and Schaefer, J.,** *Characterization of peptidoglycan in fem-deletion mutants of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by solid-state NMR.* Biochemistry, 2009. **48**(14): p. 3100-8.
136. **Kuhner, D., Stahl, M., Demircioglu, D.D., and Bertsche, U.,** *From cells to muropeptide structures in 24 h: peptidoglycan mapping by UPLC-MS.* Sci Rep, 2014. **4**: p. 7494.
137. **Munch, D., Roemer, T., Lee, S.H., Engeser, M., Sahl, H.G., and Schneider, T.,** *Identification and in vitro analysis of the GatD/MurT enzyme-complex catalyzing lipid II amidation in Staphylococcus aureus.* PLoS Pathog, 2012. **8**(1): p. e1002509.
138. **Monteiro, J.M.** *Localization studies of the FemXAB protein family in Staphylococcus aureus.* 2009. Faculdade De Ciencias E Tecnologia.
139. **Grundling, A., Missiakas, D.M., and Schneewind, O.,** *Staphylococcus aureus mutants with increased lysostaphin resistance.* J Bacteriol, 2006. **188**(17): p. 6286-97.
140. **Rohrer, S. and Berger-Bachi, B.,** *Application of a bacterial two-hybrid system for the analysis of protein-protein interactions between FemABX family proteins.* Microbiology-Sgm, 2003. **149**: p. 2733-2738.
141. **Biarrotte-Sorin, S., Maillard, A.P., Delettre, J., Sougakoff, W., Arthur, M., and Mayer, C.,** *Crystal structures of Weissella viridescens FemX and its complex with UDP-MurNAc-pentapeptide: insights into FemABX family substrates recognition.* Structure, 2004. **12**(2): p. 257-67.
142. **Parikh, A., Verma, S.K., Khan, S., Prakash, B., and Nandicoori, V.K.,** *PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase, modulates its acetyltransferase activity.* J Mol Biol, 2009. **386**(2): p. 451-64.
143. **Falk, S.P. and Weisblum, B.,** *Phosphorylation of the Streptococcus pneumoniae cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase.* FEMS Microbiol Lett, 2013. **340**(1): p. 19-23.
144. **Munshi, T., Gupta, A., Evangelopoulos, D., Guzman, J.D., Gibbons, S., Keep, N.H., and Bhakta, S.,** *Characterisation of ATP-dependent Mur ligases involved in the biogenesis of cell wall peptidoglycan in Mycobacterium tuberculosis.* PLoS One, 2013. **8**(3): p. e60143.
145. **Schneider, T. and Sahl, H.G.,** *An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway.* Int J Med Microbiol, 2010. **300**(2-3): p. 161-9.

146. **Morlot, C., Bayle, L., Jacq, M., Fleurie, A., Tourcier, G., Galisson, F., . . . Di Guilmi, A.M.,** *Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in Streptococcus pneumoniae R6 morphogenesis.* Mol Microbiol, 2013. **90**(1): p. 88-102.
147. **Dasgupta, A., Datta, P., Kundu, M., and Basu, J.,** *The serine/threonine kinase PknB of Mycobacterium tuberculosis phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division.* Microbiology, 2006. **152**(Pt 2): p. 493-504.
148. **Ni, H., Fan, W., Li, C., Wu, Q., Hou, H., Hu, D., . . . Pan, X.,** *Streptococcus suis DivIVA Protein Is a Substrate of Ser/Thr Kinase STK and Involved in Cell Division Regulation.* Front Cell Infect Microbiol, 2018. **8**: p. 85.
149. **Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.P., . . . Grangeasse, C.,** *Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division.* PLoS Genet, 2014. **10**(4): p. e1004275.
150. **Poupel, O., Moyat, M., Groizeleau, J., Antunes, L.C.S., Gribaldo, S., Msadek, T., and Dubrac, S.,** *Transcriptional Analysis and Subcellular Protein Localization Reveal Specific Features of the Essential WalkR System in Staphylococcus aureus.* PLOS ONE, 2016. **11**(3): p. e0151449.
151. **Delaune, A., Dubrac, S., Blanchet, C., Poupel, O., Mader, U., Hiron, A., . . . Msadek, T.,** *The WalkR system controls major staphylococcal virulence genes and is involved in triggering the host inflammatory response.* Infect Immun, 2012. **80**(10): p. 3438-53.
152. **Libby, E.A., Goss, L.A., and Dworkin, J.,** *The Eukaryotic-Like Ser/Thr Kinase PrkC Regulates the Essential WalRK Two-Component System in Bacillus subtilis.* PLoS Genet, 2015. **11**(6): p. e1005275.
153. **Stamsas, G.A., Straume, D., Salehian, Z., and Havarstein, L.S.,** *Evidence that pneumococcal Walk is regulated by StkP through protein-protein interaction.* Microbiology, 2017. **163**(3): p. 383-399.
154. **Dai, Y., Chang, W., Zhao, C., Peng, J., Xu, L., Lu, H., . . . Ma, X.,** *VraR Binding to the Promoter Region of agr Inhibits Its Function in Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus (VISA) and Heterogeneous VISA.* Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(5).
155. **Malin, J., Shetty, A.C., Daugherty, S.C., and De Leeuw, E.P.,** *Effect of a small molecule Lipid II binder on bacterial cell wall stress.* Infect Drug Resist, 2017. **10**: p. 69-73.
156. **Rogasch, K., Ruhmling, V., Pane-Farre, J., Hoper, D., Weinberg, C., Fuchs, S., . . . Engelmann, S.,** *Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different Staphylococcus aureus strains.* J Bacteriol, 2006. **188**(22): p. 7742-58.
157. **Schulthess, B., Bloes, D.A., François, P., Girard, M., Schrenzel, J., Bischoff, M., and Berger-Bächi, B.,** *The σ^{B} -Dependent *yabJ-spoVG* Operon Is Involved in the Regulation of Extracellular Nuclease, Lipase, and Protease Expression in *Staphylococcus aureus*.* Journal of Bacteriology, 2011. **193**(18): p. 4954-4962.
158. **Grangeasse, C.,** *Rewiring the Pneumococcal Cell Cycle with Serine/Threonine- and Tyrosine-kinases.* Trends Microbiol, 2016. **24**(9): p. 713-24.
159. **Mielich-Suss, B., Wagner, R.M., Mietrach, N., Hertlein, T., Marincola, G., Ohlsen, K., . . . Lopez, D.,** *Flotillin scaffold activity contributes to type VII secretion system assembly in Staphylococcus aureus.* PLoS Pathog, 2017. **13**(11): p. e1006728.
160. **Jäger, F., Kneuper, H., and Palmer, T.,** *EssC is a specificity determinant for Staphylococcus aureus type VII secretion.* Microbiology, 2018. **164**(5): p. 816-820.

161. **Mongodin, E., Finan, J., Climo, M.W., Rosato, A., Gill, S., and Archer, G.L.,** *Microarray transcription analysis of clinical Staphylococcus aureus isolates resistant to vancomycin.* J Bacteriol, 2003. **185**(15): p. 4638-43.
162. **Soutourina, O., Poupel, O., Coppee, J.Y., Danchin, A., Msadek, T., and Martin-Verstraete, I.,** *CymR, the master regulator of cysteine metabolism in Staphylococcus aureus, controls host sulphur source utilization and plays a role in biofilm formation.* Mol Microbiol, 2009. **73**(2): p. 194-211.
163. **Sheldon, J. and Heinrichs, D.,** *The iron-regulated staphylococcal lipoproteins.* Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2012. **2**(41).
164. **Steele, V.R., Bottomley, A.L., Garcia-Lara, J., Kasturiarachchi, J., and Foster, S.J.,** *Multiple essential roles for EzrA in cell division of Staphylococcus aureus.* Mol Microbiol, 2011. **80**(2): p. 542-55.

7 Anhang

7.1 Analyse der Muropeptide und deren Quervernetzung

Tabelle 14: Eigenschaften der *S. aureus*-Muropeptide analysiert mittels UPLC-MS.

Peak	Struktur	Retentionszeit im TIC [min]	M + H ⁺ ionisiert	Interpeptidbrücken		Summenformel
				Gly	Ala	
1	Penta	5,3	968,5	0		C ₃₉ H ₇₀ N ₉ O ₁₉ ⁺
2	Penta-Gly	7,8	1025,5	1		C ₄₁ H ₇₃ N ₁₀ O ₂₀ ⁺
3	Penta-Gly ₅	8,8	1253,5	5		C ₄₉ H ₈₅ N ₁₄ O ₂₄ ⁺
4	Penta-Ala	10,0	1039,5	0	1	C ₄₂ H ₇₅ N ₁₀ O ₂₀ ⁺
5	Penta-Gly ₅ -Tetra	17,7	2132,0	5		C ₈₅ H ₁₄₇ N ₂₂ O ₄₁ ⁺
6	Penta-Gly ₅ -Tetra-Gly ₅	21,1	2417,1	10		C ₉₅ H ₁₆₂ N ₂₇ O ₄₆ ⁺
7	Penta-Gly ₅ -Tetra-Ala	22,6	2203,0	5	1	C ₈₈ H ₁₅₂ N ₂₃ O ₄₂ ⁺
8	Trimer 2x Gly ₅	25,9	3295,5	10		C ₁₃₁ H ₂₂₄ N ₃₅ O ₆₃ ⁺
9	Trimer 3x Gly ₅	28,0	3580,6	15		C ₁₄₁ H ₂₃₉ N ₄₀ O ₆₈ ⁺
10	Trimer 2x Gly ₅ + Ala-Gly	30,5	3423,6	11	1	C ₁₃₆ H ₂₃₂ N ₃₇ O ₆₅ ⁺

Tabelle 15: Quervernetzungsgrad der *S. aureus*-Muropeptide.

	wt	Δ stk	Δ stp	Δ stk Δ stp
Quervernetzungsgrad [%]	73,61 +/- 0,66	72,76 +/- 0,16	72,11 +/- 0,35	72,65 +/- 0,40

7.2 Tabellen der Transkriptom-Analyse

Tabelle 16: Erhöhte Transkriptmenge in *S. aureus* NewmanHG Δ stk.

Mittels RNA-Seq identifizierte Gene, die in der *stk*-Mutante stärker exprimiert wurden als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Gene mit einer x-fachen Änderung ≥ 2 und $p_{adj} \leq 0,05$.

ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_2111	<i>alsS</i>	Acetolactate-Synthase	2,1	0,000
NWMN_2531	<i>arcC</i>	Carbamatekinase 2	2,1	0,000
NWMN_2532	<i>arcD</i>	Aminosäure-APC-Transporter	2,2	0,000
NWMN_0831	<i>argH</i>	Argininsuccinatlyase	4,5	0,000
NWMN_2529	<i>clfB</i>	Clumping factor B	2,6	0,000
NWMN_2605	<i>cspB</i>	Kälteschock-Protein B	2,1	0,000
NWMN_0761	<i>cspC</i>	Kälteschock-Protein C	2,3	0,000
NWMN_1749	<i>glnQ</i>	Aminosäure ABC Transporterprotein	2,9	0,005
NWMN_0197	<i>lrgB</i>	Antiholin Protein	2,1	0,004
NWMN_2298	<i>nasF</i>	Uroporphyrinogen III Methyltransferase	2,2	0,001
NWMN_1835	<i>rumA</i>	RNA Methyltransferase	2,2	0,000
NWMN_0542	<i>vraX</i>	Protein VraX	10,3	0,000
NWMN_0813	<i>yuiF</i>	Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter	2,1	0,000
NWMN_2456	-	Hypothetisches Protein	6,7	0,000

Anhang

Tabelle 17: Verringerte Transkriptmenge in *S. aureus* NewmanHG Δ stk.

Mittels RNA-Seq identifizierte Gene, die in der *stk*-Mutante weniger exprimiert wurden als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Gene mit einer x-fachen Änderung ≤ -2 und $p_{adj} \leq 0,05$.

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_0095	<i>capA</i>	Kapselpolysaccharid Typ 5 Biosyntheseprotein cap5A	-2,2	0,000
NWMN_0096	<i>capB</i>	Kapselpolysaccharid Typ 5 Biosyntheseprotein cap5B	-2,0	0,000
NWMN_1877	<i>chp</i>	<i>chemotaxis inhibitory protein</i>	-2,7	0,000
NWMN_1873	<i>hlb</i>	Phospholipase	-3,0	0,000
NWMN_0425	<i>mccB</i>	Cystathionin Beta-Lyase	-2,2	0,000
NWMN_0603	<i>mntA</i>	Eisen/Mangan-ABC-Transporter ATP-bindende Protein	-2,2	0,000
NWMN_0602	<i>mntB</i>	Eisen/Mangan -ABC-Transporter-Permease	-2,2	0,000
NWMN_0601	<i>mntC</i>	Eisen/Mangan -ABC-Transporter Substrat-bindende Protein	-2,4	0,000
NWMN_0760	<i>nuc</i>	Thermonuclease	-2,4	0,000
NWMN_1113	<i>pyrAA</i>	Carbamoylphosphat-Synthase	-2,0	0,008
NWMN_1114	<i>pyrAB</i>	Carbamoylphosphat-Synthase	-2,8	0,000
NWMN_1116	<i>pyrE</i>	Orotatphosphoribosyl-Transferase	-3,3	0,000
NWMN_1115	<i>pyrF</i>	Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase	-2,9	0,000
NWMN_0677	<i>saeP</i>	Hypothetisches Protein	-2,6	0,000
NWMN_2286	<i>sarZ</i>	Transkriptionsregulator	-2,1	0,000
NWMN_0115	<i>srpF</i>	Hypothetisches Protein	-3,2	0,000
NWMN_2203	<i>ssaA</i>	CHAP-Domain-Protein	-2,0	0,001
NWMN_0374	<i>tcyP</i>	L-Cystein-Transporter	-2,0	0,000
NWMN_0118	-	Sulfonat-ABC-Transporter	-2,0	0,001
NWMN_0402	-	Hypothetisches Protein	-4,5	0,000
NWMN_1708	-	Hypothetisches Protein	-2,6	0,000
NWMN_1951	-	Oxidoreduktase	-2,0	0,000
NWMN_2204	-	Hypothetisches Protein	-2,2	0,001

Tabelle 18: Erhöhte Transkriptmenge in *S. aureus* NewmanHG Δ stp.

Mittels RNA-Seq identifizierte Gene, die in der *stp*-Mutante stärker exprimiert wurden als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Gene mit einer x-fachen Änderung ≥ 2 und $p_{adj} \leq 0,05$.

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_2325	<i>bioA</i>	Adenosylmethionin-8-Amino-7-Oxononanoat Aminotransferase	2,4	0,001
NWMN_1908	<i>dnaD2</i>	Phagen Replikationsprotein	2,2	0,002
NWMN_1510	<i>dur1</i>	Allophanat-Hydrolase	2,2	0,003
NWMN_0171	<i>fadX</i>	Hypothetisches Protein	2,4	0,000
NWMN_2234	<i>fosB</i>	Metallothiol-Transferase FosB	2,2	0,012
NWMN_2578	<i>hisZ</i>	ATP Phosphoribosyltransferase	2,3	0,000
NWMN_2096	<i>lacD</i>	Tagatose-1,6-Diphosphat-Aldolase	2,1	0,001
NWMN_0406	<i>lpl7</i>	Lipoprotein	2,5	0,001
NWMN_0351	<i>metI</i>	Cystathionin Beta-Lyase	2,3	0,000
NWMN_2059	<i>mtIA</i>	Mannitol-Phosphotransferase Enzyme IIA	2,0	0,000
NWMN_0061	<i>sbnB</i>	2,3-Diaminopropionate Biosyntheseprotein	2,4	0,007
NWMN_0066	<i>sbnG</i>	Siderophorsyntheseprotein	2,1	0,000
NWMN_1999	<i>sceD</i>	Transglycosylase SceD	2,4	0,001
NWMN_0704	<i>sstC</i>	Eisen-ABC-Transporter ATP-bindendes Protein	2,8	0,000
NWMN_1282	<i>trpC</i>	Indol-3-Glycerolphosphat-Synthase	2,2	0,008

Anhang

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_0158	<i>uhpT</i>	Antiporter	2,4	0,002
NWMN_0542	<i>vraX</i>	Protein VraX	4,0	0,008
NWMN_0027	-	Dihydroneopterin-Aldolase	2,7	0,000
NWMN_0112	-	Hypothetisches Protein	2,1	0,001
NWMN_0155	-	Oxidoreduktase	2,3	0,000
NWMN_0240	-	Hypothetisches Protein	2,6	0,000
NWMN_0253	-	Hypothetisches Protein	2,2	0,001
NWMN_0269	-	Hypothetisches Protein	3,0	0,030
NWMN_0270	-	Hypothetisches Protein	2,2	0,002
NWMN_0280	-	Hypothetisches Protein	2,2	0,003
NWMN_0281	-	Hypothetisches Protein	3,1	0,007
NWMN_0284	-	Hypothetisches Protein	2,7	0,000
NWMN_0287	-	Hypothetisches Protein	2,4	0,000
NWMN_0997	-	Hypothetisches Protein	2,5	0,000
NWMN_0999	-	Hypothetisches Protein	2,6	0,005
NWMN_1008	-	Hypothetisches Protein	2,2	0,004
NWMN_1009	-	Hypothetisches Protein	3,1	0,007
NWMN_1012	-	Hypothetisches Protein	2,7	0,000
NWMN_1022	-	Hypothetisches Protein	3,0	0,000
NWMN_1026	-	Hypothetisches Protein	2,1	0,000
NWMN_1782	-	Hypothetisches Protein	2,0	0,000
NWMN_1786	-	Hypothetisches Protein	3,0	0,011
NWMN_1796	-	Hypothetisches Protein	2,8	0,000
NWMN_1799	-	Hypothetisches Protein	3,1	0,000
NWMN_1800	-	Hypothetisches Protein	2,2	0,000
NWMN_1810	-	Hypothetisches Protein	2,2	0,007
NWMN_1882	-	Phagen Holin	2,7	0,003
NWMN_1904	-	Phagen dUTP Pyrophosphatase	2,2	0,007
NWMN_1906	-	Hypothetisches Protein	2,7	0,026
NWMN_1914	-	Hypothetisches Protein	3,3	0,004
NWMN_2365	-	Hypothetisches Protein	2,1	0,002
NWMN_2412	-	ABC-Transporter ATP-bindendes Protein	2,9	0,001
NWMN_tRNA03	<i>trnaV</i>	tRNA-Val	2,2	0,002
NWMN_tRNA16	<i>trnaS</i>	tRNA-Ser	2,2	0,001
NWMN_tRNA46	<i>trnaV</i>	tRNA-Val	2,4	0,000

Tabelle 19: Verminderte Transkriptmenge in *S. aureus* NewmanHG Δ stp.

Mittels RNA-Seq identifizierte Gene, die in der *stp*-Mutante weniger exprimiert wurden als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Gene mit einer x-fachen Änderung ≤ -2 und $p_{adj} \leq 0,05$.

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_2111	<i>alsS</i>	Acetolactat-Synthase	-2,2	0,000
NWMN_1877	<i>chp</i>	Chemotaxis Inhibitorprotein	-3,9	0,000
NWMN_2049	<i>czrA</i>	Transkriptionsregulator	-2,0	0,001
NWMN_1066	<i>ecb</i>	Hypothetisches Protein	-2,3	0,000
NWMN_1069	<i>efb</i>	Fibrinogen-binding protein	-2,3	0,000
NWMN_0669	<i>fruA</i>	PTS Fruktose Transporter IIC	-2,1	0,000

Anhang

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_1831	<i>ftnA</i>	Ferritin	-2,0	0,000
NWMN_1073	<i>hla</i>	Alpha-Hämolyisin	-2,2	0,000
NWMN_1873	<i>hIb</i>	Phospholipase	-3,3	0,000
NWMN_2320	<i>hIgB</i>	Gamma-Hämolyisin Komponent B	-3,4	0,000
NWMN_2319	<i>hIgC</i>	Gamma-Hämolyisin Komponent C	-3,1	0,000
NWMN_1927	<i>lukF</i>	Gamma-Hämolyisin B	-2,3	0,000
NWMN_1928	<i>lukS</i>	Succinyl-diaminopimelat-Desuccinylase	-3,7	0,000
NWMN_1872	<i>mapW</i>	MAP Domain-Protein	-2,2	0,000
NWMN_2344	<i>opuCD</i>	Aminosäure-ABC-Transporter	-2,1	0,000
NWMN_0163	<i>pflA</i>	Pyruvatformat-Lyase-aktivierendes Enzyme	-3,0	0,000
NWMN_1352	<i>piuB</i>	Sulfitreductase Untereinheit alpha	-2,4	0,000
NWMN_0041	<i>plc</i>	1-Phosphatidylinositol-Phosphodiesterase	-2,4	0,000
NWMN_1084	<i>psm81</i>	Phenol-lösliches Modulin	-2,5	0,000
NWMN_1113	<i>pyrAA</i>	Carbamoylphosphat-Synthase	-4,7	0,000
NWMN_1114	<i>pyrAB</i>	Carbamoylphosphat-Synthase	-4,5	0,000
NWMN_1111	<i>pyrB</i>	Aspartat-carbamoyltransferase	-4,5	0,000
NWMN_1112	<i>pyrC</i>	Dihydroorotase	-4,3	0,000
NWMN_1116	<i>pyrE</i>	Orotatphosphoribosyl-Transferase	-3,0	0,000
NWMN_1115	<i>pyrF</i>	Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase	-3,6	0,000
NWMN_1110	<i>pyrP</i>	Uracil-Permease	-3,7	0,000
NWMN_1128	<i>rlmN</i>	23S rRNA Methyltransferase RlmN	-181,8	0,000
NWMN_0674	<i>saeS</i>	Zweikomponentsystem Sensorhistidinkinase	-2,1	0,000
NWMN_2317	<i>sbi</i>	Immunoglobulin-bindendes Protein	-2,4	0,000
NWMN_1070	<i>scc</i>	Hypothetisches Protein	-2,2	0,000
NWMN_1706	<i>splA</i>	Serinprotease SplA	-3,0	0,000
NWMN_0400	<i>ssl11</i>	Superantigen	-3,9	0,000
NWMN_1129	<i>stp</i>	Ser/Thr Phosphatase	-27,5	0,000
NWMN_0165	-	Hypothetisches Protein	-2,6	0,000
NWMN_0401	-	Hypothetisches Protein	-2,3	0,000
NWMN_2075	-	Hypothetisches Protein	-2,2	0,001
NWMN_2390	-	Hypothetisches Protein	-2,9	0,000

Tabelle 20: Erhöhte Transkriptmenge in *S. aureus* NewmanHG Δ stk Δ stp.

Mittels RNA-Seq identifizierte Gene, die in der *stk/stp*-Mutante stärker exprimiert wurden als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Gene mit einer x-fachen Änderung ≥ 2 und $p_{adj} \leq 0,05$.

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_2532	<i>arcD</i>	Aminosäure-ABC-Transporter	2,1	0,001
NWMN_0831	<i>argH</i>	Argininsuccinatylase	3,0	0,001
NWMN_2550	<i>asp2</i>	accessory Sec system protein Asp2	2,5	0,000
NWMN_0179	<i>bglG</i>	Transcriptionsantiterminator	2,3	0,000
NWMN_2325	<i>bioA</i>	Adenosylmethionine-8-Amino-7-Oxononanoat Aminotransferase	3,5	0,000
NWMN_0074	<i>cap8H</i>	Glycosyltransferase	2,4	0,000
NWMN_1908	<i>dnaD2</i>	Replikationsprotein DnaD	2,9	0,000
NWMN_1510	<i>dur1</i>	Allophanathydrolase	2,0	0,001
NWMN_1345	<i>ebh</i>	Hypothetisches Protein	2,5	0,000
NWMN_0169	<i>fadD</i>	Glutaryl-CoA Dehydrogenase	2,6	0,000

Anhang

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_0171	<i>fadX</i>	Hypothetisches Protein	3,8	0,000
NWMN_2450	<i>feoB</i>	Eisentransporter B	2,1	0,000
NWMN_0336	<i>fepA</i>	Lipoprotein	2,1	0,001
NWMN_0337	<i>fepB</i>	Peroxidase	2,0	0,000
NWMN_1067	<i>flr</i>	FPRL1 Inhibitorprotein	2,1	0,000
NWMN_2234	<i>fosB</i>	Metallthiol Transferase	2,8	0,000
NWMN_2501	<i>gabT</i>	4-Aminobutyrat-Aminotransferase	2,4	0,000
NWMN_0182	<i>gatC</i>	PTS Galactitol Transporter IIC	2,9	0,000
NWMN_1749	<i>glnQ</i>	Aminosäure ABC Transporterprotein	2,6	0,006
NWMN_0436	<i>gltB</i>	Glutamatsynthase	2,0	0,000
NWMN_2572	<i>hisA</i>	Isomerase	2,9	0,000
NWMN_2576	<i>hisD</i>	Histidinol-Dehydrogenase	2,9	0,000
NWMN_2578	<i>hisZ</i>	ATP Phosphoribosyl-Transferase	3,2	0,000
NWMN_2037	<i>hmrA</i>	Aminobenzoyl-Glutamatutilizationprotein B	2,5	0,000
NWMN_2232	<i>hutU</i>	Urocanathydratase	2,7	0,000
NWMN_2565	<i>icaA</i>	Poly-beta-1,6 N-Acetyl-D-Glucosamin-Synthase	3,1	0,000
NWMN_2566	<i>icaD</i>	Poly-beta-1,6 N-Acetyl-D-Glucosamin-Synthaseprotein IcaD	2,8	0,001
NWMN_1960	<i>ilvD</i>	Dihydroxysäure-Dehydratase	2,1	0,001
NWMN_1925	<i>int</i>	Integrase	2,7	0,000
NWMN_1040	<i>isdB</i>	Eisen-reguliertes Oberflächenprotein B	2,3	0,000
NWMN_1624	<i>isdH</i>	Eisen-reguliertes Oberflächenprotein H	2,8	0,000
NWMN_2096	<i>lacD</i>	Tagatose-1,6-Diphosphat Aldolase	3,6	0,000
NWMN_2095	<i>lacF</i>	Lactose spezifisches PTS Enzym IIA	2,2	0,022
NWMN_0409	<i>lpl13</i>	Hypothetisches Protein	2,6	0,000
NWMN_0408	<i>lpl5nm</i>	Hypothetisches Protein	2,5	0,000
NWMN_0406	<i>lpl7</i>	Lipoprotein	3,4	0,000
NWMN_1685	<i>menC</i>	O-Succinylbenzoesäure-Synthetase	2,1	0,000
NWMN_0350	<i>metC2</i>	Cystathionin beta-Lyase	2,7	0,000
NWMN_0348	<i>metE</i>	Homocysteine methyltransferase	2,7	0,000
NWMN_0351	<i>metI</i>	Cystathionin Gamma-Synthase	3,5	0,000
NWMN_0593	<i>mnhA</i>	Kation/H ⁺ Antiporter	2,0	0,000
NWMN_1649	<i>mrp</i>	Peptidase	2,9	0,000
NWMN_2559	<i>msrA</i>	Methioninsulfoxide-Reduktase A	2,2	0,000
NWMN_2582	<i>mtsB</i>	Häm-ABC-Transporter	2,1	0,000
NWMN_0135	<i>murQ</i>	N-acetylmuraminsäure-6-Phosphat Etherase	2,9	0,000
NWMN_2364	<i>opp-1A</i>	Nickel-ABC-Transporter	3,1	0,000
NWMN_2363	<i>opp-1B</i>	Peptide-ABC-Transporter	2,4	0,000
NWMN_0861	<i>oppA</i>	ABC-Transporter Substrate-bindendes Protein	2,3	0,001
NWMN_2346	<i>opuCB</i>	Cholin-ABC-Transporter	2,2	0,000
NWMN_1298	<i>pstA</i>	Phosphate-ABC-Transporter	2,0	0,012
NWMN_1297	<i>pstB</i>	Phosphate-ABC-Transporter	2,1	0,001
NWMN_0936	<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamidin-Synthase	2,3	0,000
NWMN_1911	<i>recT</i>	Recombinase	2,4	0,001
NWMN_0146	<i>rlp</i>	Peptid-ABC-Transporter	2,2	0,000
NWMN_2613	<i>rnpA</i>	Ribonuclease P	2,7	0,000
NWMN_0060	<i>sbnA</i>	Siderophor Biosyntheseprotein	4,7	0,000
NWMN_0061	<i>sbnB</i>	2,3-Diaminopropionat Biosyntheseprotein	4,7	0,000
NWMN_0064	<i>sbnE</i>	siderophore biosynthesis protein SbnE	3,6	0,000

Anhang

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_0066	<i>sbnG</i>	siderophore biosynthesis protein SbnG	3,6	0,000
NWMN_1909	<i>ssb</i>	DNA Bindeprotein	2,5	0,002
NWMN_0396	<i>ssl9</i>	Hypothetisches Protein	2,7	0,000
NWMN_0703	<i>sstB</i>	Eisen-ABC-Transporter	2,4	0,000
NWMN_0704	<i>sstC</i>	Eisen-ABC-Transporter ATP-bindendes Protein	3,8	0,000
NWMN_2355	<i>stbD</i>	Hypothetisches Protein	2,3	0,000
NWMN_1282	<i>trpC</i>	Indol-3-Glycerolphosphat-Synthase	2,4	0,001
NWMN_0158	<i>uhpT</i>	Antipporter	3,2	0,000
NWMN_0540	<i>vraC</i>	Protein VraC	2,9	0,000
NWMN_0542	<i>vraX</i>	Protein VraX	34,7	0,000
NWMN_0254		Pseudouridin-5-Phosphat Glycosidase	2,2	0,001
NWMN_0027	-	Dihydroneopterin Aldolase	3,6	0,000
NWMN_0034	-	Flavodoxin	2,8	0,000
NWMN_0112	-	Hypothetisches Protein	2,7	0,000
NWMN_0155	-	Oxidoreductase	4,4	0,000
NWMN_0240	-	Hypothetisches Protein	3,5	0,000
NWMN_0253	-	Carbohydratkinase	3,0	0,001
NWMN_0268	-	Antirepressor	2,9	0,001
NWMN_0269	-	Hypothetisches Protein	4,5	0,000
NWMN_0270	-	Hypothetisches Protein	3,3	0,000
NWMN_0280	-	Hypothetisches Protein	2,9	0,005
NWMN_0281	-	Hypothetisches Protein	4,1	0,000
NWMN_0284	-	Hypothetisches Protein	4,0	0,000
NWMN_0287	-	Hypothetisches Protein	4,0	0,000
NWMN_0289	-	Terminase	2,4	0,000
NWMN_0300	-	Hypothetisches Protein	2,5	0,000
NWMN_0310	-	Hypothetisches Protein	2,1	0,000
NWMN_0416	-	Hypothetisches Protein	2,5	0,000
NWMN_0419	-	Hypothetisches Protein	2,5	0,000
NWMN_0766	-	Hypothetisches Protein	2,5	0,014
NWMN_0773	-	Nitroreductase	2,3	0,000
NWMN_0997	-	Hypothetisches Protein	3,3	0,000
NWMN_0999	-	Hypothetisches Protein	3,2	0,000
NWMN_1007	-	Hypothetisches Protein	2,2	0,005
NWMN_1008	-	Hypothetisches Protein	2,9	0,000
NWMN_1009	-	Hypothetisches Protein	4,1	0,000
NWMN_1012	-	Hypothetisches Protein	4,1	0,000
NWMN_1015	-	Hypothetisches Protein	2,4	0,000
NWMN_1022	-	Hypothetisches Protein	4,2	0,000
NWMN_1026	-	Hypothetisches Protein	2,7	0,000
NWMN_1035	-	Phagen Zellwandhydrolase	2,3	0,001
NWMN_1036	-	Phagenprotein	2,0	0,001
NWMN_1253	-	Hypothetisches Protein	2,4	0,001
NWMN_1314	-	Hypothetisches Protein	2,1	0,000
NWMN_1552	-	Hypothetisches Protein	2,9	0,000
NWMN_1720	-	Hypothetisches Protein	2,2	0,000
NWMN_1745	-	Hypothetisches Protein	3,9	0,000
NWMN_1772	-	Phagenprotein	2,2	0,000

Anhang

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_1773	-	Phagen Zellwandhydrolase	2,3	0,001
NWMN_1782	-	Hypothetisches Protein	2,9	0,000
NWMN_1786	-	Hypothetisches Protein	4,2	0,000
NWMN_1793	-	Hypothetisches Protein	2,4	0,000
NWMN_1796	-	Hypothetisches Protein	4,1	0,000
NWMN_1799	-	Hypothetisches Protein	4,1	0,000
NWMN_1800	-	Hypothetisches Protein	2,9	0,000
NWMN_1801	-	Hypothetisches Protein	2,2	0,004
NWMN_1810	-	Hypothetisches Protein	3,3	0,000
NWMN_1811	-	Phagenrepressor	2,0	0,001
NWMN_1882	-	Holin	3,8	0,000
NWMN_1886	-	Hypothetisches Protein	2,4	0,000
NWMN_1890	-	Phagenprotein	2,6	0,000
NWMN_1904	-	dUTP Pyrophosphatase	3,8	0,000
NWMN_1906	-	Hypothetisches Protein	5,8	0,000
NWMN_1912	-	Hypothetisches Protein	2,6	0,003
NWMN_1914	-	Hypothetisches Protein	4,2	0,000
NWMN_1915	-	Hypothetisches Protein	2,8	0,001
NWMN_1916	-	Hypothetisches Protein	2,6	0,005
NWMN_1918	-	Oxidoreductase	2,9	0,000
NWMN_2087	-	Hypothetisches Protein	2,0	0,000
NWMN_2365	-	Hypothetisches Protein	3,7	0,000
NWMN_2368	-	Hypothetisches Protein	2,4	0,000
NWMN_2456	-	Hypothetisches Protein	3,4	0,000
NWMN_2560	-	Acetyltransferase	2,3	0,000

Tabelle 21: Verminderte Transkriptmenge in *S. aureus* NewmanHG $\Delta stk\Delta stp$.

Mittels RNA-Seq identifizierte Gene, die in der *stk/stp*-Mutante weniger exprimiert wurden als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Gene mit einer x-fachen Änderung ≤ -2 und $p_{adj} \leq 0,05$.

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_0105	cap5K	Kapselpolysaccharid Typ 5 Biosyntheseprotein	-2,3	0,000
NWMN_0095	capA	Kapselpolysaccharid Typ 5 Biosyntheseprotein 5A	-2,8	0,000
NWMN_0096	capB	Kapselpolysaccharid Typ 5 Biosyntheseprotein 5B	-2,8	0,000
NWMN_0098	capD	Kapselpolysaccharidprotein	-2,1	0,000
NWMN_0102	capH	O-Acetyltransferase	-2,1	0,000
NWMN_0668	fruB	Phosphofruktokinase	-2,1	0,003
NWMN_0425	mccB	Cystathionin beta-Lyase	-2,3	0,000
NWMN_0603	mntA	Eisen/Mangan -ABC-Transporter	-2,2	0,000
NWMN_0602	mntB	Eisen/Mangan -ABC-Transporter	-2,2	0,000
NWMN_0536	proP	Prolin/Betain-Transporter	-2,3	0,000
NWMN_1113	pyrAA	Carbamoyl-Phosphate-Synthase	-2,2	0,001
NWMN_0429	sle1	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase	-2,1	0,000
NWMN_0634	ssaA	Peptidase M23	-2,1	0,000
NWMN_2199	ssaA	CHAP Domain-Protein	-2,1	0,000
NWMN_2203	ssaA	CHAP Domain-Protein	-4,0	0,000

Anhang

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	p-Wert
NWMN_0918	<i>sspA</i>	Glutamylendopeptidase	-2,0	0,000
NWMN_0916	<i>sspC</i>	Staphostatin B	-2,1	0,000
NWMN_1129	<i>stp</i>	Ser/Thr Phosphatase	-138,0	0,000
NWMN_1398	-	Hypothetisches Protein	-2,2	0,000
NWMN_1951	-	Oxidoreductase	-2,0	0,000
NWMN_2204	-	Hypothetisches Protein	-3,3	0,000
NWMN_2243	-	Hypothetisches Protein	-2,1	0,000
NWMN_2390	-	Hypothetisches Protein	-2,9	0,000
NWMN_2408	-	Transporter	-2,0	0,001
NWMN_tRNA51	<i>trnaK</i>	tRNA-Lys	-2,0	0,000
NWMN_tRNA52	<i>trnaQ</i>	tRNA-Gln	-2,0	0,000

7.3 Tabellen der Proteom-Analyse

Tabelle 22: Erhöhte Proteinmenge in *S. aureus* NewmanHG Δ stk.

Angegeben sind Proteine, welche in der *stk*-Mutante weniger vorkommen als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Proteine mit einer x-fachen Änderung ≥ 2 und q-Wert $\leq 0,05$.

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	q-Wert
NWMN_1069	<i>Efb</i>	Fibrinogen-bindendes Protein	7,3	0,000
NWMN_0417	<i>Psmα1</i>	Phenol-lösliches Modulin α 1	4,0	0,000
NWMN_2605	<i>CspB</i>	Kälteschockprotein B	3,3	0,000
NWMN_2319	<i>HlgC</i>	γ -Hämolysin Komponente C	2,4	0,000
NWMN_2284	<i>GlitT</i>	Glutamat-Transporter	2,4	0,001
NWMN_0761	<i>CspC</i>	Kälteschockprotein C	2,3	0,000
NWMN_2320	<i>HlgB</i>	γ -Hämolysin Komponent B	2,2	0,001
NWMN_2223	-	unbekanntes Protein	2,1	0,001
NWMN_0078	<i>SasD</i>	unbekanntes Protein	2,1	0,000

Tabelle 23: Verminderte Proteinmenge in *S. aureus* NewmanHG Δ stk.

Angegeben sind Proteine, welche in der *stk*-Mutante weniger vorkommen als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Proteine mit einer x-fachen Änderung ≤ -2 und q-Wert $\leq 0,05$.

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	q-Wert
NWMN_1999	<i>SceD</i>	Transglycosylase SceD	-3,3	0,000
NWMN_0429	<i>Sle1</i>	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase	-2,7	0,000
NWMN_0249	-	Lipoprotein	-2,2	0,000
NWMN_1018	-	unbekanntes Protein	-2,2	0,001
NWMN_0585	-	unbekanntes Protein	-2,1	0,001

Anhang

Tabelle 24: Erhöhte Proteinmenge in *S. aureus* NewmanHG Δ stp.

Angegeben sind Proteine, welche in der *stp*-Mutante mehr vorkommen als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Proteine mit einer x-fachen Änderung ≥ 2 und q-Wert $\leq 0,05$.

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	q-Wert
NWMN_1999	SceD	Transglycosylase SceD	5,2	0,000
NWMN_0991	RpmF	50S ribosomales Protein L32	4,3	0,000
NWMN_0241		unbekanntes Protein	3,4	0,000
NWMN_2537	IsaB	Immunodominantes Antigen B	3,3	0,000
NWMN_0981	CtaB	Farnesyltransferase	3,2	0,000
NWMN_2284	GlitT	Glutamat-Transporter	2,9	0,000
NWMN_2515	NrdD	Ribonukleosid-Triphosphat-Reduktase	2,9	0,000
NWMN_2605	CspB	Kälteschockprotein B	2,8	0,000
NWMN_0928	QoxC	Quinoloxidase-Untereinheit III	2,8	0,001
NWMN_1207	GlpF	Glycerol uptake facilitator protein	2,8	0,000
NWMN_1655	Rot	Transkriptionsfaktor	2,5	0,000
NWMN_2587	-	unbekanntes Protein	2,4	0,000
NWMN_2051	-	unbekanntes Protein	2,3	0,001
NWMN_1305	Asd	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	2,3	0,000
NWMN_0761	CspC	Kälteschockprotein C	2,3	0,000
NWMN_2306	ZinT	Zink-bindendes Lipoprotein	2,3	0,001
NWMN_0436	GlitB	Glutamatsynthase	2,2	0,000
NWMN_0059	SirA	Siderophor-ABC-Transporter-bindendes Protein	2,2	0,000
NWMN_1094	DivIB	Zellteilungsprotein DivIB	2,2	0,006
NWMN_0843	YitW	unbekanntes Protein	2,1	0,001
NWMN_0300	-	unbekanntes Protein	2,1	0,001
NWMN_2185	FhuD	Eisen-bindendes Transporterprotein	2,1	0,001
NWMN_1816	-	Thioesterase	2,0	0,000

Tabelle 25: Verminderte Proteinmenge in *S. aureus* NewmanHG Δ stp.

Angegeben sind Proteine, welche in der *stp*-Mutante weniger vorkommen als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Proteine mit einer x-fachen Änderung ≤ -2 und q-Wert $\leq 0,05$.

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	q-Wert
NWMN_1127	Sun	16S rRNA Methyltransferase	-10,6	0,000
NWMN_2320	HlgB	γ -Hämolyysin Komponent B	-6,9	0,000
NWMN_2317	Sbi	Immunoglobulin-bindendes Protein	-5,3	0,000
NWMN_1069	Efb	Fibrinogen-bindendes Protein	-5,0	0,000
NWMN_2443	SsaA	Sekretorisches Antigen	-4,6	0,000
NWMN_1872	MapW	unbekanntes Protein	-4,4	0,000
NWMN_0603	MntA	Eisen/Mangan-Transporter	-3,7	0,000
NWMN_0831	ArgH	Argininsuccinat-Lyase	-3,6	0,001
NWMN_0094	AdhE	Aldehydalkohol-Dehydrogenase	-3,5	0,000
NWMN_0585	-	unbekanntes Protein	-3,4	0,000
NWMN_1927	LukF	Leukozidin LukF	-3,1	0,000
NWMN_2049	CzrA	Zink/Kobalt Repressor	-2,9	0,000
NWMN_0677	SaeP	unbekanntes Protein	-2,8	0,000
NWMN_1928	LukS	Leukozidin LukS	-2,7	0,000
NWMN_0050	-	unbekanntes Protein	-2,6	0,000

Anhang

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	q-Wert
NWMN_2487	-	unbekanntes Protein	-2,6	0,000
NWMN_2315	GpmA	2,3-Bisphosphoglycerat-Mutase	-2,5	0,000
NWMN_0096	CapB	Kapselpolysaccharid-Syntheseeenzyme	-2,5	0,000
NWMN_0366	-	unbekanntes Protein	-2,4	0,001
NWMN_0429	Sle1	N-acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase	-2,4	0,001
NWMN_1998	TenA	Aminopyrimidin-Aminohydrolase	-2,4	0,000
NWMN_1414	MalA	α -Amylase	-2,4	0,000
NWMN_2282	-	unbekanntes Protein	-2,3	0,001
NWMN_1848	-	unbekanntes Protein	-2,3	0,001
NWMN_0601	MntC	Eisen/Mangan-Transporter	-2,3	0,001
NWMN_1727	EcsB	Antibiotika-Transporter	-2,2	0,001
NWMN_2377	-	unbekanntes Protein	-2,1	0,001
NWMN_1847	SspB	Staphopainthiolproteinase	-2,1	0,001
NWMN_2345	OpuCC	Glycin-Betain/L-Prolin Transporter Untereinheit	-2,1	0,002
NWMN_0676	SaeQ	unbekanntes Protein	-2,1	0,002
NWMN_1529	RarA	Rekombinationsfaktor	-2,1	0,001
NWMN_2217	RpiR	Phosphorzucker-bindender Transkriptionsfaktor	-2,1	0,000
NWMN_2347	OpuCA	Glycin-Betaine/L-Prolin Transporter Untereinheit	-2,0	0,001

Tabelle 26: Erhöhte Proteinmenge in *S. aureus* NewmanHG Δ stk Δ stp.

Angegeben sind Proteine, welche in der *stk/stp*-Mutante mehr vorkommen als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Proteine mit einer x-fachen Änderung ≥ 2 und q-Wert $\leq 0,05$.

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	q-Wert
NWMN_1069	Efb	Fibrinogen-bindendes Protein	12,9	0,000
NWMN_0417	Psmα1	Phenol-lösliches Modulin α 1	5,5	0,000
NWMN_0761	CspC	Kälteschockprotein C	3,5	0,000
NWMN_0094	AdhE	Aldehydalkohol-Dehydrogenase	3,1	0,000
NWMN_2223	-	unbekanntes Protein	2,9	0,000
NWMN_2605	CspB	Kälteschockprotein B	2,8	0,000
NWMN_2319	HlgC	γ -Hämolysin Komponent C	2,5	0,000
NWMN_2284	GlhT	Glutamat-Transporter	2,3	0,000
NWMN_1847	SspB2	Staphopainthiolproteinase	2,2	0,000
NWMN_2537	IsaB	Immunodominantes Antigen B	2,2	0,000
NWMN_0238	-	unbekanntes Protein	2,2	0,006
NWMN_1552	-	unbekanntes Protein	2,2	0,000
NWMN_1270	GlcT	Transkriptionsantiterminator	2,1	0,000
NWMN_2557	-	unbekanntes Protein	2,1	0,000
NWMN_2320	HlgB	γ -Hämolysin Komponent B	2,1	0,000

Anhang

Tabelle 27: Verminderte Proteinmenge in *S. aureus* NewmanHG Δ stk Δ stp.

Angegeben sind Proteine, welche in der *stk/stp*-Mutante weniger vorkommen als im Wildtyp. Aufgeführt sind alle Proteine mit einer x-fachen Änderung ≤ -2 und q-Wert $\leq 0,05$.

NewmanHG ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung	q-Wert
NWMN_1999	SceD	Transglycosylase	-3,2	0,000
NWMN_0249	-	Lipoprotein	-3,1	0,000
NWMN_1019	-	unbekanntes Protein	-2,5	0,000
NWMN_0299	-	unbekanntes Protein	-2,5	0,000
NWMN_0977	-	unbekanntes Protein	-2,4	0,000
NWMN_2522	-	ABC-Transporter	-2,2	0,013
NWMN_0536	ProP	Prolin/Betain Transporter	-2,1	0,000

7.4 Tabelle der Interaktom-Analyse

Tabelle 28: Interaktom von Stk.

Mittels Immunpräzipitation identifizierte Interaktionspartner von Stk. Die in der Tabelle aufgeführten Werte sind mit einer x-fachen Änderung des Wildtyps gegenüber der *stk*-Mutante angegeben (q-Wert $< 0,5$ für wt/ Δ stk und wt/Beat-Kontrolle).

NewmanHG Orf	Proteinname	Proteinfunktion	x-fache Änderung wt/ Δ stk	q-Wert wt/ Δ stk
NWMN_1130	Stk	Ser/Thr Proteinkinase	84,4	0,000
NWMN_0969	-	Unbekannte Funktion	36,8	0,000
NWMN_0223	EssC	Typ-VII Sekretionsystem	13,9	0,001
NWMN_0429	Sle1	N-Acetylmuramoyl-L-Alaninamidase	8,6	0,012
NWMN_0019	WalH	WalRK Regulatorprotein	8,6	0,001
NWMN_1945	AgrC	Sensor-Histidinkinase	6,5	0,019
NWMN_0586	-	Unbekannte Funktion	6,5	0,001
NWMN_0698	-	Unbekannte Funktion	6,5	0,006
NWMN_1035	-	Phagen N-Acetylglucosamidase	6,5	0,033
NWMN_0489	-	Unbekannte Funktion	6,1	0,035
NWMN_1327	ArlS	Sensor-Histidinkinase	4,9	0,016
NWMN_0247	-	Format/Nitrit-Transporter	4,3	0,026
NWMN_1272	FmtC, MprF	Phosphatidylglycerol-Lysyltransferase	4,3	0,017
NWMN_0018	WalK	Sensor-Histidinkinase	3,7	0,005
NWMN_1356	GpsB	Zellzyklusprotein	3,7	0,014
NWMN_1271	-	Unbekannte Funktion	3,7	0,015
NWMN_0879	MgtE	Magnesium-Transporter	3,5	0,030
NWMN_1757	-	Unbekannte Funktion	3,2	0,015
NWMN_2357	-	Ferredoxin-abhängige Glutamat-Transaminase	3,2	0,016
NWMN_1869	PmtA	PSM ABC-Transporter	3,2	0,017
NWMN_0600	-	Unbekannte Funktion	3,0	0,022
NWMN_0999	-	Unbekannte Funktion	3,0	0,014
NWMN_1988	FtsW	Zellteilungsprotein	2,8	0,024
NWMN_0671	-	Unbekannte Funktion	2,8	0,010
NWMN_0715	-	Unbekannte Funktion	2,8	0,047
NWMN_2332	-	Unbekannte Funktion	2,5	0,037
NWMN_2338	-	Natrium/Hydrogen Antiporter	2,3	0,037
NWMN_1237	-	Unbekannte Funktion	2,3	0,030
NWMN_1185	FtsK	DNA Translokase	2,0	0,041
NWMN_0055	Spa	Immunoglobulin G Bindeprotein A	-4,3	0,025

7.5 Tabelle der Sekretom-Analyse

Tabelle 29: Differenziell sekretierte Proteine der Mutanten.

Die in der Tabelle aufgeführten Proteine sind mit einer x-fachen Änderung gegenüber dem Wildtyp angegeben. Statistisch signifikante Veränderungen sind mit fett gedruckte Werten hervorgehoben (t-Test, q-Wert < 0,05).

NewmanHG Orf	Protein-name	x-fache Änderung $\Delta tk/wt$	x-fache Änderung $\Delta stp/wt$	x-fache Änderung $\Delta \Delta/wt$	Beschreibung
Extrazelläre Proteasen/Lipasen					
NWMN_2569	Lip	-4,3	1,9	-9,2	Lipase
NWMN_1706	SpIA	-1,5	-7,0	-3,5	Serinprotease SplA
NWMN_1705	SpIB	-1,3	-56	-3,2	Serinprotease SpIB
NWMN_1701	SpIF	-1,1	-14	-2,3	Serinprotease SpIF
NWMN_0249	-	1,1	3,5	-2,1	Lipoprotein
Pathogenitätsfaktoren					
NWMN_1066	Efb	-2,5	2,6	-4,6	Fibrinogen-binde Protein
NWMN_1719	LukE	-2,8	-32,0	-6,1	Leukozidin LukE
NWMN_1927	LukF	2,0	-3,7	-1,2	Leukozidin LukF
NWMN_1928	LukS	1,0	-2,1	-2,3	Leukozidin LukS
NWMN_1073	Hla	-1,4	-21,1	-3,5	Alpha Hämolyisin
NWMN_2318	HlgA	-3,2	-13,0	-4,6	Gamma-Hämolyisin Komponent A
NWMN_2320	HlgB	-1,5	-4,9	-3,2	Gamma Hämolyisin, Komponent B
NWMN_2319	HlgC	-2,0	-5,3	-5,3	Gamma-HämolyisinKomponent C
NWMN_1880	Sak	-4,9	1,3	-9,8	Staphylokinase
NWMN_1883	Sep	-3,7	1,2	-9,2	Enterotoxin A
NWMN_2199	SsaA	-2,8	7,5	-3,2	Sekretorisches Antigen SsaA
NWMN_2203	SsaA	-15	1,6	-32,0	Sekretorisches Antigen SsaA
NWMN_0400	Ssl11	-2,3	1,6	-5,7	Enterotoxin
NWMN_1847	SspB2	-3,5	-2,1	-12,1	Staphopainthiol-Proteinase
NWMN_1872	MapW	2,6	2,3	1,2	65 kDa Membranprotein
NWMN_0756	ClfA	-6,1	1,9	-9,8	Clumping Factor A
NWMN_2529	ClfB	-4,3	1,2	-11,3	Clumping Factor B
NWMN_1345	Ebh	55,7	10,6	36,8	Extracelluläre Matrix-bindendes Protein
NWMN_2399	FnbA	-2,1	2,1	-3,7	Fibronectin-bindendes Protein A
NWMN_2397	FnbB	-3,0	1,9	-6,5	Fibronectin-bindendes Protein B
NWMN_0525	SdrE	-5,7	2,6	-21,1	Serin-Aspartate-enthaltendes Protein E
NWMN_0055	Spa	-3,0	2,1	-5,3	Protein A
NWMN_0634	SsaA	-7,5	2,5	-5,3	Sekretorisches Antigen SsaA
NWMN_1877	Chp	-2,3	-3,0	-17,1	Chemotaxis-inhibierendes Protein (CHIPS)
NWMN_1067	Flr	-3,0	-14,9	-6,5	FPRL1-inhibierendes Protein
NWMN_2317	Sbi	-2,3	3,5	-2,3	Immunglobulin-bindendes Protein
NWMN_1876	Scn	-3,5	-1,3	-9,2	Komplementinhibitor (SCIN)
zellwandaktive Proteine					
NWMN_0922	Atl	-4,6	1,9	-8,6	Bifunktionales Autolysin
NWMN_2469	IsaA	3,0	32,0	2,8	Transglycosylase
NWMN_2543	-	-3,5	1,3	-7,5	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase
NWMN_1999	SceD	-12,1	6,1	-17,1	Transglycosylase SceD
NWMN_0429	Sle1	1,3	10,6	-1,1	N-Acetylmuramoyl-L-alanin-Amidase
Metabolismus/Signaltransduktion					
NWMN_0262	Geh	-4,6	1,1	-14,9	Triacylglycerollipase
NWMN_0830	GlpQ	-6,5	1,5	-14,9	Glycerophosphoryldiesterphosphodiesterase

Anhang

NewmanHG Orf	Protein-name	x-fache Änderung $\Delta\text{stk/wt}$	x-fache Änderung $\Delta\text{stp/wt}$	x-fache Änderung $\Delta\Delta/\text{wt}$	Beschreibung
NWMN_0041	Plc	-3,5	1,0	-9,8	Phosphatidylinositol-Phosphodiesterase
NWMN_0601	SitA	-2,3	1,0	-3,2	unbekanntes Protein
NWMN_0705	SstD	-2,1	2,6	-2,8	Ferrichrom ABC Transporter-Lipoprotein
NWMN_1041	IsdA	-4,0	1,9	-9,2	Häm-Rezeptor A
NWMN_2313	TcyA	-1,4	-2,1	-2,0	Aminosäure-Transporter
Unbekannte Funktion					
NWMN_0851	Eap	-4,6	1,3	-11,3	MHC-Klasse II-analoges Protein
NWMN_2109	Map-W	-8,6	2,8	-14,9	MHC-Klasse II-analoges Protein
NWMN_0925	-	-3,0	1,5	-5,3	unbekanntes Protein
NWMN_0364	-	-3,0	1,1	-5,3	unbekanntes Protein
NWMN_0401	-	-2,6	1,6	-6,1	unbekanntes Protein
NWMN_0402	-	-4,6	-1,3	-14,9	unbekanntes Protein
NWMN_0585	-	-1,7	2,0	-3,2	unbekanntes Protein
NWMN_0931	-	-3,0	1,1	-7,0	unbekanntes Protein
NWMN_0677	SaeP	-2,5	-2,1	-4,6	unbekanntes Protein

7.6 Tabelle der B2H-Oligonukleotide

Tabelle 30: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide zur Klonierung der B2H-Vektoren.

Angegeben sind die Oligonukleotide mit der laufenden Archivierungsnummer (B-Nr.) und der Oligonukleotidsequenz.

Oligonukleotid	Sequenz	Oligonukleotid	Sequenz
B068 N-MurA_fw	ATATTGGATCCatggataaaaatagtaatcaaaagggtg	B145 N-1126-fw	ATATTGGATCCatgactaaaataatattatggg
B069 N-MurA_rev	TATTAGAATTCGatcgttaataacgttcaatgtctg	B146 N-1126_rev	ATATTGAATTCGtataagtttcttccctactagt
B070 C-MurA_fw	ATATTGGATCCGgataaaaatagtaatcaaaagggtgaa	B147 C-1126_fw	ATATTGGATCCGactaaaataatattatgggtaca
B071 C-MurA_rev	TATTAGAATTCtaatcgttaataacgttcaatgtc	B148 C-1126_rev	ATATTGAATTCtataaagtttcttccctac
B072 N-MurB_fw	ATATTGGATCCgtgataaataagacatctatcaagc	B149 N-1127_fw	ATATTGGATCCatgatagaaaacgtgagaa
B073 N-MurB_rev	TATTAGAATTCGcgattcctttggatgttca	B150 N-1127_rev	ATATTGAATTCGatgcttcttcttttatct
B074 C-MurB_fw	ATATTGGATCCGataaataaagacatctatcaagctttac	B151 C-1127_fw	ATATTGGATCCGatagaaaacgtgagaagtc
B075 C-MurB_rev	TATAAGAATTCttacgattcctttggatgtt	B152 C-1127_rev	ATATTGAATTCtaattgtccttcttctttat
B076 N-MurD_fw	ATATTGGATCCatgcttaattatacagggttagaaa	B153 N-1128_fw	ATATTGGATCCatgatagaaaacgtgagaa
B077 N-MurD_rev	TATAAGAATTCGataaagatgtaaatgggcac	B154 N-1128_rev	ATATTGAATTCGatgcttcttcttttatct
B078 C-MurD_fw	ATATTGGATCCgtaattatacagggttagaaaataaaaatg	B155 C-1128_fw	ATATTGGATCCGatagaaaacgtgagaagtc
B079 C-MurD_rev	TATAAGAATTCtaataagatgtaaatgggca	B156 C-1128_rev	ATATTGAATTCtaattgtccttcttctttat
B080 N-MurE_fw	ATATTGGATCCttggatgcaagtagctgtgt	B157 N-AgrA_fw	ATATTGGATCCatgaaaattttcatttgc
B081 N-MurE_rev	TATAAGAATTCGatcaacagggccacca	B158 N-AgrA_rev	ATATTGAATTCGtatatttttaacgtttctca
B082 C-MurE_fw	ATATTGGATCCGgatcaagtagctgtttaaaga	B159 C-AgrA_fw	ATATTGGATCCGaaaattttcatttgcg
B083 C-MurE_rev	TATAAGAATTCtaatacaacagggccacc	B160 C-AgrA_rev	ATATTGAATTCtatatttttttaacgtttctc
B084 N-MurF_fw	ATATTGGATCCatgattaatgttataaagcaaatc	B161 N-AgrB-fw	ATATTGGATCCtgaattattttgataaaaaat
B085 N-MurF_rev	TATAAGAATTCGtgaattaaagcattaccactc	B162 N-AgrB_rev	ATATTGAATTCGctttaagtcctccttaataaag
B086 C-MurF_fw	ATATTGGATCCGattaatgttataaagcaaatc	B163 C-AgrB_fw	ATATTGGATCCGaatattttgataaaaaattgac
B087 C-MurF_rev	TATAAGAATTCtatgaaattaaagcattaccact	B164 C-AgrB_rev	ATATTGAATTCctattttaagtcctcctta
B088 N-MraY_fw	ATATTGGATCCatgattttgtatgctgtattagc	B165 N-PmtC_fw	ATATTCTGCAGatgaaattagaacattacaaaaaaatagc
B089 N-MraY_rev	TATAAGAATTCGatgcactccaatccataaac	B166 N-PmtC_rev	ATATTCTAGAGctttatcacctctttgattatattgaagtc
B090 C-MraY_fw	ATATTGGATCCGatgtttgtatgctgtattagc	B167 C-PmtC_fw	ATATTCTGCAGGaaattagaacattacaaaaaaatagc
B091 C-MraY_rev	TATAAGAATTCtaatacactccaatccataaac	B168 C-PmtC_rev	ATATTCTAGAttatttatcacctctttgattatattgaag
B092 N-MurG_fw	ATATTGGATCCatgacgaaaatcgatttac	B169 N-PmtA_fw	ATATTGGATCCatgaatgcatagaaatgaag
B093 N-MurG_rev	TATAAGAATTCGatcattcaatgcttcttaatcatc	B170 N-PmtA_rev	ATATTGAATTCGaaaaccttcttccatcaat

Anhang

Oligonukleotid	Sequenz	Oligonukleotid	Sequenz
B094 C-MurG_fw	ATATTGGATCCGacgaaaaatcgattacc	B171 C-PmtA_fw	ATATTGGATCCGaatgcatagaattaagtaatg
B095 C-MurG_rev	TATAAGAATTCtaattcaatgcgtctttaatcat	B172 C-PmtA_rev	TATAAGGATCCttaaaaaaccttctccatc
B096 N-GlmS_fw	ATATTGGATCCatgtgtggaattgttggtatata	B173 N-Pbp4_fw	ATTGGATCCatgaaaaaattaatatctattatcatc
B097 N-GlmS_rev	TATAAGAATTCGctccacagtaactgatttagca	B174 N-Pbp4_rev	TTAGGATCCGcttttcttttctaataaaacgat
B098 C-GlmS_fw	ATATTGGATCCGgtggaattgttggtatattg	B175 C-Pbp4_fw	ATTGGATCCGaaaaaattaatatctattatcatcatt
B099 C-GlmS_rev	TATAAGAATTCttattccacagtaactgatttagc	B176 C-Pbp4_rev	TAAGAATTCttatttcttttctaataaaacg
B101 N-NW1518_fw	ATTGGATCCatggaaaacttgataaaacaatg	B177 N-PtaA_fw	ATTGGATCCatgtataaaatcttccaaaattt
B102 N-NW1518_rev	AATGAATTCGcttatttctcttttaaatagtaagaaac	B178 N-PtaA_rev	TAAGAATTCGctaaatgttttcaatttcatc
B103 C-NW1518_fw	ATTGGATCCGaaaacttgataaaacaatgaattc	B179 C-PtaA_fw	ATTGGATCCGataaaatcttccaaaatttagg
B104 C-NW1518_rev	ATGAATTCttatttcttcttttaaatagtaagaaac	B180 C-PtaA_rev	TAAGAATTCtataaatgttttcaatttcat
B105 N-MprF_fw	ATTGGATCCatgaatcaggaagttaaaacaaaa	B181 N-Ddl_fw	ATTGGATCCatgacaaaaagaaatattgtatc
B106 N-MprF_rev	AATGAATTCGcttgtgacgtattacacgcat	B182 N-Ddl_rev	ATTGAATTCGctcaatttgtatttattttctg
B107 C-MprF_fw	ATTGGATCCGaatcaggaagttaaaacaaaaatattt	B183 C-Ddl_fw	ATTGGATCCGacaaaagaaaatattgtatcg
B108 C-MprF_rev	AATGAATTCttatttgtgacgtattacacgc	B184 C-Ddl_rev	ATTGAATTCtagtcaatttgtatttatttttc
B109 N-GlmM_fw	ATATTGGATCCatgggaaaatatttggtagaca	B185 N-OatA_fw	ATTGGATCCatggatacaaaaagactttaaac
B110 N-GlmM_rev	TATAAGAATTCGctttatctaatcccatttattcttga	B186 N-OatA_rev	ATTGAATTCGcttcttattttagcatgtgt
B111 C-GlmM_fw	ATATTGGATCCGgaaaatatttggtagacagcg	B187 C-OatA_fw	ATTGGATCCGatacaaaaagactttaaactgt
B112 C-GlmM_rev	TATAAGAATTCttattatctaatcccatttattcttga	B188 C-OatA_rev	ATTGAATTCttatttcttattttagcatgt
B113 N-GlmU_fw	ATATTGGATCCatgttcatgcaagacacg	B189 N-AtI_fw	ATTGGATCCatggcgaaaaaattca
B114 N-GlmU_rev	TATAAGAATTCGcttctatatactcttcttctgtg	B190 N-AtI_rev	ATTGAATTCGcttataattgtggatgtcg
B115 C-GlmU_fw	ATATTGGATCCGttcatgcaagacacg	B191 C-AtI_fw	ATTGGATCCGcgaaaaaattcaattaca
B116 C-GlmU_rev	TATAAGAATTCttatttctatatactcttcttctgtg	B192 C-AtI_rev	ATTGAATTCttattatattgtggatgtc
B117 N-FemX_fw	ATATTCTAGAAatggaaaagatcatatcac	B193 N-MurI_fw	ATTGGATCCatgaataaaaccaatagggttaa
B118 N-FemX_rev	TATAAGAATTCGctttctgctttaaatttagc	B194 C-MurI_fw	ATTGGATCCGaaataaacaatagggttaatagac
B119 C-FemX_fw	TATAACTAGAGgaaaagatgcatatcactaactc	B195 C-MurI_rev	ATTGAATTCtagtcattcactgatatacgtt
B120 C-FemX_rev	TATAAGAATTCctatttctgctttaaatttagca	B196 N-MurT_fw	ATTGGATCCatgagacagtgagcg
B121 N-FemA_fw	ATATTGGATCCatgaagtttcaaaattaac	B197 N-MurT_rev	TAAGAATTCGctgattgacctcttcaa
B122 N-FemA_rev	TATAAGAATTCGcaaaaatctgtctttaaactt	B198 C-MurT_fw	ATTGGATCCGagacagtgagcgca
B123 C-FemA_fw	ATATTGGATCCGaaagttcaaaattaacag	B199 C-MurT_rev	TAAGAATTCttatgattgacctcttca
B124 C-FemA_rev	TATATGAATTCtaaaaaatctgtctttaaactt	B200 N-Sle1_fw	ATTGGATCCgtgcaaaaaaagtaattg
B125 N-FemB_fw	ATATTGGATCCatgaaatttacagagtaaac	B201 N-Sle1_rev	TAAGAATTCGctgtaatatctataattattacttg
B126 N-FemB_rev	TATAAGAATTCGcttctttaaatttttagctaa	B202 C-Sle1_fw	ATTGGATCCGcaaaaaaagtaattgcag
B127 C-FemB_fw	ATATTGGATCCGaaatttacagagtaactgt	B203 C-Sle1_rev	TAAGAATTCtagtaatatctataattattacttg
B128 C-FemB_rev	TATAAGAATTCctatttctttaaatttttagctaat	B204 N-LyH_fw	ATTGGATCCatgaaaaaataagagcat
B129 N-0969_fw	ATTGGATCCatgactggagaacaatttac	B205 N-LyH_rev	TAAGAATTCGcgcagaaaaataaatttag
B130 N-0969_rev	ATTGAATTCGcttctgctctttttgtc	B206 C-LyH_fw	ATTGGATCCGaaaaaataagagcatgg
B131 C-0969_fw	ATTGGATCCGactggagaacaatttactca	B207 C-LyH_rev	TAAGAATTCctacgcagaaaaataaattt
B132 C-0969_rev	ATTGAATTCttatttctgctctttttgtcc	B208 N-SsaA_fw	ATTGGATCCatggaatataaaaagataacttcc
B133 N-AgrC_fw	ATTGGATCCgtggaattataaatagttataattt	B209 N-SsaA_rev	TAAGAATTCGctgtaaatatagttaaagttagctg
B134 N-AgrC_rev	ATTGAATTCGctgtttaaataattcaactttt	B210 C-SsaA_fw	ATTGGATCCGaatataaaaagataactaattcgtt
B135 C-AgrC_fw	ATTGGATCCGgaattataaatagttataatttgt	B211 C-SsaA_rev	TAAGAATTCtagtaaatatagttaaagttagctg
B136 C-AgrC_rev	ATTGAATTCtagttgtaataattcaacttt	B212 N-Mgt_fw	ATTGGATCCatgaaagaagcgatagg
B137 N-0347 Mdh_fw	ATATTGGATCCatgacacaatatctttatg	B213 N-Mgt_rev	TAAGAATTCGcacgatttaattgtgacatag
B138 N-0347 Mdh_rev	TTATAGAATTCGctcattttagtggtttaaatt	B214 C-Mgt_fw	ATTGGATCCGaaaagaagcgataggact
B139 C-0347 Mdh_fw	ATATTGGATCCGacacaatatctttatggc	B215 C-Mgt_rev	TAAGAATTCtaacgatttaattgtgacata
B140 C-0347 Mdh_rev	ATATTGAATTCtagtcattttagtggtta	B216 N-GatD_fw	ATTGGATCCatgcatgaattgactatttat
B141 N-1125_fw	ATATTGGATCCatggcgattaaaaagtt	B217 N-GatD_rev	TAAGAATTCGcacgagattcttctgtctatt
B142 N-1125_rev	ATATTGAATTCGctcattataaaaatgacctc	B218 C-GatD_fw	ATTGGATCCGcatgaattgactattatcatt
B143 C-1125_fw	ATATTGGATCCGgcgattaaaaagtttagtacc	B219 C-GatD_rev	TAAGAATTCtaacgagatttcttctgtc

Oligonukleotid	Sequenz	Oligonukleotid	Sequenz
B144 C-1125_rev	ATATTGAATTCtagtcatttataaaaatagcc	B220 N-Muri_rev	ATTGAATTCGcgtcattcactgatatacgttc

7.7 Tabelle der B2H-Plasmide

Tabelle 31: In dieser Arbeit verwendete B2H-Plasmide.

Die B2H-Plasmide sind der entsprechenden Archivierungsnummer (B-Nr.) nach sortiert. Dem jeweiligen Gen ist in Klammern der entsprechende ORF von *S. aureus* NewmanHG angegeben. Ein großer Teil der aufgeführten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Darüber hinaus wurden Plasmide von Prof. S. Foster [164], Prof. D. Lopez, Benjamin Mielich-Süß (AG Lopez) [159] und Christian Schenk (Masterarbeit 2016, AG Ohlsen) verwendet.

B2H-Plasmide	Quelle	B2H-Plasmide	Quelle
B04 <i>E.coli</i> DH5α p25N (pKNT25)	Euromedex	B117 <i>E.coli</i> DH5α p18C-MurA (NWMN_2004)	diese Arbeit
B05 <i>E.coli</i> DH5α p25C (pKT25)	Euromedex	B118 <i>E.coli</i> DH5α p18N-MurB (NWMN_0707)	diese Arbeit
B06 <i>E.coli</i> DH5α p18C (pUT18C)	Euromedex	B119 <i>E.coli</i> DH5α p18C-MurB (NWMN_0707)	diese Arbeit
B07 <i>E.coli</i> DH5α p18N (pUT18)	Euromedex	B120 <i>E.coli</i> DH5α p18N-MurD (NWMN_1093)	diese Arbeit
B08 <i>E.coli</i> DH5α pUT18C-zip	Euromedex	B121 <i>E.coli</i> DH5α p18C-MurD (NWMN_1093)	diese Arbeit
B09 <i>E.coli</i> DH5α pKT25-zip	Euromedex	B122 <i>E.coli</i> DH5α p18N-MurE (NWMN_0888)	diese Arbeit
B15 <i>E.coli</i> DH5α p25C-Stk (NWMN_1130)	C. Schenk	B123 <i>E.coli</i> DH5α p18C-MurE (NWMN_0888)	diese Arbeit
B17 <i>E.coli</i> DH5α p18C-Stk (NWMN_1130)	C. Schenk	B124 <i>E.coli</i> DH5α p18N-MurF (NWMN_1986)	diese Arbeit
B18 <i>E.coli</i> DH5α p25N-Stp (NWMN_1129)	C. Schenk	B125 <i>E.coli</i> DH5α p18C-MurF (NWMN_1986)	diese Arbeit
B19 <i>E.coli</i> DH5α p25C-Stp (NWMN_1129)	C. Schenk	B126 <i>E.coli</i> DH5α p18N-MraY (NWMN_1092)	diese Arbeit
B20 <i>E.coli</i> DH5α p18N-Stp (NWMN_1129)	C. Schenk	B127 <i>E.coli</i> DH5α p18C-MraY (NWMN_1092)	diese Arbeit
B21 <i>E.coli</i> DH5α p18C-Stp (NWMN_1129)	C. Schenk	B128 <i>E.coli</i> DH5α p18N-MurG (NWMN_1330)	diese Arbeit
B24 <i>E.coli</i> DH5α p18N-KD (Stk1-350)	C. Schenk	B129 <i>E.coli</i> DH5α p18C-MurG (NWMN_1330)	diese Arbeit
B25 <i>E.coli</i> DH5α p18C-KD (Stk1-350)	C. Schenk	B130 <i>E.coli</i> DH5α p18N-GlmS (NWMN_2056)	diese Arbeit
B26 <i>E.coli</i> DH5α p18N-PASTA1 (Stk1-444)	C. Schenk	B131 <i>E.coli</i> DH5α p18C-GlmS (NWMN_2056)	diese Arbeit
B27 <i>E.coli</i> DH5α p18N-PASTA1 (Stk1-444)	C. Schenk	B132 <i>E.coli</i> DH5α p18N-GlmM (NWMN_2062)	diese Arbeit
B28 <i>E.coli</i> DH5α p18N-PASTA2 (Stk1-513)	C. Schenk	B133 <i>E.coli</i> DH5α p18C-GlmM (NWMN_2062)	diese Arbeit
B29 <i>E.coli</i> DH5α p18C-PASTA2 (Stk1-513)	C. Schenk	B134 <i>E.coli</i> DC10B p18N-GlmU (NWMN_0462)	diese Arbeit
B30 <i>E.coli</i> DH5α p18N-PASTA3 (Stk1-576)	C. Schenk	B135 <i>E.coli</i> DC10B p18C-GlmU (NWMN_0462)	diese Arbeit
B31 <i>E.coli</i> DH5α p18C-PASTA3 (Stk1-576)	C. Schenk	B144 <i>E.coli</i> DC10B p18C-EssA (NWMN_0221)	B. Mielch-Süß
B32 <i>E.coli</i> DH5α p18N-CcpA (NWMN_1629)	C. Schenk	B145 <i>E.coli</i> DC10B p18N-EssA (NWMN_0221)	B. Mielch-Süß
B33 <i>E.coli</i> DH5α p18C-CcpA (NWMN_1629)	C. Schenk	B146 <i>E.coli</i> DC10B p18C-EssA (NWMN_0222)	B. Mielch-Süß
B34 <i>E.coli</i> DH5α p18N-GraR (NWMN_0628)	C. Schenk	B147 <i>E.coli</i> DC10B p18N-EssA (NWMN_0222)	B. Mielch-Süß
B35 <i>E.coli</i> DH5α p18C-GraR (NWMN_0628)	C. Schenk	B148 <i>E.coli</i> DC10B p18C-EssC (NWMN_0223)	B. Mielch-Süß
B36 <i>E.coli</i> DH5α p18N-MurC (NWMN_1633)	C. Schenk	B149 <i>E.coli</i> DC10B p18N-EssC (NWMN_0223)	B. Mielch-Süß
B37 <i>E.coli</i> DH5α p18C-MurC (NWMN_1633)	C. Schenk	B150 <i>E.coli</i> DC10B p18C-EsaA (NWMN_0220)	B. Mielch-Süß
B38 <i>E.coli</i> DH5α p18N-PurA (NWMN_0016)	C. Schenk	B151 <i>E.coli</i> DC10B p18N-EsaA (NWMN_0220)	B. Mielch-Süß
B39 <i>E.coli</i> DH5α p18C-PurA (NWMN_0016)	C. Schenk	B152 <i>E.coli</i> DC10B p18C-SrrB (NWMN_1399)	B. Mielch-Süß
B40 <i>E.coli</i> DH5α p18N-VraR (NWMN_1822)	C. Schenk	B153 <i>E.coli</i> DC10B p18N-SrrB (NWMN_1399)	B. Mielch-Süß
B41 <i>E.coli</i> DH5α p18C-VraR (NWMN_1822)	C. Schenk	B154 <i>E.coli</i> DC10B p18C-PhoR (NWMN_1585)	B. Mielch-Süß
B42 <i>E.coli</i> DH5α p18N-WalK (NWMN_0018)	C. Schenk	B155 <i>E.coli</i> DC10B p18N-PhoR (NWMN_1585)	B. Mielch-Süß
B43 <i>E.coli</i> DH5α p18C-WalK (NWMN_0018)	C. Schenk	B156 <i>E.coli</i> DC10B p18C-HssS (NWMN_2264)	B. Mielch-Süß
B44 <i>E.coli</i> DH5α p18N-WalR (NWMN_0017)	C. Schenk	B157 <i>E.coli</i> DC10B p18N-HssS (NWMN_2264)	B. Mielch-Süß
B45 <i>E.coli</i> DH5α p18C-WalR (NWMN_0017)	C. Schenk	B158 <i>E.coli</i> DC10B p18C-AgrC (NWMN_1945)	B. Mielch-Süß
B49 <i>E.coli</i> DH5α p25C-Stk _{T164A}	C. Schenk	B159 <i>E.coli</i> DC10B p18N-AgrC (NWMN_1945)	B. Mielch-Süß

Anhang

B2H-Plasmide	Quelle	B2H-Plasmide	Quelle
B50 <i>E.coli</i> DH5α p25C-DivIB (pGL540)	Steele et al	B160 <i>E.coli</i> DC10B p18C-NsaS (NWMN_2523)	B. Mielch-Süß
B51 <i>E.coli</i> DH5α p25C-FtsA (pGL541)	Steele et al	B161 <i>E.coli</i> DC10B p18N-NsaS (NWMN_2523)	B. Mielch-Süß
B52 <i>E.coli</i> DH5α p25C-FtsL (pGL542)	Steele et al	B162 <i>E.coli</i> DC10B p18N-ArlS (NWMN_1327)	AG D. Lopez
B53 <i>E.coli</i> DH5α p25C-Pbp2 (pGL543)	Steele et al	B163 <i>E.coli</i> DC10B p18N-VraS (NWMN_1823)	AG D. Lopez
B54 <i>E.coli</i> DH5α p25C-FtsZ (pGL549)	Steele et al	B164 <i>E.coli</i> DC10B p18N-NsaS (NWMN_2523)	AG D. Lopez
B55 <i>E.coli</i> DH5α p25C-Pbp1 (pGL550)	Steele et al	B165 <i>E.coli</i> DC10B p18N-GraS (NWMN_0629)	AG D. Lopez
B56 <i>E.coli</i> DH5α p25C-DivIC (pGL551)	Steele et al	B166 <i>E.coli</i> DC10B p18N-SaeS (NWMN_0674)	AG D. Lopez
B57 <i>E.coli</i> DH5α p25C-Pbp3 (pGL556)	Steele et al	B167 <i>E.coli</i> DC10B p18C-MreC (NWMN_1551)	AG D. Lopez
B58 <i>E.coli</i> DH5α p25C-GpsB (pGL557)	Steele et al	B168 <i>E.coli</i> DC10B p18C-MreD (NWMN_1550)	AG D. Lopez
B59 <i>E.coli</i> DH5α p25C-SepF (pGL559)	Steele et al	B169 <i>E.coli</i> DC10B p18N-EzrA (NWMN_1611)	AG D. Lopez
B60 <i>E.coli</i> DH5α p25C-FtsW (pALB3)	Steele et al	B170 <i>E.coli</i> DC10B p18N-MecA (nicht in NWMN)	AG D. Lopez
B61 <i>E.coli</i> DH5α p25C-RodA (pALB8)	Steele et al	B171 <i>E.coli</i> DC10B p18N-ComK (NWMN_0895)	AG D. Lopez
B62 <i>E.coli</i> DH5α p25N-FtsZ (pVF29)	Steele et al	B172 <i>E.coli</i> DC10B p18N-ClpC (NWMN_0487)	AG D. Lopez
B63 <i>E.coli</i> DH5α p18C-DivIB (pGL544)	Steele et al	B172B <i>E.coli</i> DC10B p18N-FemX (NWMN_2163)	diese Arbeit
B64 <i>E.coli</i> DH5α p18C-FtsA (pGL545)	Steele et al	B173 <i>E.coli</i> DC10B p18C-FemX (NWMN_2163)	diese Arbeit
B65 <i>E.coli</i> DH5α p18C-FtsL (pGL546)	Steele et al	B174 <i>E.coli</i> DC10B p18N-FemA (NWMN_1286)	diese Arbeit
B66 <i>E.coli</i> DH5α p18C-Pbp2 (pGL547)	Steele et al	B175 <i>E.coli</i> DC10B p18C-FemA (NWMN_1286)	diese Arbeit
B67 <i>E.coli</i> DH5α p18C-FtsZ (pGL562)	Steele et al	B176 <i>E.coli</i> DC10B p18N-FemB (NWMN_1287)	diese Arbeit
B68 <i>E.coli</i> DH5α p18C-DivIC (pGL554)	Steele et al	B177 <i>E.coli</i> DC10B p18C-FemB (NWMN_1287)	diese Arbeit
B69 <i>E.coli</i> DH5α p18C-GpsB (pGL570)	Steele et al	B178 <i>E.coli</i> DC10B p18N-MprF (NWMN_1272)	diese Arbeit
B70 <i>E.coli</i> DH5α p18C-SepF (pGL572)	Steele et al	B179 <i>E.coli</i> DC10B p18C-MprF (NWMN_1272)	diese Arbeit
B71 <i>E.coli</i> DH5α p18C-FtsW (pALB6)	Steele et al	B180 <i>E.coli</i> DC10B p18N-0969 (NWMN_0969)	diese Arbeit
B72 <i>E.coli</i> DH5α p18C-RodA (pALB14)	Steele et al	B181 <i>E.coli</i> DC10B p18C-0969 (NWMN_0969)	diese Arbeit
B73 <i>E.coli</i> DH5α p18C-EzrA (pVF32)	Steele et al	B182 <i>E.coli</i> DC10B p18N-AgrC (NWMN_1945)	diese Arbeit
B74 <i>E.coli</i> DH5α p25C-FloA (NWMN_1477)	AG D. Lopez	B183 <i>E.coli</i> DC10B p18C-AgrC (NWMN_1945)	diese Arbeit
B75 <i>E.coli</i> DH5α p25N-FloA (NWMN_1477)	AG D. Lopez	B184 <i>E.coli</i> DC10B p18N-Mdh (NWMN_0347)	diese Arbeit
B76 <i>E.coli</i> DH5α p25N-NfeD (NWMN_1476)	AG D. Lopez	B185 <i>E.coli</i> DC10B p18C-Mdh (NWMN_0347)	diese Arbeit
B77 <i>E.coli</i> DH5α p25C-1401 (NWMN_1475)	AG D. Lopez	B186 <i>E.coli</i> DC10B p18N-1125 (NWMN_1125)	diese Arbeit
B78 <i>E.coli</i> DH5α p25N-1401 (NWMN_1475)	AG D. Lopez	B187 <i>E.coli</i> DC10B p18C-1125 (NWMN_1125)	diese Arbeit
B79 <i>E.coli</i> DH5α p25C-EssB (NWMN_0222)	AG D. Lopez	B188 <i>E.coli</i> DC10B p18N-1126 (NWMN_1126)	diese Arbeit
B80 <i>E.coli</i> DH5α p25N-EssB (NWMN_0222)	AG D. Lopez	B189 <i>E.coli</i> DC10B p18C-1126 (NWMN_1126)	diese Arbeit
B81 <i>E.coli</i> DH5α p25C-CvfA	AG D. Lopez	B190 <i>E.coli</i> DC10B p18N-1127 (NWMN_1127)	diese Arbeit
B82 <i>E.coli</i> DH5α p25C-Pbp2 (NWMN_1361)	AG D. Lopez	B191 <i>E.coli</i> DC10B p18C-1127 (NWMN_1127)	diese Arbeit
B83 <i>E.coli</i> DH5α p25C-Pbp3 (NWMN_1455)	AG D. Lopez	B192 <i>E.coli</i> DC10B p18N-1128 (NWMN_1128)	diese Arbeit
B84 <i>E.coli</i> DH5α p18C-Cls1 (NWMN_1230)	AG D. Lopez	B193 <i>E.coli</i> DC10B p18C-1128 (NWMN_1128)	diese Arbeit
B85 <i>E.coli</i> DH5α p18C-Cls2 (NWMN_1992)	AG D. Lopez	B194 <i>E.coli</i> DC10B p18N-AgrA (NWMN_1946)	diese Arbeit
B86 <i>E.coli</i> DH5α p18C-DltD (NWMN_0806)	AG D. Lopez	B195 <i>E.coli</i> DC10B p18C-AgrA (NWMN_1946)	diese Arbeit
B87 <i>E.coli</i> DH5α p18C-EbpS (NWMN_1389)	AG D. Lopez	B196 <i>E.coli</i> DC10B p18N-AgrB (NWMN_1944)	diese Arbeit
B88 <i>E.coli</i> DH5α p18C-EzrA (NWMN_1611)	AG D. Lopez	B197 <i>E.coli</i> DC10B p18C-AgrB (NWMN_1944)	diese Arbeit
B89 <i>E.coli</i> DH5α p18C-FloA (NWMN_1477)	AG D. Lopez	B198 <i>E.coli</i> DC10B p18N-PmtC (NWMN_1867)	diese Arbeit
B90 <i>E.coli</i> DH5α p18C-FtsH (NWMN_0473)	AG D. Lopez	B199 <i>E.coli</i> DC10B p18C-PmtC (NWMN_1867)	diese Arbeit
B91 <i>E.coli</i> DH5α p18C-NfeD (NWMN_1476)	AG D. Lopez	B200 <i>E.coli</i> DC10B p18N-PmtA (NWMN_1869)	diese Arbeit
B92 <i>E.coli</i> DH5α p18C-Pbp2 (NWMN_1361)	AG D. Lopez	B201 <i>E.coli</i> DC10B p18C-PmtA (NWMN_1869)	diese Arbeit
B93 <i>E.coli</i> DH5α p18C-Pbp3 (NWMN_1455)	AG D. Lopez	B203 <i>E.coli</i> DC10B p18C-Pbp4 (NWMN_0612)	diese Arbeit
B94 <i>E.coli</i> DH5α p18C-1401 (NWMN_1475)	AG D. Lopez	B204 <i>E.coli</i> DC10B p18N-Ddl (NWMN_1987)	diese Arbeit
B95 <i>E.coli</i> DH5α p18C-SecA (NWMN_0722)	AG D. Lopez	B205 <i>E.coli</i> DC10B p18C-Ddl (NWMN_1987)	diese Arbeit

Anhang

B2H-Plasmide	Quelle	B2H-Plasmide	Quelle
B96 <i>E. coli</i> DH5α p18C-SecA (NWMN_1539)	AG D. Lopez	B206 <i>E. coli</i> DC10B p18N-PtaA (NWMN_1619)	diese Arbeit
B97 <i>E. coli</i> DH5α p18C-SrtA (NWMN_2426)	AG D. Lopez	B207 <i>E. coli</i> DC10B p18C-PtaA (NWMN_1619)	diese Arbeit
B98 <i>E. coli</i> DH5α p18N-Cls1 (NWMN_1230)	AG D. Lopez	B208 <i>E. coli</i> DC10B p18N-OatA (NWMN_2467)	diese Arbeit
B99 <i>E. coli</i> DH5α p18N-Cls2 (NWMN_1992)	AG D. Lopez	B212 <i>E. coli</i> DC10B p18N-MurI (NWMN_1063)	diese Arbeit
B100 <i>E. coli</i> DH5α p18N-CvfA	AG D. Lopez	B213 <i>E. coli</i> DC10B p18C-MurI (NWMN_1063)	diese Arbeit
B101 <i>E. coli</i> DH5α p18N-DltD (NWMN_0806)	AG D. Lopez	B214 <i>E. coli</i> DC10B p18N-MurT (NWMN_1830)	diese Arbeit
B102 <i>E. coli</i> DH5α p18N-EbpS (NWMN_1389)	AG D. Lopez	B215 <i>E. coli</i> DC10B p18C-MurT (NWMN_1830)	diese Arbeit
B103 <i>E. coli</i> DH5α p18N-EssB (NWMN_0222)	AG D. Lopez	B216 <i>E. coli</i> DC10B p18N-Sle1 (NWMN_0429)	diese Arbeit
B104 <i>E. coli</i> DH5α p18N-EzrA (NWMN_1611)	AG D. Lopez	B217 <i>E. coli</i> DC10B p18C-Sle1 (NWMN_0429)	diese Arbeit
B105 <i>E. coli</i> DH5α p18N-FloA (NWMN_1477)	AG D. Lopez	B218 <i>E. coli</i> DC10B p18N-LytH (NWMN_1534)	diese Arbeit
B106 <i>E. coli</i> DH5α p18N-FtsH (NWMN_0473)	AG D. Lopez	B219 <i>E. coli</i> DC10B p18C-LytH (NWMN_1534)	diese Arbeit
B107 <i>E. coli</i> DH5α p18N-NfeD (NWMN_1476)	AG D. Lopez	B220 <i>E. coli</i> DC10B p18N-SsaA (NWMN_2443)	diese Arbeit
B108 <i>E. coli</i> DH5α p18N-1401 (NWMN_1475)	AG D. Lopez	B221 <i>E. coli</i> DC10B p18C-SsaA (NWMN_2443)	diese Arbeit
B109 <i>E. coli</i> DH5α p18N-SecA (NWMN_0722)	AG D. Lopez	B222 <i>E. coli</i> DC10B p18N-Mgt (NWMN_1766)	diese Arbeit
B110 <i>E. coli</i> DH5α p18N-SecA (NWMN_1539)	AG D. Lopez	B223 <i>E. coli</i> DC10B p18C-Mgt (NWMN_1766)	diese Arbeit
B111 <i>E. coli</i> DH5α p18N-SrtA (NWMN_2426)	AG D. Lopez	B224 <i>E. coli</i> DC10B p18N-GatD (NWMN_1829)	diese Arbeit
B112 <i>E. coli</i> DH5α p18C-1518 (NWMN_1518)	diese Arbeit	B225 <i>E. coli</i> DC10B p18C-GatD (NWMN_1829)	diese Arbeit
B113 <i>E. coli</i> DH5α p25C-Stk _{Kr164A+T166A}	diese Arbeit	B226 <i>E. coli</i> DC10B p25C-FemX (NWMN_2163)	diese Arbeit
B114 <i>E. coli</i> DH5α p25C-Stk _{Kr166A}	diese Arbeit	B227 <i>E. coli</i> DC10B p25C-FemA (NWMN_1286)	diese Arbeit
B115 <i>E. coli</i> DH5α p18N-1518 (NWMN_1518)	diese Arbeit	B228 <i>E. coli</i> DC10B p25C-FemB (NWMN_1287)	diese Arbeit
B116 <i>E. coli</i> DH5α p18N-MurA (NWMN_2004)	diese Arbeit	B233 <i>E. coli</i> DC10B p25C-MurG (NWMN_1330)	diese Arbeit

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des <i>stp/stk</i> -Operons.	9
Abbildung 2: Struktureller Aufbau von Stk.	10
Abbildung 3: Aktivierungsmechanismus von Stk.	12
Abbildung 4: Substrate von Stk in <i>S. aureus</i>	15
Abbildung 5: Peptidoglycan-Synthese in <i>S. aureus</i>	18
Abbildung 6: Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	20
Abbildung 7: Übersicht der verschiedenen <i>Omics</i> -Techniken zur Charakterisierung der <i>S. aureus</i> -Stämme.	41
Abbildung 8: Überprüfung der α Stk-Antikörperspezifität.	52
Abbildung 9: Stk-Proteinkomplex-Analyse mittels BN-PAGE.	54
Abbildung 10: Stk und Stp sind in der Zellmembran lokalisiert.	55
Abbildung 11: Phosphoproteom der <i>S. aureus</i> -Stämmen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase.	56
Abbildung 12: Zellwand-Analyse der <i>S. aureus</i> -Stämme mittels TEM.	58
Abbildung 13: Muropeptid-Analyse der <i>S. aureus</i> -Stämme mittels UPLC-MS.	60
Abbildung 14: Lysostaphin-Empfindlichkeit der <i>S. aureus</i> -Stämme.	61
Abbildung 15: Zellwandvorläufer-Analyse der <i>S. aureus</i> -Stämme mittels LC-MS.	62
Abbildung 16: Stk interagiert mit FemA/B sowie weiteren Zellwandsynthese- und Zellteilungsproteinen.	64
Abbildung 17: Quantifizierung ausgewählter Stk-Interaktionspartner mittels β -Galaktosidase-Assays.	65
Abbildung 18: Interaktionsnetzwerk von Stk, Stp und FemXAB mit Zellwandsynthese- und Zellteilungsproteinen.	66
Abbildung 19: Stk und Stp phosphorylieren bzw. dephosphorylieren FemX.	67
Abbildung 20: Hauptkomponenten-Analyse der stammspezifischen Transkriptome.	69
Abbildung 21: Differenziell exprimierte Gene in allen Mutanten.	70
Abbildung 22: Auswertung der stammspezifischen Proteome.	76
Abbildung 23: Differenzielle exprimierte Proteine in allen Mutanten.	77
Abbildung 24: Interaktom von Stk.	81
Abbildung 25: Auswertung der stammspezifischen Sekretome.	82
Abbildung 26: Sekretierte Toxine der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.	83
Abbildung 27: Sekretierte Virulenzfaktoren und Zellwandhydrolasen der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.	84
Abbildung 28: Stammspezifische Antikörperantwort im murinen Infektionsmodell.	85
Abbildung 29: Hämolyseverhalten verschiedener <i>S. aureus</i> -Stämme.	87
Abbildung 30: Energieladungen der <i>S. aureus</i> -Stämme.	88
Abbildung 31: Metabolitkonzentrationen der <i>S. aureus</i> -Stämme.	91
Abbildung 32: Charakterisierung der Stk-Stk-Interaktion mittels B2H.	92
Abbildung 33: Testung und Validierung potentieller Interaktionspartner von Stk und Stp mittels B2H.	93
Abbildung 34: Testung potentieller Interaktionspartner von Stk und Stp mittels B2H.	94

Abbildung 35: <i>In vitro</i> Phosphorylierungsstelle von FemX.	103
Abbildung 36: Modell der Regulation von FemX durch Stk und Stp.	106
Abbildung 37: Pyrimidinsynthese in <i>S. aureus</i>	113
Abbildung 38: Cystein- und Methioninsynthese in <i>S. aureus</i>	115
Abbildung 39: Eisenaufnahmesysteme von <i>S. aureus</i>	116

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht von PASTA-STPKs und STPPs sowie deren Substrate in ausgewählten Bakterien	7
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Kits.	22
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Medien.....	22
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.	23
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.	24
Tabelle 7: Allgemein verwendete Oligonukleotide.	24
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendet Plasmide.	25
Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.....	26
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Geräte.	26
Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Software.	26
Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Datenbanken.	26
Tabelle 13: MHK-Bestimmung der <i>S. aureus</i> -Stämme gegenüber zellwandaktiver Antibiotika.	68
Tabelle 14: Eigenschaften der <i>S. aureus</i> -Muropeptide analysiert mittels UPLC-MS.	129
Tabelle 15: Quervernetzungsgrad der <i>S. aureus</i> -Muropeptide.	129
Tabelle 16: Erhöhte Transkriptmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stk.	129
Tabelle 17: Verringerte Transkriptmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stk.	130
Tabelle 18: Erhöhte Transkriptmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stp.	130
Tabelle 19: Verminderte Transkriptmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stp.	131
Tabelle 20: Erhöhte Transkriptmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stk Δ stp.	132
Tabelle 21: Verminderte Transkriptmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stk Δ stp.	135
Tabelle 22: Erhöhte Proteinmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stk.....	136
Tabelle 23: Verminderte Proteinmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stk.	136
Tabelle 24: Erhöhte Proteinmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stp.	137
Tabelle 25: Verminderte Proteinmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stp.....	137
Tabelle 26: Erhöhte Proteinmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stk Δ stp.	138
Tabelle 27: Verminderte Proteinmenge in <i>S. aureus</i> NewmanHG Δ stk Δ stp.....	139
Tabelle 28: Interaktom von Stk.	139
Tabelle 29: Differenziell sekretierte Proteine der Mutanten.	140
Tabelle 30: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide zur Klonierung der B2H-Vektoren.	141
Tabelle 31: In dieser Arbeit verwendete B2H-Plasmide.....	143

VI. Abkürzungsverzeichnis

αStk	Stk-Antikörper	MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
ABC	Ammoniumbicarbonat	MS	Massenspektrometrie
AK	Antikörper	MSSA	Methicillin-sensitiver <i>S. aureus</i>
AMP, ADP, ATP	Adenosin-Mono-/Di-/Triphosphat	n.d.	nicht detektiert
AS	Aminosäure	n.s.	nicht signifikant
AU	Arbiträre Einheit	ng	Nanogramm
B2H	Bakterielles Zwei-Hybrid-System	nt	Nukleotide
bp	Basenpaare	OD_{600nm}	Optische Dichte bei 600 nm
CA-MRSA	<i>community-acquired</i> MRSA	ORF	Offener Leserahmen
cDNA	<i>copy</i> DNA	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CMP, CDP, CTP	Cytidin-Mono-/Di-/Triphosphat	PASTA	<i>penicillin binding protein and Ser/Thr kinase associated</i>
ddH₂O	bidestilliertes Wasser	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
DDM	Dodecyl β-D-Maltopyranoside	PGN	Peptidoglycan
dH₂O	destilliertes Wasser	PSM	<i>phenol soluble modulins</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PVL	Panton-Valentine Leukozidine
DNase	Desoxyribonuklease	RNA	Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol	RNase	Ribonuklease
ECL	<i>Enhanced Chemilumescence</i>	ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	rpm	Umdrehung pro Minute
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbant Assay</i>	RT	Raumtemperatur (22 °C)
et al.	<i>et altera</i> (und andere)	s	Sekunden
g	Erdbeschleunigung oder Gramm	SDS	Natriumdisulfat
GMP, GDP, GTP	Guanosin-Mono-/Di-/Triphosphat	Stk_{KD}	Kinasedomäne von Stk
h	Stunde	Stk_{PASTA}	PASTA-Domänen von Stk
HA-MRSA	<i>healthcare-associated</i> MRSA	STPK	Serin-/Threonin-Proteinkinase
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>	STPP	Serin-/Threonin-Proteinphosphatase
IgG/IgM	Immunglobulin G/M	t	Zeit
IMP	Inosinmonophosphat	T7SS	Typ-7-Sekretionssystem
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid	TAE	TRIS-Acetat-EDTA
kb	Kilobasen	TCA	Trichloressigsäure
kDa	Kilodalton	TE	TRIS-EDTA
l	Liter	TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
LA-MRSA	<i>livestock-associated</i> MRSA	TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
LB	Luria-Bertani	tRNA	Transfer-RNA
LC	<i>ultra-performance liquid chromatography</i>	TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
M	Molar	U	Unit
mA	Milliampere	UMP, UDP, UTP	Uridin-Mono-/Di-/Triphosphat
MHK	Minimale Hemmkonzentration	UPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
min	Minuten	V	Volt
ml	Milliliter	VISA	Vancomycin-intermediärer <i>S. aureus</i>
μg	Mikrogramm	VRSA	Vancomycin-resistenter <i>S. aureus</i>
μl	Mikroliter	VSSA	Vancomycin-sensitiver <i>S. aureus</i>
μM	Mikromolar	W	Watt
mM	Millimolar	wt	Wildtyp

VII. Lebenslauf

VIII. Eidesstattlich Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Disserattion eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegeben Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Disseratation weder in gleicher noch ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt hat.

Ort, Datum

Marcel Jarick