

**Molekulare und funktionelle Charakterisierung der Ser/Thr-Kinase PknB  
und –Phosphatase Stp von *Staphylococcus aureus***

**Molecular and functional characterization of the ser/thr kinase PknB  
and phosphatase Stp of *Staphylococcus aureus***



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

vorgelegt von

**Stefanie Donat**  
aus Hammelburg

Institut für Molekulare Infektionsbiologie  
Würzburg 2009

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskomitees:

Vorsitzender:

1. Betreuer: PD Dr. K. Ohlsen
2. Betreuer: PD Dr. W. Ziebuhr
3. Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. J. Hacker

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2006 bis Juli 2009 am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg angefertigt.

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

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

Würzburg, den

**"Jedes gelöste Problem ist einfach."**

**Thomas Alva Edison**

## 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 und Betreuung dieser Arbeit;
- Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Jörg Hacker für die Möglichkeit an seinem Institut arbeiten zu dürfen;
- PD Dr. Wilma Ziebuhr für wissenschaftliche Diskussionen und die Übernahme des Zweitgutachtens;
- Unseren Kooperationspartnern an der Universität Greifswald Dr. Susanne Engelmann, Stephan Fuchs, Manuel Liebeke, PD Dr. Michael Lalk, Dr. Dörte Becher;
- Unseren Kooperationspartnern an der Universität Tübingen Prof. Dr. Thilo Stehle und Sonja Raketten;
- Unseren Kooperationspartner an der Universität Sheffield Prof. Simon Foster und Yvonne Rauter für die schöne Zeit in Sheffield;
- Unseren Kooperationspartnern an der Universität Genf Prof. Dr. Jacques Schrenzel und Dr. Patrice François;
- Tina und Grit für die gute Zusammenarbeit, gegenseitige Unterstützung und Freundschaft. Ohne euch wäre es nur halb so schön gewesen!
- Uschi Wallner für ihre technische und freundschaftliche Unterstützung;
- Allen Kokken und Colis sowie allen Institutsmitarbeitern für eine gute Arbeitsatmosphäre;

Vor allem danke ich meinen Eltern und besonders Frank für Liebe, Verständnis und Aufmunterung während des Studiums und der Promotion. Vielen Dank für eure große Unterstützung in so vielen Situationen!

<b>1.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
1.1	Zusammenfassung.....	4
1.2	Summary .....	6
<b>2.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
2.2	Resistenzentwicklung in <i>S. aureus</i> .....	11
2.3	Ser/Thr-Proteinkinasen und Ser/Thr-Proteinphosphatasen in Bakterien.....	14
2.3.1.	Proteinkinasen.....	14
2.3.2.	Proteinphosphatasen.....	23
2.4	Ser/Thr-Proteinkinasen und –Phosphatasen von <i>S. aureus</i> .....	25
2.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	27
<b>3.</b>	<b>Material .....</b>	<b>28</b>
3.1	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme .....	28
3.2	Kits .....	28
3.3	Antibiotika .....	29
3.4	Medien und Agarplatten .....	29
3.5	Puffer und Lösungen .....	32
3.6	Bakterienstämme.....	33
3.7	Oligonukleotide .....	34
3.8	Plasmide.....	38
3.9	Software .....	39
<b>4.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>40</b>
4.1	Extinktionsmessung .....	40
4.2	Stammhaltung.....	40
4.3	Kultivierung.....	40
4.3.1	Allgemeines .....	40
4.3.2	Herstellungen CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	40
4.3.3	Herstellungen elektrokompeter <i>S. aureus</i> -Zellen.....	41
4.4	<b>Arbeiten mit DNA.....</b>	<b>41</b>
4.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	41
4.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. aureus</i> .....	42
4.4.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. aureus</i> .....	42
4.4.4	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	43
4.4.5	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	43
4.4.5.1	Standard-PCR .....	43
4.4.5.2	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR, semiquantitativ) .....	44
4.4.6	Horizontale Gelelektrophorese .....	44
4.4.7	Aufreinigung von PCR-Fragmenten .....	45
4.4.8	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	45
4.4.9	Restriktionsspaltung von DNA.....	46
4.4.10	Ligation von DNA.....	46
4.4.10.1	Ligation in pGEM <sup>®</sup> -T.....	46
4.4.10.2	Ligation mit T4-Ligase .....	47
4.4.11	Transformation von Bakterien .....	47
4.4.11.1	Transformation von <i>E. coli</i> (CaCl <sub>2</sub> -Methode).....	47
4.4.11.2	Transformation von <i>S. aureus</i> (Elektroporation) .....	47
4.4.12	Transduktion von Bakterien.....	48

4.4.12.1	Herstellung des Phagenlysats .....	48
4.4.12.2	Transduktion des Empfängerstamms .....	49
4.4.13	Herstellung von Deletionsmutanten .....	49
<b>4.5</b>	<b>Arbeiten mit RNA .....</b>	<b>50</b>
4.5.1	Allgemeines .....	50
4.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Staphylokokken .....	50
4.5.3	DNase-Lyse .....	51
4.5.4	Aufreinigung der RNA .....	52
4.5.5	Konzentrationsbestimmung von RNA .....	52
4.5.6	Reverse Transkription .....	52
4.5.7	Relative Quantifizierung der Gen-Expression mit Hilfe der Real-Time PCR .....	53
4.5.7.1	Quantitative RT-PCR-Analyse .....	55
<b>4.6</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>56</b>
4.6.1	Konstruktion rekombinanter Proteine .....	56
4.6.2	Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Proteine .....	56
4.6.3	Entfernung des His-Tag mittels Faktor Xa-Verdau .....	57
4.6.4	Pufferaustausch von Proteinlösungen .....	57
4.6.5	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	58
4.6.6	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DGE) .....	58
4.6.6.1	Präparation zytoplasmatischer Proteine für 2DGE .....	58
4.6.6.2	Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	59
4.6.7	Färbung der Proteingele .....	59
4.6.7.1	Färbung der Proteingele mit ProQ <sup>®</sup> Diamond .....	59
4.6.7.2	Färbung der Proteingele mit SYPRO Ruby .....	60
4.6.8	Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie .....	60
4.6.9	<i>In vitro</i> -Kinaseassay .....	60
4.6.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	61
4.6.10.1	Vorbereitung der Proteinproben .....	61
4.6.10.2	Herstellung eines Polyacrylamidgels .....	62
4.6.10.3	Elektrophorese-Lauf .....	63
4.6.10.4	Anfärben des Gels .....	63
4.6.11	Western Blot .....	64
4.6.12	Antikörperaufreinigung .....	65
<b>4.7</b>	<b>Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) .....</b>	<b>65</b>
<b>4.8</b>	<b>Mikroskopie .....</b>	<b>66</b>
<b>4.9</b>	<b>Bestimmung der Biofilm-Bildung an Polystyren-Mikrotiterplatten .....</b>	<b>66</b>
<b>4.10</b>	<b>Autolyse-Assay .....</b>	<b>67</b>
<b>4.11</b>	<b>Intrazelluläre Metabolom-Analyse .....</b>	<b>67</b>
<b>4.12</b>	<b>PurA Enzym-Assay .....</b>	<b>68</b>
<b>4.13</b>	<b>Vergleichende Transkriptom-Analysen .....</b>	<b>69</b>
4.13.1	Arbeiten mit DNA-Microarrays .....	69
4.13.2	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese .....	69
4.13.3	Vergleichende Transkriptom-Analyse von 8325 $\Delta$ <i>pknB</i> .....	70
4.13.4	Vergleichende Transkriptom-Analyse von 8325 $\Delta$ <i>yloO</i> .....	72
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>73</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung der Ser/Thr-Proteinkinase PknB .....</b>	<b>73</b>
5.1.1	<i>In silico</i> -Untersuchung von PknB .....	73
5.1.2	RT-PCR-Analyse der putativen Operonorganisation der ORFs SA1058-SA1066 .....	74
5.1.3	Microarray-basierte vergleichende Transkriptom-Analyse von <i>S. aureus</i> 8325 und der 8325 $\Delta$ <i>pknB</i> -Mutante .....	75
5.1.4	Untersuchung der Expression ausgewählter Gene in 8325 $\Delta$ <i>pknB</i> mittels RT-PCR-Analyse .....	84
5.1.5	Funktionelle Charakterisierung der katalytischen Domäne PknB <sub>1-274</sub> .....	85
5.1.5.1	Die katalytischen Domäne PknB <sub>1-274</sub> besitzt Autophosphorylierungsaktivität .....	86
5.1.5.2	PknB <sub>1-274</sub> phosphoryliert MBP zeit- und kationenabhängig .....	87
5.1.6	Identifizierung putativer Phosphorylierungsstellen von PknB mittels MS-Analyse .....	89

5.1.6.1	Einfluss der autophosphorylierenden Threoninreste T164 und T166 auf die Kinaseaktivität von PknB .....	91
5.1.7	Identifikation von putativen Substraten von PknB durch Phosphoproteom-Analysen	92
5.1.8	Überexpression und Reinigung putativer Substrate von PknB .....	101
5.1.9	Funktionelle Charakterisierung von PknB .....	102
5.1.9.1	PknB phosphoryliert MBP zeit- und kationenabhängig .....	103
5.1.9.2	PknB besitzt Autophosphorylierungsaktivität .....	105
5.1.9.3	PknB phosphoryliert verschiedene Substrate <i>in vitro</i> .....	105
5.1.10	Einfluss der Phosphorylierung auf die enzymatische Aktivität von PurA .....	106
5.1.11	Zusammenfassung I .....	109
5.1.12	Metabolom-Analyse der intrazellulären Metabolite des <i>S. aureus</i> -Stammes 8325 und dessen isogener $\Delta pknB$ - und $\Delta yloO$ -Mutante .....	111
5.1.13	Effekt von PknB auf das Wachstum von <i>S. aureus</i> in CDM.....	115
5.1.14	Untersuchungen der <i>pknB</i> -Expression in verschiedenen <i>S. aureus</i> -Stämmen unter Stressbedingungen .....	118
5.1.14.1	<i>pknB</i> -Expression unter EtOH-Stress in <i>S. aureus</i> 8325 .....	118
5.1.14.2	<i>pknB</i> -Expression unter Hitze-Stress in <i>S. aureus</i> 8325 und COL .....	119
5.1.14.3	<i>pknB</i> -Expression unter NaCl-Stress in <i>S. aureus</i> COL.....	120
5.1.14.4	<i>pknB</i> -Expression unter H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Stress in den <i>S. aureus</i> -Stämmen COL, 8325, SH1000 und 8325-4 .....	121
5.1.15	Einfluss von PknB auf die Antibiotikaempfindlichkeit .....	122
5.1.16	Untersuchungen zum Einfluss von PknB auf die Zellmorphologie und Zellwandstruktur .....	124
5.1.17	Detektion von extrazellulärem PknB .....	126
5.1.18	Zusammenfassung II .....	128
<b>5.2</b>	<b>Charakterisierung der Ser/Thr-Proteinphosphatase YloO (SA1062) in <i>S. aureus</i> .....</b>	<b>129</b>
5.2.1	Herstellung einer <i>yloO</i> -Deletionsmutante im <i>S. aureus</i> -Stamm 8325 .....	129
5.2.2	Untersuchungen zur Expressionskinetik von <i>yloO</i> in <i>S. aureus</i> 8325 .....	131
5.2.3	Phänotypische Charakterisierung von 8325 $\Delta yloO$ .....	132
5.2.4	Untersuchung der Hämolyseexpression ( <i>hla</i> , <i>hlg</i> ) in 8325 $\Delta pknB$ und 8325 $\Delta yloO$ ..	134
5.2.5	Microarray-basierte vergleichende Transkriptom-Analyse von <i>S. aureus</i> 8325 und der 8325 $\Delta yloO$ -Mutante .....	135
5.2.6	YloO besitzt eine <i>in vitro</i> -Phosphataseaktivität .....	140
5.2.7	Zusammenfassung III .....	141
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>142</b>
6.1	<b>PknB besitzt die typische Domänenstruktur bakterieller Ser/Thr-Proteinkinasen.....</b>	<b>142</b>
6.2	<b>Biochemische Charakterisierung von PknB .....</b>	<b>143</b>
6.3	<b>PknB beeinflusst die Zellwandsynthese von <i>S. aureus</i> .....</b>	<b>146</b>
6.4	<b>PknB phosphoryliert Enzyme der zentralen Stoffwechselwege .....</b>	<b>152</b>
6.5	<b>PknB reguliert die <i>de novo</i>-Purinbiosynthese .....</b>	<b>156</b>
6.6	<b>PknB beeinflusst den Zitratzyklus und die Glutamat-Synthese.....</b>	<b>160</b>
6.7	<b>Der Einfluss von Stressfaktoren auf die <i>pknB</i>-Transkription.....</b>	<b>162</b>
6.8	<b>PknB phosphoryliert eukaryotische Peptide.....</b>	<b>162</b>
6.9	<b>Stp (SA1062) ist eine Ser/Thr-Proteinphosphatase aus der PPM-Familie.....</b>	<b>164</b>
6.10	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>170</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>171</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>182</b>
8.1	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>182</b>
8.2	<b>SAM-Plot der Transkriptom-Analyse 8325<math>\Delta pknB</math> mittels SAM („significance analysis of microarray“).....</b>	<b>183</b>

## 1.1 Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* hat sich in den letzten Jahren als bedeutender nosokomialer Erreger etabliert, der eine Vielzahl von Infektionen im Menschen hervorruft. Seine herausragende Bedeutung als wichtiger nosokomialer Erreger beruht vor allem auf dem Erwerb multipler Antibiotikaresistenzen sowie seiner hohen genetischen Variabilität. Des Weiteren vermag sich *S. aureus* rasch und effektiv an sich verändernde Umweltbedingungen anzupassen.

Um Änderungen in seiner Umwelt wahrnehmen zu können, benötigt *S. aureus* unterschiedliche Signaltransduktionssysteme. In dieser Arbeit wurde erstmals die Eukaryoten-ähnliche Serin/Threonin-Proteinkinase (STPK) PknB umfassend charakterisiert. Die posttranslationale Proteinmodifikation mittels Phosphorylierung spielt sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten eine wichtige Rolle. Man glaubte lange, dass die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten ein nur auf Eukaryoten beschränkter Regulationsmechanismus ist. Dagegen wurde die Phosphorylierung an Histidin- und Aspartatresten durch die Zweikomponenten-Systeme allein den Prokaryoten zugeordnet. Die Genomanalysen der letzten Jahre identifizierten jedoch STPKs und Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (STPP) in nahezu allen prokaryotischen Genomen. Auch *S. aureus* codiert für eine STPK, die eine hohe Homologie zu den beschriebenen STPKs aufweist. In dieser Arbeit wurden mittels Microarray-Analyse einer  $\Delta pknB$ -Mutante im Stamm 8325 erste Hinweise zur Funktion von PknB als Regulator der Zellwandsynthese sowie zentraler Stoffwechselwege gewonnen. Die vergleichende Transkriptom-Analyse ergab eine erniedrigte Expression der Gene der *de novo*-Purinbiosynthese. Weiterhin konnte eine verstärkte Expression der für das Zweikomponenten-System VraSR codierenden Gene ermittelt werden. Interessanterweise konnte ebenfalls eine verstärkte Expression von zehn Genen des VraSR-Regulons, die eine wichtige Rolle in der Zellwandsynthese einnehmen, detektiert werden. Außerdem ergaben die Transkriptomstudien, dass Gene des Zitratzyklus, des Aminosäuremetabolismus, des Energiemetabolismus und des Lipidmetabolismus in der  $\Delta pknB$ -Mutante verändert exprimiert werden.

Neben der Analyse des Transkriptoms der  $\Delta pknB$ -Mutante im Stamm 8325, wurden als ein Hauptziel dieser Arbeit *in vivo*-Substrate von PknB in den Stämmen 8325,

SH1000 und COL mit Hilfe einer neuen kombinierten 2DGE und Doppelfärbungsmethode identifiziert. PknB phosphoryliert wichtige Enzyme der Glykolyse sowie Chaperone und Enzyme, die an der Transkription und Translation beteiligt sind. Mittels *in vitro*-Kinasereaktionen konnte die Phosphorylierung von sechs Proteinen durch PknB nachgewiesen werden. Außerdem wurde der Einfluss der Phosphorylierung durch PknB auf die enzymatische Aktivität der Adenylosuccinat-Synthase PurA aufgeklärt. Phosphoryliertes PurA war 1,8-fach weniger aktiv als die unphosphorylierte Form. Die Funktion von PknB wurde weiter durch die Analyse des intrazellulären Metaboloms der  $\Delta pknB$ -Mutante im Stamm 8325 charakterisiert. PknB konnte in dieser Arbeit außerdem als funktionelle STPK beschrieben werden, die eine zeit- und  $Mn^{2+}$ -abhängige Kinaseaktivität besitzt. Die Threoninreste T164 und T166 wurden als die für diese Aktivität entscheidenden Aminosäurereste identifiziert. Des Weiteren lieferte die Transelektronenmikroskopie Hinweise auf eine veränderte Zellwandstruktur der  $\Delta pknB$ -Mutante im Stamm 8325.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die zu PknB korrespondierende Ser/Thr-Phosphatase Stp mit Hilfe der kompetitiven Microarray-Analyse charakterisiert. Dazu wurde das für Stp codierende Gen *stp* (bzw. *yloO*, SA1062) im Stamm 8325 deletiert. Es konnte ebenfalls eine verringerte Expression der Gene der *de novo*-Purinbiosynthese ermittelt werden. Die Expression von elf Genen die in der Kapselpolysaccharid-Synthese eine Rolle spielen war ebenfalls deutlich erniedrigt. Des Weiteren konnte eine veränderte Expression von für Transportproteine codierende Gene in der  $\Delta yloO$ -Mutante beobachtet werden. Die RT-PCR-Analyse zeigte die gemeinsame Organisation von *yloO* und *pknB* in einem Operon. Zu diesem gehören ebenfalls die „upstream“ gelegenen ORFs SA1058 bis SA1061. Außerdem konnte mittels RT-PCR-Analyse eine verringerte *hla*- und *hlg*-Expression in  $\Delta yloO$  gezeigt werden. Die Phosphatase wurde weiterhin durch die Erstellung des intrazellulären Metaboloms der  $\Delta yloO$ -Mutante charakterisiert.

Diese neuen Erkenntnisse zur Funktion und Regulation der STPK PknB und der korrespondierenden STPK Stp tragen wesentlich zum Verständnis der Signaltransduktion in *S. aureus* bei. Sie bilden eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Rolle der Serin- und Threonin-Phosphorylierung in *S. aureus* und helfen den Metabolismus dieses wichtigen nosokomialen Erregers sowie dessen Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Umweltbedingungen besser zu verstehen.

## 1.1 Summary

During the last decades, *Staphylococcus aureus* has been established as a predominant cause of nosocomial infections. The success of *S. aureus* as a leading cause of nosocomial infections is due to the acquisition of multiple resistances to antibiotics as well as its high genotypic variability. Furthermore, *S. aureus* is able to adapt fastly and effectively to changing environmental conditions.

*S. aureus* needs effective signal transduction systems to be able to sense a changing environment. In this work we characterize for the first time the regulatory ser/thr protein kinase PknB. The posttranslational protein modification via phosphorylation plays an important role in eukaryotes as well as in prokaryotes. The phosphorylation of proteins on serine, threonine, and tyrosine residues was originally thought to be a mechanism of signal sensing and translation only restricted to eukaryotes. In contrast, prokaryotes were thought to achieve signal transduction exclusively via the phosphorylation of histidine and aspartate residues by using two-component systems. However, recent bacterial genome sequencing identified STPKs and STPPs in almost all bacterial genomes. *S. aureus* also encodes a STPK, which shows high similarity to the described STPKs. In this study the putative function of PknB as a regulator of cell wall-synthesis as well as central metabolic pathways was analysed by a competitive microarray approach. The generation of the transcriptome of  $\Delta pknB$ -mutant in strain 8325 showed a down regulation of genes of the *de novo* purine biosynthesis. Furthermore, a higher transcription of the two-component system VraSR encoding genes was detected. Interestingly, 10 genes of the VraSR-regulon were also higher expressed in  $\Delta pknB$ . Genes of central metabolic pathways, like citrate cycle, amino acid metabolism, energy metabolism, and lipid metabolism showed also a different expression profile.

The main goal of this study was the identification of *in vivo* substrates of PknB in the strains 8325, SH1000 and COL. Therefore, a new method was applied using a combination of 2DGE and a double staining technique. The results indicate that PknB phosphorylates important enzymes of glycolysis as well as chaperons and enzymes involved in transcription and translation. We were able to identify the phosphorylation of six proteins via *in vitro* kinase assays. Additionally, the impact of PknB

phosphorylation on the enzymatic activity of the adenylosuccinate synthase PurA was detected. PknB phosphorylation inhibits PurA activity 1.8-fold. The function of PknB was further characterized by analysing the intracellular metabolome of the  $\Delta pknB$ -mutant of strain 8325. The results of *in vitro* kinase assays reveal a time and  $Mn^{2+}$ -dependent kinase activity of PknB. As important amino acid residues for this activity could be detected T164 and T166. Furthermore, results from transelectron microscopy support the idea of an impact of PknB on cell wall synthesis.

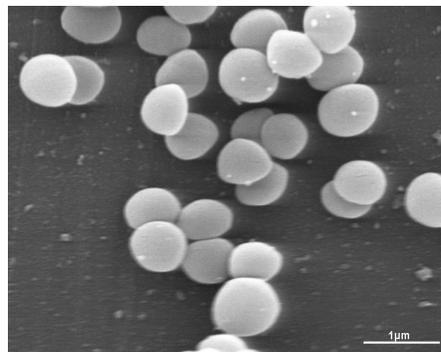
The second part of this work focused on the characterisation of the PknB corresponding ser/thr phosphatase Stp by microarray analysis. Therefore, the coding sequence of *stp* (*yloO*) was deleted in strain 8325. The transcriptome analysis showed a down regulation of genes of the *de novo* purine biosynthesis in  $\Delta yloO$  as well as a significant lower expression of 11 genes involved in the synthesis of capsular polysaccharides. Furthermore, a changed expression of genes encoding transport proteins was detected in  $\Delta yloO$ . In order to elucidate the operon organisation of the genes *stp* and *pknB*, RT-PCR-analysis was performed. The results indicate a co-transcription of the two genes together with the upstream located ORFs SA1058-SA1061. RT-PCR analysis also showed a significant lower expression of the haemolysin encoding genes *hla* and *hlg* in  $\Delta yloO$ . The influence of Stp was further characterized by generating the intracellular metabolome of the deletion mutant.

These results on the function and regulation of the STPK PknB and its corresponding STPP Stp make fundamental contributions to the understanding of signal transduction in *S. aureus* and provide a superior basic for future work aiming at the investigation of the role of serine and threonine phosphorylation in *S. aureus*. In addition, the results contribute to a better understanding of the metabolism as well as the capability of this important nosocomial pathogen to adapt to environmental conditions.

## 2. Einleitung

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

1881 entdeckte Sir Alexander Ogston, ein schottischer Chirurg und Mikrobiologe, Erreger, die er aufgrund ihrer Traubenform (Abb.1) Staphylokokken (griechisch: *staphylè*) nannte. Nur drei Jahre später gelang es dem Mikrobiologen Anton J. F. Rosenbach die Spezies *Staphylococcus aureus* zu isolieren. Mittlerweile kennt man über 30 *Staphylococcus*-Arten und mehr als 20 Unterarten (Kloos & Bannerman, 1994; Martins & Cunha, 2007). Die am besten charakterisierten Arten sind *S. aureus* und *S. epidermidis*.



**Abbildung 1:** Rasterelektronenmikroskopie (REM) des *S. aureus* Wildtypstammes 8325.

*S. aureus* ist ein kugelförmiges, koagulasepositives, grampositives, fakultativ anaerobes Bakterium. Die Größe des Bakteriums liegt üblicherweise zwischen 0,8 und 1,2 µm. *S. aureus* ist unbeweglich und bildet keine Sporen. Typisch ist die gelbe Farbe der Kolonien. *S. aureus* ist ein weit verbreiteter human- und tierpathogener Mikroorganismus, der als Kommensale in der Haut- und Schleimflora von Säugetieren und Vögeln vorkommt (Kloos & Lambe, 1991). Ein breites Spektrum an verschiedenen Virulenzfaktoren ermöglicht es diesem Pathogen unter bestimmten Umständen Infektionen hervorzurufen. Diese durch *S. aureus* verursachten Infektionen lassen sich in drei Kategorien einteilen: (1) lokale, oberflächliche Infektionen wie Wundinfektionen und Abszesse, (2) invasive, systemische Erkrankungen wie Osteomyelitis, Pneumonie, Endokarditis, Mastitis oder Sepsis und (3) toxinvermittelte Erkrankungen (Toxinosen), wie das Staphylococcal-Scaled-Skin-Syndrom (SSSS), das Toxische Schocksyndrom (TSS) (Musser *et al.*, 1990) sowie Nahrungsmittelvergiftungen (LeLoir *et al.*, 2003). Eine Vielzahl von Pathogenitäts-

faktoren ist für Infektionen der beiden ersten Kategorien verantwortlich. Die Expression dieser Pathogenitätsfaktoren unterliegt dabei einer komplexen Regulation, die stark von intra- und extrazellulären Signalen abhängig ist (Lindsay & Foster, 1999; Cheung *et al.*, 2004; Novick, 2003a). Als Regulationselemente spielen hier vor allem das *agr*-System (accessory gene regulator), verschiedene globale Regulationselemente wie SarA (staphylococcal accessory regulator) und SarA-Homologe sowie ArlRS und Rot eine wichtige Rolle (Cheung *et al.*, 2004; Fournier *et al.*, 2001; Novick, 2003a).

Mit Ausnahme der Toxinosen ist die Virulenz von *S. aureus* durch eine Vielzahl von Virulenzfaktoren bedingt. Toxinosen verursachende Toxine sind z.B. das Toxin TSST-1, das das toxische Schocksyndrom verursacht (Bohach *et al.*, 1990), die Toxine Exfoliatin A und B, die das Staphylococcal-Scaled-Skin-Syndrom verursachen und die Enterotoxine A-O, die Nahrungsmittelvergiftungen hervorrufen (Dinges *et al.*, 2000). Man kann die Virulenzfaktoren aufgrund ihrer biologischen Aktivität in drei Kategorien einteilen: (1) zellwandgebundene Proteine, die u.a. die Adhärenz zu Wirtszellen bzw. Wirtsgeweben vermitteln, (2) Proteine, die die Gewebeerstörung und somit die Ausbreitung der Bakterien fördern und (3) Proteine, die die Bakterien vor der Immunabwehr schützen. In den Wirt eingedrungene Bakterien müssen eine geeignete Nische besetzen und die Abwehrmechanismen des Wirtes umgehen können, damit eine Vermehrung und anschließende Verbreitung innerhalb eines Wirtes oder zwischen mehreren Wirten gewährleistet ist. Die Initiation einer Infektion erfolgt durch Bindung an die extrazelluläre Matrix des Wirtes. Dabei vermitteln zellwandgebundene Proteine (Adhäsine) diese erste Bindung. Zu den Adhäsinen zählen u. a. die Fibronektin-bindenden Proteine (FnbA, FnbB), Fibrinogen-bindende Proteine (ClfA/B, FbpA, Fib), Elastin-bindendes Protein (EbpS) oder Collagen-bindendes Adhäsine (Cna). Allgemein werden diese Proteine als MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) bezeichnet (Cheung *et al.*, 2004). Nach erfolgreicher Invasion der Bakterien in das Wirtsgewebe, kommt es bei einer hohen Bakteriendichte zur Aktivierung des *agr*-Systems und damit zur Expression von Toxinen (u.a.  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Hämolyysin; Leukotoxin) und Exoproteinen (u.a. Lipasen, Proteasen, Coagulasen). Aufgrund dieses Mechanismus sind viele *S. aureus*-Infektionen unter anderem mit Gewebeerstörung durch

Nekrosen und der Induktion der Apoptose der Wirtszellen assoziiert (Sinha & Herrmann, 2005; Haslinger-Löffler *et al.*, 2007).

Besonders schwerwiegend sind die Infektionen, die *S. aureus* in immungeschwächten Personen hervorrufen kann. Dabei spielt vor allem die Fähigkeit zur Biofilmbildung eine entscheidende Rolle. *S. aureus* ist in der Lage verschiedene Implantate und Katheter zu kolonisieren und letztlich mit einem Biofilm zu überziehen. Ein weiteres Problem sind immer häufiger auftretende Infektionen durch Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA)-Stämme. Diese sind gegen mehrere Antibiotika-Stoffklassen resistent, was eine erfolgreiche Therapie erschwert. Man spricht hier von den „hospital-acquired“ MRSA-Infektionen (HA-MRSA).

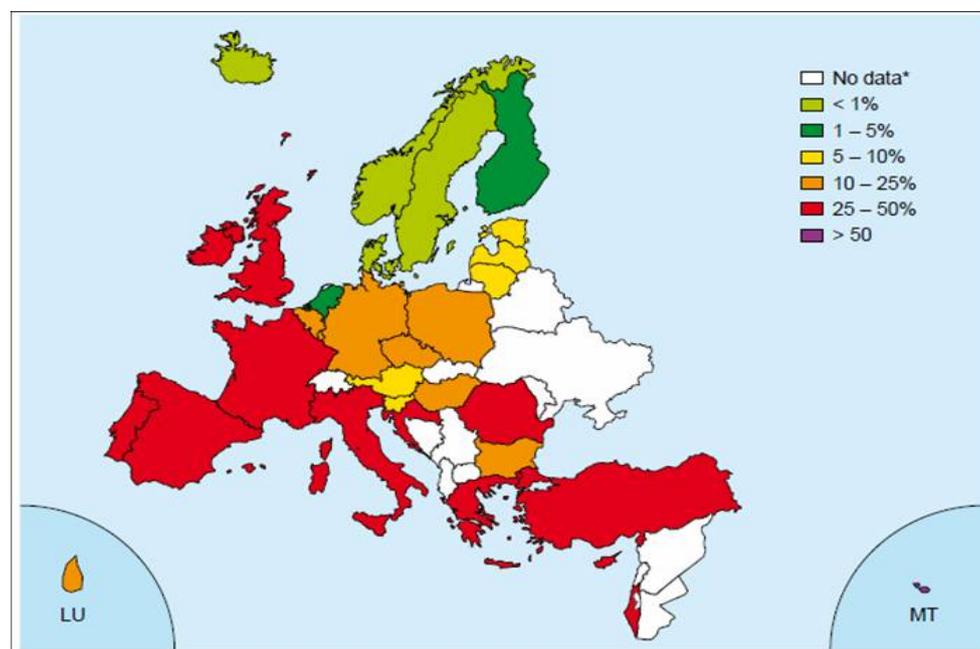
Neben diesen treten in jüngster Zeit auch *S. aureus*-Infektionen in der immunkompetenten Bevölkerung auf. Diese „community-acquired“ MRSA-Infektionen (CA-MRSA) unterscheiden sich von den Infektionen, die in Krankenhäusern erworben werden. Außer gegen  $\beta$ -Lactame sind diese Stämme gegen die meisten Antibiotika empfindlich (Baba *et al.*, 2002; Robinson & Enright, 2004; Holden *et al.*, 2004). Charakteristisch für die CA-MRSA-Stämme ist die Produktion des Panton-Valentine Leukocidins (PVL). Die Expression des PVL-Gens wird verantwortlich gemacht für schwere Hautinfektionen und auch lebensbedrohliche nekrotisierende Lungeninfektionen (Johnsson *et al.*, 2004; Gillet *et al.*, 2002). Dabei sind hier Individuen betroffen, die keine der typischen Risikofaktoren, die im Zusammenhang mit dem Erwerb von HA-MRSA-Infektionen stehen, wie Operationen und längere Krankenhausaufenthalte, aufweisen. So sind diese Infektionen unter anderem bei Kindern, Sportlern und Militärpersonal beschrieben worden (Otto, 2009). Molekulare Typisierungsstudien in den Vereinigten Staaten und Australien haben gezeigt, dass die meisten CA-MRSA-Infektionen von einem bestimmten Pulsfeldtypus hervorgerufen werden. Dabei handelt es sich um zwei Klone, die von der US-amerikanischen Gesundheitsbehörde CDC (Centers of Disease Control and Prevention) als USA300 und USA400 klassifiziert wurden (McDougal *et al.*, 2003). Die molekularen Determinanten, die dem Erfolg des USA300-Klones als Pathogen zugrunde liegen, sind noch nicht ausreichend verstanden. Es wird jedoch aufgrund von Genomvergleichen spekuliert, dass Determinanten wie das oben bereits erwähnte PVL, das auf mobilen genetischen Elementen (MGEs) codiert ist, die

dominierende Rolle bei der Ausbildung der Pathogenität des USA300-Klones spielen. So wurden CA-MRSA-Klone als PVL-positive Stämme beschrieben, die sich weiter durch das Vorhandensein einer *SCCmec* Kasette vom Typ IV auszeichnen (Vandenesch *et al.*, 2003). Interessanterweise wurde in letzter Zeit auch von CA-MRSA-Infektionen berichtet, die von PVL-negativen Stämmen verursacht wurden (Wardenburg *et al.*, 2008; Diep *et al.*, 2008; Diep *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009). Ein weiterer Faktor der zur Pathogenität des USA300-Klones beiträgt ist das „Arginine Catabolic Mobile Element“ (ACME). Auf diesem MGE befindet sich ein zusätzliches *arc*-Gencluster, welches für die Gene *arcRADBC* codiert. Untersuchungen haben gezeigt, dass das ACME-*arcA*-Gen zum Überleben von USA300 auf der Haut beiträgt und einen wichtigen Einfluss bei der Virulenz des Stammes Hautinfektionen hervorzurufen, ausübt (Zhang *et al.*, 2005; Ellington *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse zeigen, dass noch weitere Determinanten zur Evolution der erhöhten Virulenzkapazität von USA300 beitragen und zeigen die Notwendigkeit der Entwicklung von neuen Therapeutika gegen MRSA-Infektionen.

## 2.2 Resistenzentwicklung in *S. aureus*

Die beschriebenen MRSA-Stämme, die vor allem nosokomiale Infektionen hervorrufen, exprimieren eine Vielzahl von Antibiotikaresistenzen. Diese multi-resistenten Keime besitzen die Fähigkeit sehr schnell Resistenzen gegen neue Antibiotika zu erwerben. Dies geschieht unter anderem durch horizontalen Gentransfer, bei dem mobile genetische Elemente (MGEs) eine entscheidende Rolle spielen. Aufgrund des vor allem in Krankenhäusern herrschenden großen Selektionsdrucks, erfolgt die problematische Resistenzentwicklung ziemlich rasch. So wurden bereits zwei Jahre nach der Einführung von Penicillin im Jahr 1944 die ersten Penicillin-resistenten Staphylokokken isoliert (Barber *et al.*, 1948). Mittlerweile sind über 90 % aller klinischen *S. aureus*-Isolate gegenüber Penicillin resistent. Verantwortlich für diese Resistenz sind die Penicillinasen (auch  $\beta$ -Lactamasen genannt) (Projan, 2000). Aufgrund der raschen Ausbreitung Penicillin-resistenter Stämme wurden seit dem Jahr 1959 Penicillinase-stabile  $\beta$ -Lactamantibiotika, wie das Methicillin eingesetzt. Bereits zwei Jahre später, 1961, konnte jedoch der erste Methicillin-resistente *S. aureus*-Stamm isoliert werden (Jevons *et al.*, 1961). Gegenwärtig sind in Deutschland ca. 20 % aller *S. aureus*-Isolate Methicillin-resistent

(GERMAP 2008; Witte *et al.*, 2001). Dabei ist es bedenklich, dass in der kurzen Zeitspanne von 1999-2006 diese Rate um 12 % (8 % auf 20 %) zugenommen hat (EARSS Annual Report 2008; „European Antimicrobial Resistance Surveillance System“). Interessanterweise zeigen die EARSS-Daten, dass die Häufigkeit des Auftretens von MRSA in Deutschland nicht gleichmäßig verteilt ist, sondern dass erhebliche Unterschiede zwischen einzelnen Krankenhäusern bestehen. Mit einer MRSA-Rate von 20 % nimmt Deutschland im Vergleich der europäischen Länder eine mittlere Position ein, wobei in zahlreichen anderen Ländern ebenfalls ein Trend zu steigenden MRSA-Raten zu erkennen ist (EARSS 2008) (Abb. 2).



**Abbildung 2:** EARSS 2008, Anteil der Oxacillin-resistenten *S. aureus* im Jahr 2007. (\* diese Länder lieferten keine Daten oder berichteten von weniger als 10 Isolaten) (EARSS Annual Report 2008).

Verantwortlich für die Methicillin-Resistenz ist ein zusätzliches Penicillin-Bindeprotein (PBP2` oder PBP2a), welches von dem *mecA*-Gen codiert wird und nur eine geringe Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactamverbindungen aufweist. Alle Staphylokokken, die dieses Gen besitzen, sind gegen alle bekannten  $\beta$ -Lactamasen einschließlich der Cephalosporine und Carbapeneme resistent (Hiramatsu *et al.*, 1997; Projan, 2000; Robinson & Enright, 2004). Besonders besorgniserregend ist die zunehmende Resistenzentwicklung gegen Vancomycin. Dieses Glykopeptid-Antibiotikum gilt neben Linezolid und Synercid als eine der letzten verbleibenden Therapiemöglichkeiten gegen MRSA-Stämme und wird als sog. Reserveantibiotikum

bezeichnet. Das *mecA*-Gen befindet sich auf einer mobilen, chromosomalen Kasette, der SCC*mec*-Kasette (Staphylococcal Cassette Chromosome). Es sind mittlerweile sieben SCC*mec*-Haupttypen beschrieben worden (Deurenberg & Stobberingh, 2008; Ito *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2003; Baba *et al.*, 2002; Holden *et al.*, 2004). Neben der Methicillin-Resistenz sind auf den SCC*mec*-Elementen oftmals auch Resistenzen gegen weitere Antibiotikaklassen codiert. Zum Beispiel enthält die SCC*mec*-Kasette des Stammes MRSA252 neben dem *mecA*-Gen auch ein integriertes Plasmid pUB110, das die Resistenzgene für die Bleomycin- und Kanamycin-Resistenz trägt. Weiterhin findet man das Transposon Tn554, das für die Resistenz gegen Erythromycin und Spectinomycin verantwortlich ist sowie ein weiteres Transposon Tn552 mit den induzierbaren  $\beta$ -Lactamasegenen *blaI*, *blaR* und *blaZ*. Zusätzlich sind chromosomale Resistenzdeterminanten im Stamm MRSA252, wie *norA* vorhanden. Das *norA*-Gen codiert für eine Efflux-Pumpe, die Resistenz gegenüber Fluoroquinolonen vermittelt (Holden *et al.*, 2004).

Besonders problematisch ist die Ausbreitung Vancomycin-resistenter Stämme. Vancomycin gilt als Reserveantibiotikum bei MRSA-Infektionen. Im Jahr 1997 traten die ersten Staphylokokken mit verringerter Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin in Japan und kurze Zeit später auch in den USA auf (Hiramatsu *et al.*, 1997). Im Jahr 2002 wurde dann erstmals vom Auftreten von *S. aureus* mit hoher Vancomycin-Resistenz in den USA berichtet. Diese Stämme enthielten neben dem für die Methicillin-Resistenz verantwortlichen Gen *mecA* zusätzlich die Vancomycin-Resistenzdeterminante *vanA* aus Enterokokken (Miller *et al.*, 2002a). Gegen Vancomycin-resistente MRSA sind häufig nur noch wenige Antibiotika wirksam. Es stehen jedoch mit Linezolid, Synercid, Daptomycin und Tigecyclin eine Reihe von Therapieoptionen mit hoher Wirksamkeit gegen MRSA und Vancomycin-resistente MRSA zur Verfügung (GERMAP Witte, 2008; LaPlante & Rybak, 2004; Lundstrom *et al.*, 2004; Cha *et al.*, 2003). Vereinzelt gibt es bereits Linezolid- und Synercid-resistente *S. aureus*-Stämme (Tsiodras *et al.*, 2001; Hershberger *et al.*, 2004). Ein neues viel versprechendes Antibiotikum aus der Gruppe der Diaminopyrimidine stellt Iclaprim dar. Dieses soll gegen Hautinfektionen hervorgerufen durch Methicillin-, Vancomycin-, oder Glykopeptid-resistente MRSA-Stämme in Krankenhäusern eingesetzt werden (Morgan *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2003). Es stehen jedoch noch weitere klinische Studien, bis zur Zulassung dieses Antibiotikums, aus.

Die rasche Resistenzentwicklung der Staphylokokken gegen eine Vielzahl von Antibiotikaklassen, verdeutlicht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Antibiotika, wobei ein Ansatz die Suche nach möglichen neuen Angriffsziele in der Bakterienzelle darstellen kann. Interessante Angriffsziele sind dabei bakterielle Strukturen, die über mehrere Spezies verbreitet sind, um ein Antibiotikum mit breitem Spektrum zu erhalten. Die vollständige Sequenzierung zahlreicher Bakteriengenome ermöglicht die Identifikation konservierter Gene durch subtraktive Genomanalyse. Bevorzugte Angriffsziele sind Gene, die für Proteine kodieren, welche essenziell für das Wachstum und das Überleben einer Vielzahl von Bakterienspezies sind. Daneben sind Faktoren von Interesse, die entweder direkt oder indirekt an der Etablierung einer Infektion beteiligt sind. Dabei handelt es sich neben Virulenzfaktoren vor allem um Proteine, die eine Rolle in der bakteriellen Physiologie und Stressantwort ausüben und für die Anpassung innerhalb des Wirtes essenziell sind. Ein putatives Angriffsziel stellt auch die Ser/Thr-Proteinkinase PknB von *S. aureus* da. Es konnten mittels Genomanalysen Gene für putative STPKs und STPPs in zahlreichen Bakteriengenomen identifiziert werden. STPKs und STPPs spielen eine wichtige Rolle bei Prozessen wie Zellteilung, dem Zellwandaufbau und der Stressantwort sowie der Etablierung der Virulenz. Die STPK PknB wurde bislang noch nicht in *S. aureus* charakterisiert.

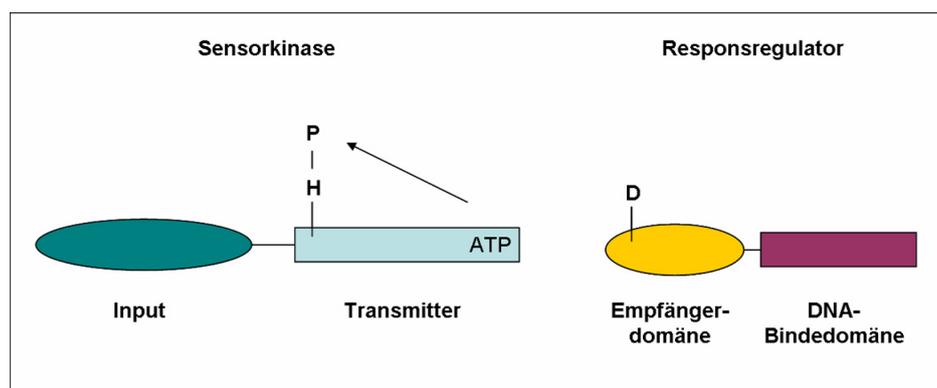
## **2.3 Ser/Thr-Proteinkinasen und Ser/Thr-Proteinphosphatasen in Bakterien**

### **2.3.1. Proteinkinasen**

Um überleben zu können müssen alle lebenden Organismen fähig sein Informationen über ihre Umwelt wahrzunehmen und weiterzuverarbeiten. Eine Möglichkeit der Anpassung an externe Bedingungen kann dabei die reversible Phosphorylierung von Proteinen darstellen. Dieser Mechanismus ermöglicht dem Organismus nicht nur die Regulation der Proteinfunktion sondern auch zelluläre Prozesse als Antwort auf dynamische interne und externe Umweltstimuli zu regulieren. So regulieren z.B. Prokaryoten mit Hilfe der posttranslationalen Modifikation von Proteinen die Enzymaktivität ebenso wie die Synthese bestimmter Enzyme und Aminosäuren. Um veränderte Umweltbedingungen wahrnehmen zu können und sich schnell und vor allem effektiv an sich veränderte Umwelt-

bedingungen, wie ein plötzlich limitiertes Nahrungsangebot adaptieren zu können, besitzen Prokaryoten membrangebundene und intrazelluläre Sensoren sowie ihre Transportsysteme. An diese Sensoren sind Signaltransduktionskaskaden und globale regulatorische Netzwerke gekoppelt, die den Stoffwechsel, die Zelldifferenzierung und verschiedene andere Netzwerke kontrollieren (Foussard *et al.*, 2001). Die posttranslationale Modifikation mittels Phosphorylierungskaskaden ist dabei eine wichtige Möglichkeit der Kontrolle dieser unterschiedlichen Prozesse. Hierbei wird ein extrazelluläres Signal in eine zelluläre Antwort umgesetzt, indem eine spezifische Proteinkinase phosphoryliert wird, die ihrerseits die Phosphorylierung regulatorischer Proteine bewirkt (Lengler *et al.*, 1999).

In Prokaryoten findet die Signalübertragung am häufigsten durch die Zweikomponenten-Systeme (TCS; two-component system) statt. Ein typisches TCS besteht aus einer Sensorkinase, die häufig in der Bakterienmembran lokalisiert ist (Stock *et al.*, 2000) und die als primäres signaltransduzierendes Protein das externe Signal wahrnimmt. Die Aktivierung dieser Kinase erfolgt durch die Hydrolyse von ATP, wodurch die Autophosphorylierung (*cis*-Phosphorylierung) an einem Histidinrest erzeugt wird. Die Phosphatgruppe wird dann auf einen Aspartatrest des Responseregulators übertragen. Dieser wirkt direkt auf die Transkription der Zielgene, die aktiviert oder reprimiert wird. Sensorkinase und Responseregulator verfügen über hoch konservierte Domänen (Abb.3) (Foussard *et al.*, 2001).

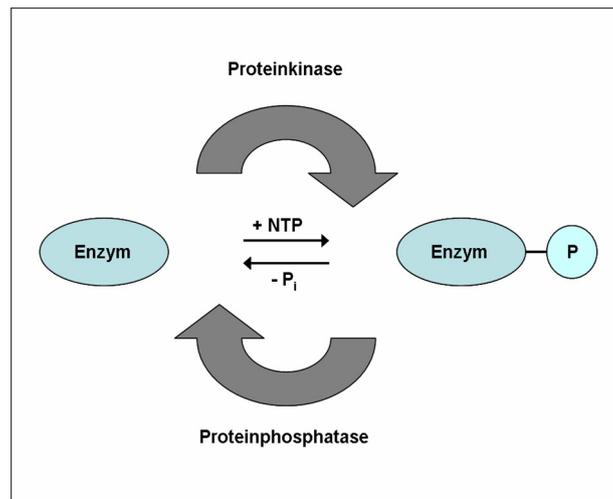


**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der konservierten Domänen in Sensorkinase und Responseregulator. H: Histidin-Rest; D: Aspartat-Rest; P: Phosphat-Rest (modifiziert nach Foussard *et al.*, 2001).

In *S. aureus* wurden 16 bis 18 TCSs je nach Stammhintergrund mittels Genomanalysen identifiziert (Kuroda *et al.*, 2001). Diese regulieren typischerweise eine Vielzahl an zellulären Vorgängen, wie z.B. die Anpassung an Stressbedingungen (z.B. osmotischer Stress, Nährstoffmangel), Prozesse der Zellwandbiosynthese (VraSR; Kuroda *et al.*, 2003) und die Expression zahlreicher Virulenzfaktoren (AgrCA, AriRS, SaeRS, SrrAB) (Giraudou *et al.*, 1997; Novick & Muir, 1999; Fournier & Hooper, 2000; Yarwood *et al.*, 2001). Ein weiteres Beispiel für die Rolle der posttranslationalen Proteinmodifikation mittels Phosphorylierung stellt die Katabolitrepression dar. Hier findet die Phosphorylierung des Phosphotransfer-Proteins HPr an einem Histidin- oder auch Serinrest statt, welches dann mit dem regulatorischen Protein CcpA (catabolite control protein) interagiert (Lengler *et al.*, 1999).

In Eukaryoten sind ca. 30 % aller zellulären Proteine phosphoryliert (Raggiaschi *et al.*, 2005). Mehrere Aminosäurereste können phosphoryliert werden, wodurch die Proteinfunktion insgesamt beeinflusst werden kann. Die Signalübertragung findet in Eukaryoten ebenfalls mittels membranständigen Rezeptoren statt. Am häufigsten erfolgt die Phosphorylierung jedoch an den drei Aminosäureresten Serin, Threonin und Tyrosin. Dabei spielen die sog. Serin/Threonin- und Tyrosin-Proteinkinasen zusammen mit ihren verwandten Phosphatasen die Hauptrolle. Allein im menschlichen Genom sind über 500 dieser Signalproteine enthalten (Manning *et al.*, 2002).

Kinasen sind Enzyme, die in ihrer Eigenschaft als Phosphotransferasen, Phosphatreste auf bestimmte Aminosäuren von Proteinen übertragen. Ihre Gegenspieler sind die Phosphatasen, welche die kovalent gebundenen Phosphatreste wieder hydrolytisch abspalten können. Durch diesen Vorgang, die reversible Phosphorylierung von Proteinen, wird eine Vielzahl von Vorgängen in der eukaryotischen Zelle ausgelöst oder auch beendet. Durch das An- und Abhängen des Phosphatrestes ändert sich die Konformation eines Enzyms, wodurch es entweder aktiviert oder deaktiviert wird (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Reversible Phosphorylierung. Ein Protein wird mit Hilfe einer STPK phosphoryliert. Durch Konformationsänderung wird das Enzym aktiviert bzw. deaktiviert. Die Dephosphorylierung mittels STPPs versetzt das Enzym wieder in seinen Ausgangszustand.

Lange glaubte man, dass diese Art der Signalübertragung einen nur bei Eukaryoten vorkommenden Weg darstellt (Alberts *et al.*, 1995; Hanks *et al.*, 1988; Hunter, 1995) und, dass in Prokaryoten nur die Phosphorylierung von Histidin- und Aspartatresten vorkommt. In den letzten zehn Jahren ließ jedoch die Genomsequenzanalyse deutlich werden, dass auch in Bakterien die Ser/Thr-Proteinkinasen (STPK) und -Proteinphosphatasen (STPP) eine wichtige Rolle spielen. Sie sind weit verbreitet und weisen hohe Homologien untereinander auf (Kennelly, 2002). Somit ist offensichtlich, dass die Signaltransduktion dieser Organismen nicht einzig und allein auf den TCSs beruht. *Myxococcus*, *Mycobacteria*, *Corynebacterium* und *Bacillus* codieren mehrere STPKs und STPPs, während andere Bakterien wie Yersinien, Streptokokken und Staphylokokken nur eine einzelne funktionelle STPK und STPP codieren. Interessanterweise codieren einige Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme noch eine zweite STPK. Dieses 502 Aminosäure große Protein ist auf einer SCC*mec*-Kassette codiert und enthält die katalytische Domäne STYKc, jedoch keine extrazellulären PASTA-Domänen.

Die erste STPK (Pkn1) wurde im Jahre 1991 von Munoz-Dorado *et al.* in *Myxococcus xanthus* kloniert. Sie ist ebenso wie die anderen in *M. xanthus* beschriebenen STPKs (Pkn5, 6 und 9) an der Bildung der Fruchtkörper beteiligt (Zhang *et al.*, 1996; Hanlon *et al.*, 1997). Pkn2 ist die am besten charakterisierte STPK in *M. xanthus*. Die Inaktivierung von Pkn2, wie auch von Pkn9, führt zu einer

verminderten Sporenbildung (Hanlon *et al.*, 1997; Udo *et al.*, 1995). Mit Hilfe der Genomsequenzierung konnten in *E. coli* drei putative Proteinkinasen identifiziert werden. Eine Kinase mit Proteinkinase C-Aktivität (Norris *et al.*, 1991) sowie die Isocitratdehydrogenase-Kinase/Phosphatase (Oudot *et al.*, 2001) und die erst kürzlich beschriebene YihE-Kinase (Zheng *et al.*, 2007). Im grampositiven Bakterium *B. subtilis* wurden bislang zwei STPKs beschrieben: PrkC und PrkD (Shi *et al.*, 1998). Dabei zeigt PrkC strukturelle Ähnlichkeit mit dem eukaryotischen TGF $\beta$  (tumor-growth-factor  $\beta$ ). Die Deletion dieser STPK führte zu einer verminderten Biofilm- und Sporenbildung in *B. subtilis* (Madec *et al.*, 2002). Auch in *Streptococcus pneumoniae* konnte eine STPK (StkP) identifiziert werden. Die mit einer Proteinphosphatase PhpP cotranskribierte Proteinkinase phosphoryliert *in vitro* die Phosphoglucosamin-Mutase GlmM, die den ersten Schritt bei der Synthese von UDP-N-Acetylglucosamin katalysiert (Nováková *et al.*, 2005). Für Stk1 aus *Streptococcus agalactiae* konnte eine regulatorische Rolle in der Purinbiosynthese des Bakteriums nachgewiesen werden. Stk1 phosphoryliert ein Schlüsselenzym der Purinbiosynthese, die Adenylosuccinat-Synthase PurA, wodurch dessen enzymatische Aktivität inhibiert wird und letztlich die Synthese von A-Nukleotiden kontrolliert werden kann (Rajagopal *et al.*, 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die *stk1*-Deletionsmutante in einem Sepsismodell mit neonatalen Ratten attenuiert war (Rajagopal *et al.*, 2003).

Am besten untersucht sind jedoch die STPKs des Pathogens *Mycobacterium tuberculosis*. Es codiert elf dieser STPKs, die *pknA* bis *pknL* genannt wurden. Lediglich zwei, PknG und PknK, können aufgrund ihrer Domänenstruktur als zytoplasmatische Proteine bezeichnet werden, während alle anderen aufgrund ihrer N-terminalen Transmembrandomäne Rezeptor-ähnliche Proteine darstellen (Av-Gay *et al.*, 2000). Die Gene für die Proteinkinasen *pknA* und *pknB* sind Teil eines Operons, das Gene codiert, die bei der Kontrolle der Zellform und der Zellwandsynthese eine Rolle spielen (Kang *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dieser Gene zu einer Verlangsamung des Wachstums und zur Veränderung der Zellmorphologie führt. Die konstitutive Expression von *pknA* in *E. coli* führte zu einem verstärkten Längenwachstum der Zellen (Chaba *et al.*, 2002). PknG, eine weitere STPK aus *M. tuberculosis*, scheint bei der Stressantwort eine Rolle zu spielen. Die *pknG*-Deletionsmutanten zeigten eine verminderte Wachstums-

fähigkeit in der stationären Phase und in Minimalmedium. Außerdem akkumuliert sie Glutamat und Glutamin (Cowley *et al.*, 2004). Für die Analyse der STPK PknF verwendeten Deol *et al.* (2005) *pknF*-Antisense-mRNA. Interessanterweise konnte eine erhöhte D-Glucose-Aufnahme aufgrund der Expression der *pknF*-Antisense-mRNA in *M. tuberculosis* beobachtet werden. Die Expression dieser Proteinkinase in *M. smegmatis* führte zu einer reduzierten Wachstumsrate und zu einem Anschwellen und Verkürzen von Zellen mit Einschnürungen. Es wird daher vermutet, dass PknF eine direkte oder indirekte Rolle bei der Regulation des Glucose-Transports, des Zellwachstums und der Septumbildung in *M. tuberculosis* spielt. Gefestigt wird diese Annahme auch durch die Untersuchung der putativen Substrate von PknF. So konnte gezeigt werden, dass PknF mit einem ABC-Transporter (Rv1747) interagiert, der im Genom neben *pknF* lokalisiert ist und diesen phosphoryliert (Deol *et al.*, 2005). Neben diesen STPKs wurde auch PknH aus *M. tuberculosis* bereits beschrieben. Auch hier handelt es sich um eine transmembrane STPK. Diese wird unter bestimmten Stressbedingungen, wie pH-Stress und Hitze-Schock vermindert transkribiert (Sharma *et al.*, 2004). Außerdem phosphoryliert PknH EmbR, ein Protein, das bei der Regulation der Gene beteiligt zu sein scheint, die für die Arabinosyl-Transferase codieren (Molle *et al.*, 2003). Im Vergleich zu den teilweise im Detail untersuchten Signaltransduktionskaskaden in Eukaryoten, sind in Prokaryoten nur relativ wenige Substrate der bakteriellen STPKs bekannt. Untersuchungen in *M. tuberculosis* zeigten jedoch, dass putative Substrate meist eine FHA-Domäne (forkhead-associated domain) besitzen. Diese FHA-Domänen sind ubiquitäre Phospho-Threonin-Peptid-Motive, die bei der über STPKs vermittelten Signaltransduktion in Eukaryoten eine entscheidende Rolle spielen (Pallen *et al.*, 2002). So weisen EmbR und Rv1747, die von PknH bzw. PknF phosphoryliert werden, FHA-Domänen auf. PknB phosphoryliert *in vitro* ebenfalls einige Substrate die FHA-Domänen aufweisen (Grundner *et al.*, 2005). Die detaillierten Untersuchungen zu möglichen Substraten der bakteriellen STPKs stehen aber noch am Anfang.

Eine wichtige Rolle spielen die STPKs auch bei der Virulenz verschiedener Humanpathogene. So konnte gezeigt werden, dass die STPKs der Mycobakterien (PknG) (Walburger *et al.*, 2004) und Yersinien (YpkA) sekretiert werden und damit Wirtszellfunktionen regulieren können (Galyov *et al.*, 1993; Wiley *et al.*, 2006;

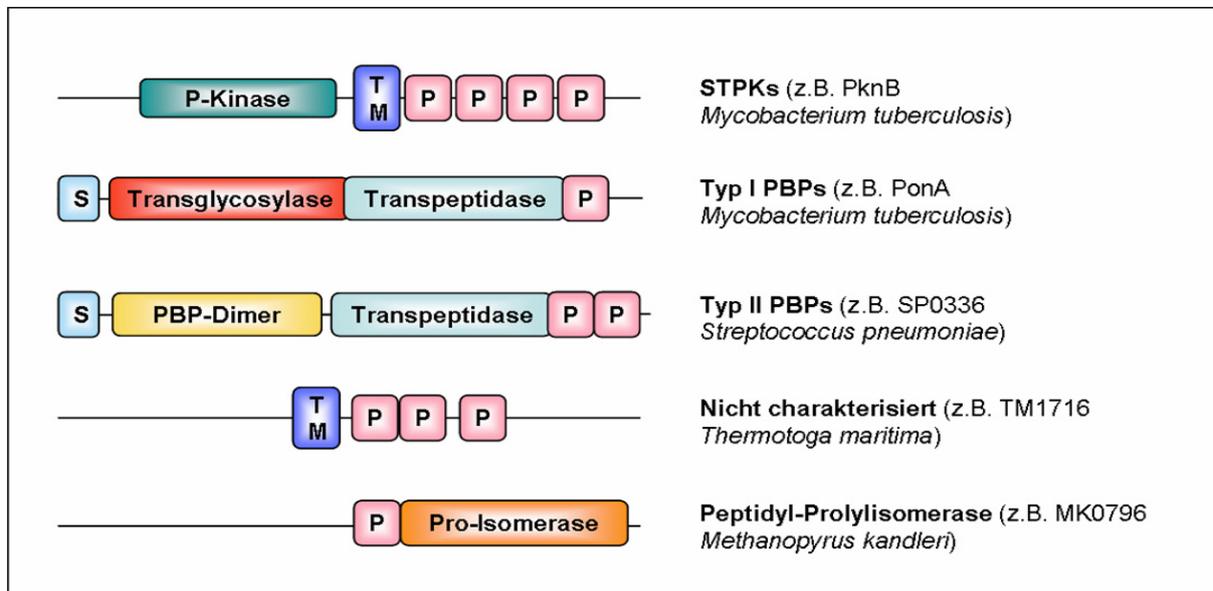
Navarro *et al.*, 2007). PknG ermöglicht es Mycobakterien intrazellulär in Makrophagen zu überleben, indem die Kinase nach der Sekretion in den Makrophagen die Fusion von Phagosomen und Lysosomen verhindert (Walburger *et al.*, 2004). Yersinien dagegen injizieren mit Hilfe eines Typ III-Sekretionssystems die STPK YpkA in das Zytosol des Wirtes. Dadurch werden u. a. mehrere Gαq-Signalwege inhibiert. Die Phosphorylierung findet dabei im GTPase-Loop von Gαq statt. YpkA stellt damit eine wichtige Virulenzdeterminante dar, die eine Rolle in der Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts und der Inhibierung der Phagozytose spielt (Navarro *et al.*, 2007).

Die Ergebnisse der Untersuchungen der oben beschriebenen STPKs in den verschiedenen Bakterienarten lassen vermuten, dass STPKs generell an Prozessen wie Zellteilung, dem Zellwandaufbau und der Zelldifferenzierung beteiligt sind. Auch geben diese Beobachtungen einen Hinweis auf eine Rolle der Proteinkinasen bei der Pathogenität bestimmter Bakterien. Um einen Überblick über das Phosphorylierungsmuster in Bakterien zu erhalten, wurden jüngst Phosphoproteom-Analysen in verschiedenen Prokaryoten durchgeführt. Dazu wurden meist mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2DGE) und anschließender MS-Analyse die an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten phosphorylierten Proteine eines Organismus identifiziert. Das erste Phosphoproteom wurde von *Corynebacterium glutamicum* erstellt (Bendt *et al.*, 2003). Die meisten identifizierten Phosphoproteine sind dabei Enzyme zentraler Stoffwechselwege wie der Glykolyse (Enolase, Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase, GAP-Dehydrogenase, Pyruvatdecarboxylase, Pyruvatkinase), des Zitratzykluses und des Fettsäuremetabolismus. Außerdem wurden Chaperone (GroEL, DanK) und Komponenten des Proteinbiosyntheseapparates (Translationelongationsfaktoren und ribosomale Proteine) gefunden. Im grampositiven Modellbakterium *B. subtilis* konnten mehr als 100 Phosphorylierungen an 78 Proteinen identifiziert werden (Macek *et al.*, 2007; Eymann *et al.*, 2007). Diese Phosphoproteine spielen eine Rolle in vielen verschiedenen Stoffwechselprozessen, sind aber am häufigsten am Carbohydratmetabolismus beteiligt. So konnten Phosphorylierungsstellen an nahezu allen Enzymen der Glykolyse und des Zitratzykluses detektiert werden, ebenso wie an einigen Kinasen und Mitgliedern von Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferase-Systemen (PTS). Dieses Muster lässt sich auch bei der Betrachtung des Phosphoproteoms des gram-

negativen Bakteriums *E. coli* erkennen (Macek *et al.*, 2008). Auch das Phosphoproteom von *Lactococcus lactis* ist mit den genannten vergleichbar. So wurden 73 Phosphorylierungsstellen verteilt auf 63 verschiedene Proteine detektiert (Soufi *et al.*, 2008). Der evolutionäre Vergleich und die Konserviertheit von Phosphorylierungsstellen in verschiedenen Bakterien lassen vermuten, dass die Mehrheit der detektierten Phosphorylierungsstellen spezies-spezifisch ist und sich damit vermutlich co-evolutionär mit der Anpassung der Bakterien an ihre jeweilige ökologische Nische entwickelt haben.

Welche Signale in das Innere der Bakterienzelle geleitet werden und welche Stoffwechselwege und strukturellen Veränderungen dann in der Zelle aktiviert oder auch inhibiert werden, ist bis jetzt noch relativ unklar. Man konnte bislang nur über die Funktion der bakteriellen Ser/Thr-Kinasen aufgrund der Analyse ihrer Struktur spekulieren. So fand Yeats *et al.* (2002) heraus, dass es Übereinstimmungen mit den in STPKs und in „high molecular weight“-Penicillin-Bindeproteinen (PBPs) vorkommenden Domänen gibt. Hier wurde das STPK-Homolog PknB aus *Streptomyces coelicolor* untersucht. Dabei konnte C-terminal eine neue Domäne identifiziert werden, die als PASTA-Domäne (penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated domain) bezeichnet wurde. Diese Domäne kann einzeln oder in mehreren Kopien vorliegen (Abb. 5). Jedes PASTA-Repeat besteht aus einer kleinen globulären Falte, die aus je drei  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix aufgebaut ist, wie Kristallstrukturanalysen des Penicillin-Bindeproteins PBP2X aus *S. pneumoniae* gezeigt haben (Gordon *et al.*, 2000). Dies weist auf eine hohe strukturelle Konserviertheit der PASTA-Domänen hin. Durch die Untersuchung von PBP2X erhielt man auch Hinweise auf die Rolle der PASTA-Domänen. Die „high molecular weight“-Penicillin-Bindeproteine sind für den Aufbau und die Reparatur der bakteriellen Zellwand verantwortlich. Sie verknüpfen die Peptidoglykaneinheiten an der Oberfläche der Zellwand. Dabei erkennt die Transpeptidase-Untereinheit das vorletzte D-Alanin (des D-Alanyl-D-Alanin-Restes) des Peptidoglykanvorläufers über den Serinrest der aktiven Seite. Dieses Acetyl-Enzym-Zwischenprodukt reagiert nun mit der Seitenkette eines anderen unverknüpften Peptidoglykans (z.B. Lysin-Rest), wodurch die Verknüpfung erfolgt. Die Bakterienzelle ist schließlich von dem Mureinsacculus umgeben. Es konnte beobachtet werden, dass die PASTA-Domäne von PBP2X mit dem  $\beta$ -Lactamring des Antibiotikums Cefuroxime über van-der-

Waal's-Kräfte interagiert (Gordon *et al.*, 2000). Dieser  $\beta$ -Lactamring ist analog zu bestimmten Bereichen der Zellwand (D-Alanyl-D-Alanin). Es wird daher vermutet, dass die PASTA-Domänen auch unverknüpfte Peptidoglykan-Vorläufermoleküle, die eben dieses Motiv aufweisen, binden könnten. So würde der Zelle eine erhöhte Konzentration an unverknüpften Muropeptidmonomeren mittels der PASTA-Domänen der STPKs signalisiert werden können, und es könnten, direkt oder indirekt, die „downstream“ gelegenen Zellwandbiosynthese-Proteine, einschließlich der PBPs, aktiviert werden. Eine weitere Rolle der PASTA-Domänen wäre die Lenkung des Biosynthesekomplexes an die Stelle der noch unverknüpften Muropeptidmonomere (Yeats *et al.*, 2002).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung verschiedener Proteine mit PASTA-Domänen. Dargestellt sind auch weitere Domänen in den Beispielproteinen. STPKs besitzen 1-4 PASTA-Domänen; PBPs 1-2. TM: Transmembran-Domänen; S: Signalsequenz; P: PASTA-Domäne (modifiziert nach Yeats, 2002).

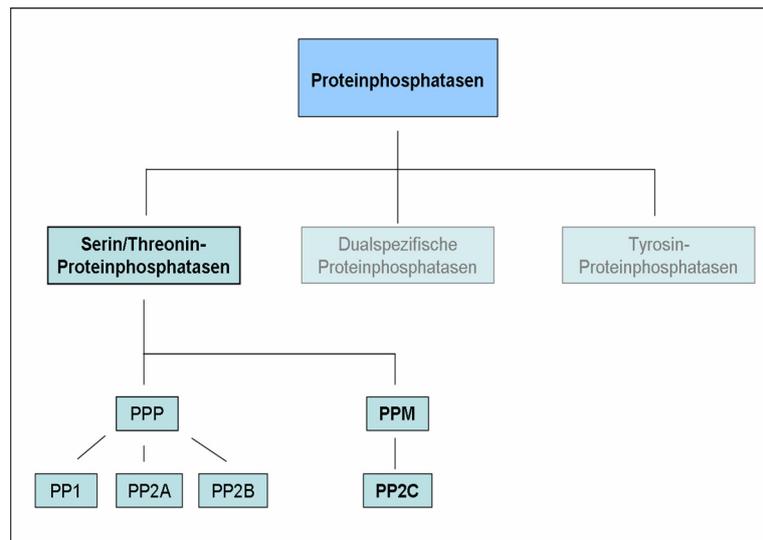
Erst kürzlich konnte Shah *et al.* (2008) die Rolle der PASTA-Domänen bei der Aktivierung von Sporen in *B. subtilis* aufklären. *B. subtilis* ist fähig sich an ungünstige Umweltbedingungen anzupassen, indem das Bakterium seinen Stoffwechsel drastisch reduziert oder durch Sporenbildung sogar völlig aussetzt. Sie müssen jedoch weiter fähig sein, eine Besserung dieser Umweltbedingungen festzustellen ohne ihren Ruhezustand zu früh aufzugeben. *B. subtilis* erreicht das durch die Wahrnehmung des Wachstums anderer Bakterien in seiner Umgebung. Diese wachsenden Bakterien geben Muropeptidfragmente der Zellwand in ihre lokale

Umgebung ab. Es konnte gezeigt werden, dass diese freigesetzten Muropeptidfragmente von den extrazellulären PASTA-Domänen der STPK PrkC gebunden werden können und damit die Stimulation der Germination über einen intrazellulären Signalweg bewirken. Damit wurde bewiesen, dass die PASTA-Domänen der bakteriellen STPKs tatsächlich Peptidoglykanmonomere als externes Signal erkennen und binden.

### 2.3.2. Proteinphosphatasen

Eukaryotische Proteinphosphatasen, welche von veresterten Hydroxyl-Gruppen in Proteinen und Peptiden die Abspaltung von anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) katalysieren, werden unterteilt in die Tyrosin-Proteinphosphatasen, die dualspezifischen Proteinphosphatasen und die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (STPPs) (Cohen *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu den Tyrosin- und Serin/Threonin-Proteinphosphatasen erkennen die dualspezifischen Proteinphosphatasen sowohl Phospho-Tyrosin- als auch Phospho-Serin- bzw. -Threoninreste. Die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen wurden ursprünglich von Ingebritsen *et al.* aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften, wie z.B. Substratspezifität und Inhibierbarkeit, in zwei Klassen eingeteilt: die Typ 1-Phosphatasen (PP1) und die Typ 2-Phosphatasen (PP2) (Ingebritsen & Cohen, 1983). Die Typ 1-Phosphatasen PP1 werden durch zwei hitzestabile Proteine inhibiert, welche deshalb auch Inhibitor 1 und Inhibitor 2 bezeichnet werden. Mitglieder der PP1-Klasse dephosphorylieren bevorzugt die  $\beta$ -Untereinheit der Glykogen-Phosphorylase-Kinase. Phosphatasen vom Typ 2 (PP2) werden nicht durch die zwei PP1-Inhibitoren inhibiert und dephosphorylieren bevorzugt die  $\alpha$ -Untereinheit der Glykogen-Phosphorylase-Kinase. Typ 2-Phosphatasen können weiter nach ihrer Abhängigkeit von divalenten Kationen in die Kationen-indifferente PP2A, die  $Ca^{2+}$ -abhängige PP2B und die  $Mg^{2+}$ -abhängige PP2C unterteilt werden. Es wurden jedoch auch zahlreiche neue Proteinphosphatasen entdeckt, die sich nicht eindeutig in die bestehende Nomenklatur einordnen lassen (Wera & Hemmingsen, 1995). Nach neueren Untersuchungen werden die Proteinphosphatasen nun jedoch entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft in zwei Gen-Familien unterteilt (Barford *et al.*, 1996). Danach gehören PP1, PP2A und PP2B der PPP-Gen-Familie an, während die PP2C der PPM-Gen-Familie zugerechnet wird (Abb.6). Mitglieder der PPP-Familie besitzen

meist eine katalytische Untereinheit zusammen mit einer regulatorischen Domäne. Dagegen wurden die Mitglieder der PPM-Familie aufgrund der strengen Abhängigkeit ihrer Proteinphosphatase-Aktivität von exogenen divalenten Kationen ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) identifiziert. Außerdem sind Phosphatasen der PPM-Familie gegen PPP-Inhibitoren wie Okadeinsäure unempfindlich. Dazu kommt, dass PPP- und PPM-Phosphatasen keine verwandte Aminosäuresequenz aufweisen.



**Abbildung 6:** Unterteilung der Proteinphosphatasen (nach Barford 1996). Enzyme, die in der Lage sind, Phosphosäureester-Bindungen zu hydrolysieren, werden unterteilt in Tyrosin-Proteinphosphatasen, dualspezifische Proteinphosphatasen und Ser/Thr-Proteinphosphatasen. Letztere beinhaltet die Klassen PPP und PPM. Die PP1, PP2A und PP2B werden der PPP-Gen-Familie und die PP2C der PPM-Klasse zugerechnet.

Es wurde lange angenommen, wie für die STPKs, dass STPPs auf Eukaryoten beschränkt sind. Kennelly *et al.* konnte jedoch zeigen, dass PPM-Phosphatasen sowohl in eubakteriellen (2002) als auch archaealen (2003) Genomen gefunden werden können. Zum Beispiel besitzt das Pathogen *S. pneumoniae* neben der STPK StkP eine STPP PhpP. Beide bilden ein funktionelles Paar, da PhpP die autophosphorylierte StkP dephosphoryliert (Nováková *et al.*, 2005). *S. agalactiae* codiert ebenso für ein funktionelles Paar. Stk1 und Stp1 regulieren gemeinsam durch ihre antagonistische Funktion die Aktivität der Pyrophosphatase PpaC (Rajagopal *et al.*, 2003). Bei *stk1*- und *stp1*-Deletionsmutanten wurde ein verändertes Zellwachstum und Segregation beobachtet. In *Bacillus subtilis*, der über ein ausgeprägtes Netz an Phosphorylierungskaskaden verfügt, sind einige PP2C-Phosphatasen gut charakterisiert und ihre Funktionen in der Zelle aufgeklärt. So nutzen z.B. RsbU und

RsbP das Substrat RsbV und wirken gemeinsam mit RsbX und dessen Substrat RsbS an der Sigma-B-vermittelten Stressantwort mit (Kennelly *et al.*, 1999; Vijay *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1996). Eine gut charakterisierte, membrangebundene PP2C-Phosphatase ist SpolIE, die über das Substrat SpolIAA an der Sigma-F-aktivierten Sporulation beteiligt ist (Adler *et al.*, 1997). Die Aktivität der 28 kDa großen Phosphatase PrpC wurde *in vitro* gezeigt und als natürliches Substrat die Kinase PrkC, deren Gen *prkC* benachbart zu *prpC* liegt, postuliert. Es konnte bewiesen werden, dass PrpC nicht nur die phosphorylierte PrkC dephosphorylieren kann, sondern auch den Elongationsfaktor G (Gaidenko *et al.*, 2002). Interessanterweise spielt PrpC auch eine Rolle beim Zuckertransport von *B. subtilis*. PrpC dephosphoryliert HrP-(Ser-P), wodurch die Dissoziation des CcpA-HrP-(Ser-P)-Komplexes bewirkt wird und somit die Auflösung der Katabolitrepresseion durch CcpA (Singh *et al.*, 2007). Aus *Myxococcus xanthus* ist Pph1, deren Inaktivierung die Aggregation der Zellen zur Fruchtkörperbildung verhindert, *in vitro* charakterisiert. Ein mögliches *in vivo*-Substrat ist die Kinase Pkn5. In diesem Organismus, der einen komplexen Lebenszyklus aufweist, wurden auch, wie oben beschrieben, verschiedene Ser/Thr-Proteinkinasen nachgewiesen (Treuner-Lange *et al.*, 2001). Neben den elf beschriebenen STPKs findet man im Genom von *M. tuberculosis* auch drei für STPPs codierende Gene: *pstP*, *ptpA* und *ptpB*. PstP ist ein sog. Metalloenzym, das der PPM-Familie angehört und die STPKs PknB (Boitel *et al.*, 2003) und PknA (Chopra *et al.*, 2003) sowie deren Substrate dephosphoryliert. Des Weiteren konnte die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von PstP aufgeklärt werden (Pullen *et al.*, 2004). Von den anderen beiden STPPs von *M. tuberculosis* wird angenommen, dass sie ihre Funktion als sekretierte Proteine in infizierten Wirtszellen ausüben. Die Signalwege des Wirtes mit denen sie dabei interagieren sind bislang jedoch noch nicht identifiziert worden (Koul *et al.*, 2004). Jedoch wird auch hier die antagonistische Wirkungsweise der STPPs mit ihren STPKs deutlich.

## 2.4 Ser/Thr-Proteinkinasen und –Phosphatasen von *S. aureus*

In *S. aureus* konnten zwei putative STPKs und eine putative STPP mittels BLAST-Analysen gefunden werden. Der ORF SA1063 codiert für eine vollständige STPK, die das erste Mal von Lomas-Lopez im *S. aureus*-Stamm N315 beschrieben wurde (Lomas-Lopez *et al.*, 2007). Die phosphorylierten Proteine dieses *S. aureus*-

Stammes wurden *in vivo* bei Wachstum in Glucose-Minimalmedium mittels  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat markiert und anschließend mittels 2DGE und MS-Analyse identifiziert. Es konnten elf Phosphoproteine detektiert werden, von denen neun durch die STPK SA1063 an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert wurden. Ein Protein wurde als Substrat der Tyrosinkinase CapB identifiziert. Interessanterweise spielen diese elf Phosphoproteine eine wichtige Rolle in zentralen Stoffwechselwegen, wie vor allem der Glykolyse. Die Homologe einiger dieser phosphorylierten Enzyme wurden bereits in anderen Bakterien als *in vivo*-Substrate der jeweiligen STPK beschrieben, wie z.B. Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase in *Streptococcus pneumoniae* (Nováková *et al.*, 2005) und *Corynebacterium glutamicum* (Bendt *et al.*, 2003), Triggerfaktor in *Bacillus subtilis* (Levine *et al.*, 2006) und *Streptomyces granaticolor* (Bobek *et al.*, 2004), Elongationsfaktor P in *C. glutamicum* und *S. granaticolor* sowie Enolase in *B. subtilis* und *C. glutamicum*. Truong-Bolduc *et al.* postuliert, dass der globale Regulator MgrA durch die STPK PknB in *S. aureus* SH1000 reguliert werden kann. Die Phosphorylierung verändert die Fähigkeit von MgrA an den *norA*-Promotor zu binden, wodurch die Expression der *norA*-Effluxpumpe betroffen ist (Truong-Bolduc *et al.*, 2008).

Beltramini *et al.* untersuchte die Rolle von Stk (PknB) und Stp bei der Zellwandbiosynthese von *S. aureus* im Stamm N315 (Beltramini *et al.*, 2009). Eine *stk-stp*-Doppeldeletionsmutante offenbarte Veränderungen im Prozess der Zellteilung, wie z.B. eine unvollständige oder vermehrte Septumbildung. Außerdem konnte eine unregelmäßige Zellgröße mittels Transelektronenmikroskopie (TEM) beobachtet werden. Interessanterweise wiesen diese Mutanten eine erhöhte Sensibilität gegenüber Zellwand-aktiven Antibiotika, wie den Cephalosporinen Cefazolin, Cefotaxim und Ceftriaxon sowie den Carbapenem Ertapenem und Imipenem im Vergleich zu N315WT auf. In einer anderen Arbeit postulieren Débarbouillé *et al.* (2009) eine Rolle der STPK Stk in der Virulenz des *S. aureus*-Stammes SH1000. Die *stk1*-Deletionsmutante zeigte eine verminderte Überlebensrate in einem Pyelonephritis-Modell in der Niere der Maus im Vergleich zum Wildtyp-Stamm, was auf eine Rolle der Kinase bei der Ausbildung der vollständigen Virulenz von *S. aureus* schließen lässt. Insgesamt lassen diese Ergebnisse eine Rolle der reversiblen Phosphorylierungsreaktionen bewirkt durch Stk und Stp bei der Zellwandsynthese und von zentralen Stoffwechselwegen im Pathogen *S. aureus* vermuten.

## 2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war eine umfassende Charakterisierung der Ser/Thr-Proteinkinase PknB in *S. aureus*. Es sollte der Einfluss der Kinase auf die Genexpression mittels vergleichender Microarray-Analyse untersucht werden. Dazu wurde das Transkriptom der 8325 $\Delta$ pknB-Deletionsmutante erstellt und mit dem des isogenen Wildtyps verglichen. Des Weiteren sollte die Regulation von PknB aufgeklärt werden. Mittels *in vitro*-Kinasereaktionen wurden die enzymatischen Bedingungen von PknB ermittelt sowie die autophosphorylierenden Reste zur Aktivierung von PknB identifiziert. Eine neue 2DGE-Analyse kombiniert mit einem Doppelfärbungsverfahren ermöglichte die Detektion von *in vivo*-Substraten der STPK PknB in den Stämmen 8325, SH1000 und COL. Die durch die Transkriptom- und Proteom-Analyse gewonnenen Ergebnisse wurden im Weiteren mit der Bestimmung des intrazellulären Metaboloms der Stämme 8325WT, 8325 $\Delta$ pknB und 8325 $\Delta$ yloO validiert. Um weitere Hinweise der Rolle des funktionellen Paares PknB und YloO zu erhalten, wurde das Transkriptom der  $\Delta$ yloO-Mutante im Stamm 8325 erstellt. Außerdem sollte die enzymatische Aktivität von YloO in *in vitro*-Phosphatase-Assays aufgeklärt werden.

### 3. Material

#### 3.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme

Sämtliche Verbrauchsmaterialien lieferten die Firmen ABgene, BioRad, Greiner Bio One, Peqlab, Promega, Macherey-Nagel, Millipore, MP Biomedicals, Sarstedt.

Die benötigten Chemikalien, Antibiotika, Enzyme und Nährstoffe wurden von den Firmen AppliChem, BioRad, Boehringer, Difco, GE Healthcare, Invitrogen, MBI-Fermentas, Merck, New England Biolabs, Oxoid, Peqlab, Promega, Qiagen, Roche, Roth, Serva, Sigma-ARK und Stratagene bezogen.

#### 3.2 Kits

**Tabelle 1:** In dieser Arbeit verwendete Kits.

<b>Kit</b>	<b>Anbieter</b>
ABI PRISM <sup>®</sup> Big Dye <sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
ECL <sup>™</sup> Advance Detection Kit	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Qiaquick PCR-Purification-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Bacteria Protect	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gene Clean <sup>®</sup>	MP Biomedicals, LLC, Ohio, USA
pGEM <sup>®</sup> -T Vector System	Promega, Mannheim, Deutschland
Protino <sup>®</sup> Protein Purification System	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
SYBR Green <sup>®</sup> JumpStart <sup>™</sup> Taq ReadyMix <sup>™</sup>	Sigma, Hamburg, Deutschland
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RNaseOUT	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### 3.3 Antibiotika

**Tabelle 2:** In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

<b>Antibiotika</b>	<b>Stocklösung (gelöst in )</b>
Cefepim	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Ceftriaxon	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Chloramphenicol	10 mg/ml (100 % EtOH)
Gentamicin	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Methicillin	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Fosfomycin	1 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)
Tetracyclin	10 mg/ml (70 % EtOH)
Tunicamycin	10 mg/ml (dH <sub>2</sub> O)

Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach Abkühlung der Medien auf ca. 50 °C.

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

### 3.4 Medien und Agarplatten

Medien für Flüssigkeiten und Agarplatten wurden bei 120 °C und 1 bar für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Zusätze wurden steril filtriert und nach dem Abkühlen der Lösung auf 50 °C zugegeben.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der verwendeten Medien.

<b>Medium</b>	<b>Komponente</b>	<b>Menge/l</b>
Luria-Bertani-Medium	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
B-Medium	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
TSB-Medium	Trypticase Soy Broth (Difco)	30 g
BHI-Medium	Brain Heart-Infusion (Oxoid)	37 g

Agarplatten:

Zur Herstellung von Festmedien wurde 1,5 % Agar zugesetzt.

LB-X-Gal-Platten:

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

Blutagarplatten:

5 % Kaninchen- oder Schafsblut zu, auf 50 °C abkühlen,  
 LB-Agar geben

Chemisch definiertes Medium (CL-Medium, Horsburgh *et al.*, 2001):**CL1 (autoklavieren):**

Glutamat	4,44 g/l
Aspartat	4,44 g/l
Prolin	4,44 g/l
Glycin	4,44 g/l
Threonin	4,44 g/l
Serin	4,44 g/l
Alanin	4,44 g/l
Lysin	1,12 g/l
Isoleucin	1,12 g/l
Leucin	1,12 g/l
Histidin	0,88 g/l
Valin	0,88 g/l
Arginin	0,66 g/l
Cystein	0,44 g/l
Phenylalanin	0,38 g/l
Tyrosin	0,34 g/l
Methionin	0,34 g/l
Tryptophan	0,12 g/l
ad 1 l H <sub>2</sub> O	

**CL2 (autoklavieren):**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	35 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
ad 500 ml H <sub>2</sub> O	

**CL3 (autoklavieren):**

Adenin-Hemisulfat	0,8 g
Guanin-HCl	0,8 g
ad 400 ml 0,1 M HCl	

**CL4 (steril filtrieren; -20 °C lagern):**

Pyridoxal	0,16 g
Pyridoxamin-2HCl	0,16 g
D-Pantothensäure	0,08 g
Riboflavin	0,08 g
Nikotinsäure	0,08 g
Thiamin-HCl	0,08 g
Biotin	0,004 g
ad 400 ml H <sub>2</sub> O	

Für die Herstellung von 1 l CL-Medium werden 500 ml CL1, 100 ml CL2, 10 ml CL3 und 2 ml CL4 mit 388 ml H<sub>2</sub>O gemischt.

Chemisch definiertes Medium für Metabolom-Analyse (CDM, ):**Aminosäuren-Stammlösungen 50 mM:**

	MG (g/mol)	g/100 ml	
Alanin	89,09	0,445	
Valin	117,15	0,586	
Leucin	131,18	0,655	
Isoleucin	131,18	0,655	
Aspartat	171,2	0,856	löst sich bei pH 7,5
Glutamat	147,13	0,736	
Serin	105,09	0,526	
Threonin	119,12	0,595	
Cystein	121,16	0,605	
Arginin	174,2	0,871	
Lysin	146,19	0,731	
Prolin	115,13	0,58	
Phenylalanin	165,19	0,826	
Tryptophan	204,23	1,021	
Histidin	155,16	0,776	

ad 100 ml H<sub>2</sub>O, steril filtrieren

**2xGrundmedium:**

	MG (g/mol)	g/1 l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	177,99	3,54
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	2,72
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	246,48	0,40
NH <sub>4</sub> Cl	63,5	1,00
NaCl	58,44	1,00

ad 1 l H<sub>2</sub>O; autoklavieren

**Vitamine:**

Cyanocobalamin	50 mg/l = 0,036 mM
p-Aminobenzoat	40 mg/l = 0,29 mM
Biotin	10 mg/l = 0,04 mM
Nikotinsäure	100 mg/l = 0,81 mM
D-Pantothensäure	100 mg/l = 0,21 mM
Pyridoxaminhydrochlorid	160 mg/l = 0,62 mM
Thiaminiumdichlorid	100 mg/l = 0,29 mM
Riboflavin	100 mg/l = 0,26 mM

ad je 1 l H<sub>2</sub>O; 1:10-Verdünnung steril filtrieren

**Spurenelemente:**

ZnCl <sub>2</sub>	69 mg/l = 0,51 mM
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	99 mg/l = 0,5 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 mg/l = 0,097 mM
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	350 mg/l = 1,46 mM
CuCl <sub>2</sub>	2 mg/l = 0,015 mM
NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	24 mg/l = 0,1 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	36 mg/l = 0,148 mM

ad je 1 l H<sub>2</sub>O; 1:10-Verdünnung steril filtrieren

<b>1 M Citrat:</b>	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	29,4 g/100 ml H <sub>2</sub> O
<b>20 % Glukose:</b>	α-D-Glukose-Monohydrat	20 g/100 ml H <sub>2</sub> O

1 l Minimalmedium wurde aus den einzelnen Komponenten nach folgendem Supplementierungsschema hergestellt:

500 ml 2xGrundmedium, je 20 ml pro Aminosäuregruppe, je 1 ml pro Vitamin, je 1 ml pro Spurenelement, 140 µl 1 M Citrat, 7,4 ml 20 % Glukose, 1,5 ml 2 M FeCl<sub>3</sub> und 1,5 ml 2 M NaOH.

### 3.5 Puffer und Lösungen

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

### 3.6 Bakterienstämme

**Tabelle 4:** In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaft	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>k</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>GyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\lambda$ , $\Delta(\textit{argF-lac})$ U169, $\Phi 80\textit{dlacZ}$ $\Delta$ M15	MBI-Fermentas
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>dcm gal</i> $\lambda$ (DE3)	Merck Biosciences
<i>S. aureus</i> RN4220	NCTC 8325-4-r; Restriktionsmutante mit 11 bp Deletion in <i>rsbU</i>	Kreiswirth, 1983
<i>S. aureus</i> 8325	NCTC 8325; Wildtyp, 11 bp Deletion in <i>rsbU</i>	Labor-Stammsammlung
<i>S. aureus</i> 8325 $\Delta$ <i>pknB</i>	8325 mit <i>pknB</i> -Deletion, <i>pknB::ermB</i> , Em <sup>R</sup>	Streker, K., Dissertation, 2005
<i>S. aureus</i> 8325 $\Delta$ <i>stp</i>	8325 mit <i>stp</i> -Deletion, <i>stp::ermB</i> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. aureus</i> COL	MRSA, hohe Methicillin-Resistenz, Tetracyclin-Resistenzplasmid	Tübingen
<i>S. aureus</i> COL $\Delta$ <i>pknB</i>	COL mit <i>pknB</i> -Deletion, <i>pknB::ermB</i> , Em <sup>R</sup>	Streker, K., Dissertation, 2005
<i>S. aureus</i> COL $\Delta$ <i>stpB</i>	COL mit <i>stp</i> -Deletion, <i>stp::ermB</i> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. aureus</i> SH1000	8325-4 Derivat, <i>rsbU</i> <sup>+</sup>	Horsburgh, 2002
<i>S. aureus</i> SH1000 $\Delta$ <i>pknB</i>	SH1000 mit <i>pknB</i> -Deletion, <i>pknB::ermB</i> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. aureus</i> SH1000 $\Delta$ <i>stp</i>	SH1000 mit <i>stp</i> -Deletion, <i>stp::ermB</i> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. aureus</i> Xen29	ATCC 12600 Derivat mit Tn4001 <i>luxABCDE</i> Insertion in ORF SA2154	Xenogen Corp.; Xiong, 2005
<i>S. aureus</i> Xen29 $\Delta$ <i>pknB</i>	Xen29 mit <i>pknB</i> -Deletion, <i>pknB::ermB</i> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. aureus</i> Xen29 $\Delta$ <i>stp</i>	Xen29 mit <i>stp</i> -Deletion, <i>stp::ermB</i> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit

### 3.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firmen Sigma-ARK und Operon bezogen.

**Tabelle 5:** Oligonukleotide für Herstellung der  $\Delta yloO$ -Deletionsmutante.

Bezeichnung	Sequenz 5`-3`	Annealing-Temperatur	Relative Position <sup>a</sup>
<i><math>\Delta yloO</math>-Deletionsmutante:</i>			
yloO-up-EcoRI	CGGAATTCTGGCTCGTTGAACAAGGTC	55°C	-989
yloO-up-BamHI	CGGGATCCACAAGCTGCGTCAATATCC	55°C	-48
yloO-down-PstI	TACCTGCAGTACTCGCGGCTATTGAAGGTG	55°C	+708
yloO-down-EcoRV	CGGATATCAAGGGTGGTTCACCAACAAGC	55°C	+1345
Primer zur Überprüfung der $\Delta yloO$ -Deletionsmutante mittels PCR:			
yloO 1	CAACATGATGCGACAAAACC	55°C	-1480
yloO 2	CTTGCGTCGTTTCACGTTTA	55°C	+945

**a:** Lage relativ zum Startcodon

**Tabelle 6:** Oligonukleotide zur Herstellung von Komplementanten.

Bezeichnung	Sequenz 5`-3`	Annealing-Temperatur	Relative Position <sup>a</sup>
Komplementierung der $\Delta yloO$ -Mutante:			
yloO-pHPS9-BamHI	CGGGATCCGATATTGACGCAGCTTGTGGT	53°C	-48
yloO-pHPS9-EcoRI	CGGAATTCGCCGTGTCAACACTTAATGGC	53°C	+1044
Komplementierung der $\Delta pknB$ -Mutante:			
pknB-pHPS9-BamHI	CGGGATCCGGTACAATAGAAGATCATGGTG	53°C	-82
pknB-pHPS9-EcoRI	CGGAATTCCTTGTGATGAATATAGCCTTCG	53°C	+2405
Komplementierung von SA1061 in der $\Delta yloO$ -Mutante:			
SA1061-pHPS9-BamHI	CGGAATCCCCGTTTCAACATCCGATAAC	53°C	-113
SA1061-pHPS9-EcoRI	CGGAATTCGCTTTATGGCCGCCCATACC	53°C	+1212

**a:** Lage relativ zum Startcodon

**Tabelle 7:** Oligonukleotide für PCR-Analysen und semiquantitative RT-PCR.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Annealing- Temperatur</b>	<b>Relative Position<sup>a</sup></b>
pknB up	AGTACTTTTCGCCAGAACAA	55°C	+521
pknB down	ACAATAGGTAAGTTCGTCGT	55°C	+959
yloO-RT up	GGCCATAAAGCAGGAGAAGT	55°C	+121
yloO-RT down	CACGTTTATCTGTGCCCATC	55°C	+520
SA1057 up	CGGCAAGAATATGCAAGGTA	55°C	+75
SA1057 down	CCTTGTTTCATCAGCAGGTTTG	55°C	+188
SA1058 up	CCAGCATCGCATCCTATTTT	55°C	+22
SA1058 down	CAACTTTGTTCCATTGACG	55°C	+355
SA1059 up	CATTGCAGTCGTAACGCAAC	55°C	+78
SA1059 down	TCATGCATCGTACCGACATT	55°C	+497
SA1060 up	AGGCATGGGTTAGGCAATTA	55°C	+290
SA1060 down	TGCCCTTCTGGCATTAAAC	55°C	+902
SA1061 up	TGGGTATCGGTGAACCATTT	55°C	+51
SA1061 down	TCACGACGTATTGTGGCATT	55°C	+1025
SA1064 up	GTAGACGTTAATGGCGAACG	55°C	+46
SA1064 down	GAATCCAGGTGTGTCTGCAA	55°C	+654
SA1065 up	GGTGTGACGGAGTTCATTT	55°C	+79
SA1065 down	TCGGTATTTACGCCTCCATC	55°C	+539
SA1066 up	TGGGCCAAAAGTAATGAAGG	55°C	+49
SA1066 down	CTTTCGCTTGCAAAGACTCA	55°C	+589
SA1067 up	AACAGACGTTACACGCTTT	55°C	+46
SA1067 down	ACGTGCAGAAACCCAAACTT	55°C	+156
16S rRNA up	TTGCTTCTCTGATGTTAGCG	55°C	+84
16S rRNA down	TCTAATCCTGTTTGATCCCC	55°C	+800
sgtB-fw	AGCTGATAACATGCCAGAGT	55°C	+252
sgtB-rev	ATACGCTAGGTGCATTGACT	55°C	+685
lrgA-fw	GCATCAAACCAGCACACTT	55°C	+19
lrgA-rev	CTTGTGCCTCCTCTATTTTG	55°C	+427
prsA-fw	GGAGATGTAACAGTTGCAGA	55°C	+115
prsA-rev	AGCTGAACCAGTATCCATTG	55°C	+594
saeS-up	AATGTGGTTTAACGGCCATA	55°C	+90
saeS-down	ATGTGCGGTTTTTCATGTTTG	55°C	+661
saeR-up	TGATCGTGGATGATGAACAA	55°C	+14
saeR-down	TACGCATAGGGACTTCGTGA	55°C	+463

Fortsetzung Tabelle 7

sarA-up	CATCAGCGAAAACAAAGAGAAA	55°C	+126
sarA-down	TGTTTGCTTCAGTGATTCGTTT	55°C	+358
sarT-up	TGATTTGAAAAGCAAGAGCAA	55°C	+9
sarT-down	TCATGTGGGTCTCTACATTTATTCA	55°C	+272
rot-up	TTGGGAGATGTTTAGCATGAAA	55°C	+45
rot-down	TTTTGCATTGCTGTTGCTCT	55°C	+434
mgrA-up	GGGATGAATCTCCTGTAAACG	55°C	+143
mgrA-down	CAAATGCATGAATGACTTTACC	55°C	+424
hla 1	GAAAGGTACCATTGCTGGTCA	55°C	+249
hla 2	AGCGAAGTCTGGTGAAAACC	55°C	+765
hlg 1	GCCAAGGTGCAGAAATCATC	55°C	+128
hlg 2	CTGGACCAGTTGGGTCTTGT	55°C	+643

a: Lage relativ zum Startcodon

**Tabelle 8:** Oligonukleotide für Protein-Überexpression in pET28a-Vektor.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
SA0016-fw	<b>GCTAGCTCATCAATCGTAGTAGTTGGG</b>
SA0016-rev	<b>CGCCCTAGGCTACCACAATTCTTTAATAGG</b>
SA0506-fw	<b>GCTAGCGCAAAGAAAATTCGATCGTTC</b>
SA0506-rev	<b>CGCCCTAGGTTATTTAATGATTTCAAGTAACAACG</b>
SA0819-fw	<b>CATATGACTGAGAACAATAATTTAGT</b>
SA0819-rev	<b>CGCCCTAGGTTATGCCCAACCACGATATCTAGC</b>
SA1062-fw	<b>CATATGCTAGAGGCACAATTTTTTACTG</b>
SA1062-rev	<b>CGCCCTAGGTCATACTTTATCACCTTCAATAGGCCG</b>
SA1063-fw	<b>AGCCATATGATAGGTAAAATAATAATGAACG</b>
SA1063-rev	<b>CCGCTCGAGTTATACATCATCATAGCTGACTTC</b>
SA1438-fw	<b>GCTAGCGAAAATCAAAGCAATATCCAATG</b>
SA1438-rev	<b>CGCCCTAGGTTATTGGATATTAACAATTTTTACG</b>
SA1499-fw	<b>CATATGACAGCAACTTGGGAAAAAAGG</b>
SA1499-rev	<b>CGCCCTAGGTTAATCTTCTTTAGTTCCTTC</b>
SA1517-fw	<b>GGACATATGACTGCAGAAAAAATTAATCAAGG</b>
SA1517-rev	<b>CGCGGATCCTTATTTTAAATTTTTAATCAATTC</b>
SA1520-fw	<b>AGCGCTAGCAGAAAACTAAAATTGTATGTAC</b>
SA1520-rev	<b>CGCGGATCCTTATAGTACGTTTGCATATCC</b>
PASTA-fw-pET	<b>AGCGCTAGCGTGGCAATGGCAATGTTTGG</b>
PASTA-rev-pET	<b>CGCGGATCCTTAAATATCATCATAGCTGAC</b>

*kursiv:* Restriktionsschnittstellen.

**Tab 9:** Oligonukleotide für Real-Time PCR (Produktlänge: ~100 bp).

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Annealing- Temperatur</b>	<b>Relative Position<sup>a</sup></b>
16SrRNA-up	AGTTGGGCACTCTAAGTTGA	55°C	+1148
16SrRNA-down	CCCTTTGTATTGTCCATTGT	55°C	+1265
purM-up	TGCGTTGAAACGAATACTGC	55°C	+379
purM-down	ACTGCTCCAACAGCAAATCC	55°C	+482
purR-up	TACTACTGCTGGCGCAAGTG	55°C	+180
purR-down	AATACCCGCCAGGTAACAAA	55°C	+307
pyrR-up	GAACGGTTCGTGCTTCACTT	55°C	+326
pyrR-down	GCTCGAATTGGTAACTCACGA	55°C	+431
oppD-up	TGATGAACCAACGACTGCAT	55°C	+540
oppD-down	TTCGCAACAACCCCTAAATC	55°C	+665
pknB-up	AAAGGGCCCTGAAAAGGTTA	55°C	+1317
pknB-down	ATGTATCCTTTTGGCGCTTG	55°C	+1454
yloO-up	TGTGATAGCAAATGTCGGTGA	55°C	+339
yloO-down	TTCTTCCGGCGTAATTTGAC	55°C	+462
gudB-up	CAAATTGAAGGTGCCAAGGT	55°C	+622
gudB-down	TCGTGTAATGCACCGTAAGC	55°C	+746
hla-up	ACCCGGTATATGGCAATCAA	55°C	+641
hla-down	AGCGAAGTCTGGTGAAAACC	55°C	+765
atl-up	CGAACTCAGGATCTGCAACA	55°C	+620
atl-down	TACCAATTCAGCACGACGA	55°C	+742
hlg-up	GGCAGACAAAGCAGTGCATA	55°C	+664
hlg-down	TTAGCGCCATCTTGTCTGTG	55°C	+788
SA0320-up	CAACATGTGGCATTTTGTGA	55°C	+253
SA0320-down	CTGTTTGGTTATCGCCCAGT	55°C	+379
pyrF-up	GCTGGTTTAGATGGCGTTGT	55°C	+442
pyrF-down	GCTTCTTCCGGTGTGTAAT	55°C	+590
SA1064-up	TGGCGAACGTTTCAATACAA	55°C	+57
SA1064-down	TTCCGCTCAAACACTTGATG	55°C	+188
sun-up	AGGCATGGGTTAGGCAATTA	55°C	+290
sun-down	CCGCGTTCTTTTGCTATTTT	55°C	+401
groEL-up	TGATGAAGTTGAAGGCGATG	55°C	+747
groEL-down	CACTTGCGCACCAGTTAAAA	55°C	+894
odhA-up	CTGAACAAATGCGACCATTG	55°C	+2237
odhA-down	AATTGGCTCAAATCCACCAG	55°C	+2343

Fortsetzung Tabelle 9

odhB-up	GCTCGTGAAAATGGTGTGAA	55°C	+406
odhB-down	TCTTTTGCAGGTGCTTGTG	55°C	+536
cfx-up	AGGGTTTGGTGGTCAATCAT	55°C	+420
cfx-down	TCGGTATTTACGCCTCCATC	55°C	+539

a: Lage relativ zum Startcodon

### 3.8 Plasmide

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Eigenschaft	Herkunft/Referenz
pGEM <sup>®</sup> -T	Vektorsystem für die direkte Klonierung von PCR-Produkten, Ap <sup>R</sup> , blau/weiß-Selektion	Promega
pBT2	Shuttle-Vektor, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Brückner, 1997
pEC1	pUC18 mit <i>ermB</i> -Kassette, Ap <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	Brückner, 1992
pRB473	Shuttle-Vektor, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Brückner, 1992
pHPS9	Shuttle-Vektor, Cm <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	Haima <i>et al.</i> , 1990
pET28a	Überexpressionsvektor für <i>E. coli</i> mit N-terminalen His-Tag <sup>®</sup> /Thrombin/T7-Tag <sup>®</sup> und optionalem C-terminalem His-Tag <sup>®</sup> , Kan <sup>R</sup>	Novagen
pGEM-T <i>yloO</i> -up	pGEM-T, Upstreamfragment von <i>yloO</i> (EcoRI, BamHI)	diese Arbeit
pGEM-T <i>yloO</i> -down	pGEM-T, Downstreamfragment von <i>yloO</i> (PstI, EcoRV)	diese Arbeit
pGEM-T <i>ermB1</i>	pGEM-T; <i>ermB</i> (BamHI, PstI)	diese Arbeit
pSDΔ <i>yloO</i>	pBT2 zur Deletion von <i>yloO</i> ( <i>stp</i> ); <i>yloO</i> (upstream)- <i>ermB</i> - <i>yloO</i> (downstream)	diese Arbeit
pRB473 <i>pknB</i>	pRB473 mit <i>pknB</i> -Fragment, Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRB473 <i>yloO</i>	pRB473 mit <i>yloO</i> -Fragment, Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pHPS9SA1061	pHPS9 mit SA1061-Fragment, Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28a-SA0016/PurA	pET28a mit <i>purA</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28a-SA0506/Tu	pET28a mit <i>tufA</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28a-SA0819/GudB	pET28a mit <i>gudB</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28a-SA1062/YloO	pET28a mit <i>yloO</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 10

pET28a-SA1063/PknB	pET28a mit <i>pknB</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28a-SA1438/GreA	pET28a mit <i>greA</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28a-SA1499/Tig	pET28a mit <i>tig</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28a-SA1517/CitC	pET28a mit <i>citC</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28a-SA1520/Pyk	pET28a mit <i>pykA</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28a-PknB <sub>T-A</sub>	pET28a mit PknB: Basenaustausch an Position T164 zu A und T166 zu A, Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit; Sloning BioTechnology GmbH
pET28a-PASTA	pET28a mit PknB <sub>378-664</sub> (PASTA-Domänen), Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit

### 3.9 Software

Tabelle 11: Verwendete Computersoftware.

Software, Versionsbezeichnung	Hersteller
Acuity 4.0	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Adobe Illustrator CS	Adobe System Inc., San Jose, CA, USA
Delta2D	Decodon, Greifswald, Deutschland
GenePix Pro 6.0	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
LSM Image Browser 3.5	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
MS Office 2003	Microsoft, Redmond, WA, USA
MyiQ 1.0	BioRad, München, Deutschland
pDRAW32 1.0	Olesen, 1998; Freeware unter <a href="http://www.acaclone.com">www.acaclone.com</a>
SAM	Excel Add-in, ( <a href="http://www.stat.stanford.edu/~tibs/SAM">www.stat.stanford.edu/~tibs/SAM</a> ), University of Stanford, CA, USA
Windows Vista	Microsoft, Redmond, WA, USA

## **4. Methoden**

### **4.1 Extinktionsmessung**

Absorptionsmessungen wurden an einem Spektralphotometer ausgeführt. Für Messungen im Bereich des sichtbaren Lichtes wurden Kunststoffküvetten verwendet. Die optische Dichte (OD) von Bakterienkulturen in LB-, B-Medium, BHI und TSB wurde bei 600 nm bestimmt. Als Richtwert gilt dabei, dass eine OD<sub>600</sub>-Einheit einer Bakteriendichte von  $7,4 \times 10^8$  Zellen/ml entspricht.

### **4.2 Stammhaltung**

Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden die Bakterien bei 37 °C bzw. 30 °C als Übernachtskultur kultiviert. Die Kultur wurde in Stammhaltungs-röhrchen mit 20 % (v/v) Glycerin verdünnt und bei -80 °C gelagert.

### **4.3 Kultivierung**

#### **4.3.1 Allgemeines**

Soweit nicht anders angegeben, wurde *Staphylococcus* in TSB-Medium und *E. coli* in LB-Medium, wenn nötig unter Zusatz des benötigten Antibiotikums, in Schüttelkultur bei 37 °C im Rotationsschüttler angezogen.

#### **4.3.2 Herstellungen CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen**

1 ml einer ÜNK wurde in 49 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis gestellt und abzentrifugiert (10 min, 5 000 rpm, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde in 25 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde wieder in 2,5 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>/15 % Glycin-Lösung aufgenommen und 30 min auf Eis gestellt. Die Lagerung der so gewonnenen CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Bakterien erfolgte in Aliquots von je 150 µl bei -80 °C.

### 4.3.3 Herstellungen elektrokompetenter *S. aureus*-Zellen

50 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml ÜNK angeimpft und bis zur OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach Abzentrifugation der Kultur (10 min, 5 000 rpm, RT) wurde das Bakterienpellet zuerst mit 50 ml H<sub>2</sub>O und dann mit 10 ml 10%iger Glycerinlösung gewaschen. Dann wurde das Pellet in 5 ml 10%iger Glycerinlösung aufgenommen und für 15 min bei RT inkubiert. Die Bakterien wurden erneut abzentrifugiert und das Pellet in 0,5 ml 10%iger Glycerinlösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von je 70 µl bei -80 °C gelagert.

## 4.4 Arbeiten mit DNA

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

Die Bakterien wurden üN unter Selektionsdruck des jeweiligen Antibiotikums in 5 ml LB-Medium angezogen. Von dieser Kultur wurden 2 ml abzentrifugiert und das Pellet in 150 µl Puffer 1 aufgenommen. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 150 µl Puffer 2 dazugegeben, kurz geschwenkt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 150 µl Puffer 3 dazugegeben, durch Invertieren gemischt und wiederum bei RT 5 min inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 14 000 rpm/RT zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 315 µl Isopropanol pipettiert. Die DNA wurde daraufhin bei einem weiteren Zentrifugationsschritt von 15 min bei 14 000 rpm/RT pelletiert und anschließend mit 70 % EtOH gewaschen. Nach Trocknung bei RT wurde die DNA letztlich in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Für eine Restriktion zur Überprüfung von klonierten Fragmenten in gängige Vektoren oder als Template in einer PCR-Reaktion konnte die Plasmid-DNA in diesem Reinheitsgrad verwendet werden. Sollte im Anschluss eine Sequenzierreaktion durchgeführt werden, musste die DNA in einem weiteren Schritt gereinigt werden. Dies erfolgte mit dem „PCR-Purification-Kit“ (Qiagen).

#### Puffer 1:

50 mM Tris/HCl, pH 7,5

10 mM EDTA, pH 8,0

0,1 mg/ml RNase A

#### Puffer 2:

0,2 N NaOH

1 % SDS

#### Puffer 3:

3 M Natriumacetat, pH 4,8

#### 4.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. aureus*

Für die Plasmid-DNA Isolierung aus *S. aureus* wurde das Protokoll 4.4.1 wie folgt modifiziert: Die ÜNK wurde in B-Medium mit 1 % Glycin angezogen, das Bakterienpellet dann in 200 µl Puffer 1 vollständig resuspendiert und mit 3 µl Lysostaphin (2 mg/ml) bei 37 °C 10-30 min inkubiert. Anschließend wurden die Schritte wie für *E. coli* beschrieben befolgt.

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

Eine ÜNK wurde in 40 ml LB-Medium + 1 % Glycin bei 37 °C im Schüttler angezogen. Von dieser Kultur wurden 2 ml abzentrifugiert (5 min, 14 000 rpm, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl 10 mM Tris + 25 % Saccharose pH 7,5 aufgenommen. Es wurden 15 µl 0,5 M EDTA pH 8 zugefügt. Dann erfolgt die Lyse, indem 10 µl Lysostaphin (2 mg/ml) hinzugegeben wurden und der Ansatz für 20 min bei 37 °C inkubiert wurde. Zu diesem Ansatz wurden dann 375 µl TE-Puffer, 225 µl 10 % SDS und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) gegeben und das Gemisch wurde 30 min bei 55 °C inkubiert. Um die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA zu trennen, wurden 150 µl 5 M Natriumperchlorat hinzugefügt. Das Gemisch wurde kurz geschwenkt und es wurde ½-Volumen (entspricht ca. 450 µl) Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) hinzupipettiert. Durch mehrmaliges Invertieren wurde der Ansatz gemischt und es folgte für 1,5 h das Ausfällen der Proteine mittels Schütteln. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 14 000 rpm, RT) wurde mit dem doppeltem Volumen 100%igen Ethanol die DNA aus dem Überstand gefällt (30 min Inkubation auf Eis). Danach wurde 10 min bei 14 000 rpm/RT zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei RT für ca. 1 h getrocknet. Abschließend wurde das DNA-Pellet in 50 µl EB-Puffer oder 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die chromosomale DNA wurde bei 4 °C gelagert.

##### TE-Puffer:

10 mM Tris, pH 7,5

1 mM EDTA, pH 8

##### EB-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8,5

#### 4.4.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration und Reinheit (= Proteinfreiheit) kann mittels Messung der optischen Dichte (OD) am Photometer bestimmt werden. Die Bestimmung der DNA-Konzentration beruht dabei darauf, dass die Nukleinsäuren ein Absorptionsspektrum bei 260 nm besitzen. Es wurde das Spectrophotometer NanoDrop® (Peqlab) gemäß Herstellerangaben verwendet.

#### 4.4.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

##### 4.4.5.1 Standard-PCR

Mit dieser Methode werden spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert. Dabei wird die zwischen den Primern liegende DNA durch mehrere Zyklen von DNA-Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation exponentiell vermehrt. Außerdem kann an die Primersequenz eine gewünschte Restriktionsschnittstelle angefügt werden, die die nachfolgende Klonierung des PCR-Produktes erleichtert. Als Primer wurden Oligonukleotid-Primer ausgewählt, die standardmäßig etwa 20 Nukleotide lang waren und einen GC-Gehalt von möglichst 50 % aufweisen sollten. Außerdem sollte darauf geachtet werden, dass das Primer-Paar keine längeren komplementären Abschnitte aufweist. Für eine Standard-PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

##### 20 µl-PCR-Ansatz:

2 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer  
0,8 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,8 µl 20 mM dNTP-Mix  
0,4 µl Primer 1 (10 pmol/µl)  
0,4 µl Primer 2 (10 pmol/µl)  
1 µl Template  
0,3 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)  
ad 20 µl H<sub>2</sub>O

##### Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung	3 min	94 °C
Denaturierung	45 s	94 °C
Primer-Annealing	45 s	53 °C
Primer-Elongation	1 min	72 °C
Elongation	5 min	72 °C

Die Schritte 2-4 wurden standardmäßig in 30 Zyklen durchlaufen. Zum Überprüfen der Reaktion wurde ein Teil des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen. Falls eine Polymerase mit „proof reading“ Aktivität erforderlich war, wurde die Phusion-Polymerase (Finnzyme) genau nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Für die Bestimmung der Primer-Annealing-Temperatur wurde folgende Gleichung verwendet:  $T_m = 69,3 + 0,4 \% (\text{GC-Gehalt}) - 650/\text{Länge des Oligos}$ .

Je nach Bedarf wurden die PCR-Produkte mittels dem „PCR-Purification-Kit“ der Firma Qiagen oder dem „Gene Clean Kit“ (MP Biomedicals, Ohio) aufgereinigt und zur Klonierung bzw. als Sonde verwendet.

#### **4.4.5.2 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR, semiquantitativ)**

Um die Transkriptmenge einzelner Gene in der Bakterienzelle einschätzen zu können und so eventuelle Unterschiede der Gentranskription in einer zu untersuchenden Mutante und ihrem isogenen Wildtyp feststellen zu können, wurde die Reverse Transkriptase-PCR eingesetzt. Diese gliedert sich in zwei Reaktionen: Zum einen in die reverse Transkription der RNA in cDNA und zum anderen in die Amplifikation dieser cDNA mittels einer PCR. Für die cDNA-Synthese wurde ein Hexamer-Primer-Mix verwendet. In der anschließenden PCR wurden dann Gen-spezifische Primer eingesetzt. Um sicher zu sein, dass in jedem Ansatz annähernd die gleiche Menge an cDNA vorhanden war, wurde als Kontrolle parallel eine PCR mit einem Haushaltsgen durchgeführt. In diesem Fall wurden 16S rRNA-Primer verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte nach dem Protokoll der reversen Transkription (4.5.6).

#### **4.4.6 Horizontale Gelelektrophorese**

Zur Integritäts- und Größenkontrolle von DNA-Fragmenten diente die Agarose-Gelelektrophorese. Die Proben wurden hierzu mit 6-fach konzentriertem Probenpuffer im Verhältnis 1:6 versetzt. Die Auftrennung erfolgte in 0,8- bis 2%igen TAE-Agarosegelen (Sambrock, 1989) in 1x TAE-Puffer. Als Größenstandard diente eine DNA-1kB-Ladder der Firma Fermentas. Die DNA-Fragmente wurden nach Anfärben mit Ethidiumbromid unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert. Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „Gene Clean Kit“ (MP Biomedicals, Ohio/ vgl. 4.4.8) verwendet.

50x Laufpuffer (TAE):

242 g Tris  
57,1 ml Eisessig  
100 ml 0,5 M EDTA , pH 8  
ad 1 l dH<sub>2</sub>O

6x DNA-Probenpuffer:

0,125 g Bromphenolblau  
0,125 g Xylencyanol  
7,5 g Ficoll (Type400, Pharmacia)  
ad 50 ml dH<sub>2</sub>O

#### 4.4.7 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Für die Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde der „PCR-Purification-Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Zum PCR-Ansatz wurden gemäß dem Herstellerprotokoll das 5-fache Volumen PB-Puffer gegeben. Nun pipettierte man alles auf eine „PCR-Purification-Kit-Säule“, die kurz abzentrifugiert wurde (45 s, 14 000 rpm, RT) und anschließend mit 750 µl PE-Puffer gewaschen wurde. Nachdem die Säule noch einmal kurz trocken zentrifugiert worden war, wurde die DNA mit 30-50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

#### 4.4.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

#### 4.4.9 Restriktionsspaltung von DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet und standardmäßig 1-2 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtansatz von 20 µl bei einer 1x Endkonzentration des Puffers und 1 µl Restriktionsenzym gespalten. Der Ansatz wurde unter optimalen Bedingungen (meist 37 °C) für 2 h inkubiert. Bei Ansätzen mit mehreren Enzymen müssen die Reaktionsbedingungen beider Enzyme berücksichtigt werden. Gegebenfalls ist es sinnvoll die DNA in zwei getrennten Schritten mit dem jeweiligen Enzym zu verdauen, wenn die Optima der verwendeten Enzyme zu weit auseinander liegen.

#### 4.4.10 Ligation von DNA

##### 4.4.10.1 Ligation in pGEM<sup>®</sup>-T

Das pGEM<sup>®</sup>-T Vektor System ist ein sehr effizientes System für die Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor mit hoher Kopienzahl. Der Vektor verfügt über 3'-Thymidin-Überhänge an der Insertionsstelle, die eine Religation verhindern und eine einfache Ligation von PCR-Produkten mit 3'-Adenin-Überhängen in die multiple Klonierungsstelle (MCS) ermöglichen. Die MCS des Vektors pGEM<sup>®</sup>-T liegt im Gen für die  $\alpha$ -Peptid-Region des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase. Durch diese Insertionsinaktivierung wird eine Blau/Weiß-Selektion auf IPTG/X-Gal-Indikatorplatten ermöglicht. Folgender Standardansatz für die Ligation eines PCR-Produktes in den Vektor wurde verwendet:

5 µl	2x T4 DNA Ligationspuffer
1 µl	pGEM <sup>®</sup> -T Vektor
1-3 µl	PCR-Produkt
1 µl	T4 DNA-Ligase
ad 10 µl dH <sub>2</sub> O	

Der Ansatz wurde gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

#### 4.4.10.2 Ligation mit T4-Ligase

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Kondensation einer 5`-Phosphatgruppe mit einer freien 3`-Hydroxylgruppe von doppelsträngigen (ds) DNA-Molekülen unter ATP-Verbrauch. Vor einer Ligation mussten 5`-Ende und 3`-Ende der zu ligierenden DNA-Fragmente (Inserts) mit den entsprechenden Restriktionsendonuklease geschnitten werden, um kompatible Enden zu erzeugen. Für die „sticky end“ Klonierung sollte der zu ligierende Vektor zu dem Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 vorliegen. Daneben wurde 10x Ligasepuffer (NEB), 1 µl T4-DNA-Ligase und dH<sub>2</sub>O bis zum gewünschten Endvolumen (meist 10 µl) zugegeben. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

#### 4.4.11 Transformation von Bakterien

##### 4.4.11.1 Transformation von *E. coli* (CaCl<sub>2</sub>-Methode)

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit dem entsprechenden Ligationsansatz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschritt bei 42 °C für 55 s. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß sofort auf Eis gestellt. Nach 5 min wurde der Ansatz auf 1 ml mit LB-Medium aufgefüllt und für 2 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden danach 1 min bei RT/12 000 rpm abzentrifugiert und ca. 750 µl vom Überstand verworfen. In der verbleibenden Flüssigkeit wurden die Bakterien resuspendiert und auf zwei Selektionsplatten ausplattiert.

##### 4.4.11.2 Transformation von *S. aureus* (Elektroporation)

Für die Transformation von elektrokompetenten *S. aureus*-Zellen wurde ein Aliquot bei RT aufgetaut und mit dem Ligationsansatz versetzt. Ebenfalls bei RT folgte dann die Inkubation für 20 min. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltdurchmesser gefüllt und mit einer Spannung von 1,8 kV elektroporiert. Dann wurde sofort 1 ml BHI-Medium in die Küvette gegeben, der gesamte Ansatz in ein Reagenzröhrchen überführt und ca. 2 h bei 30 °C (Ts: pBT2 und pHPS9) bzw. 37 °C (pRB473) geschüttelt. Danach wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert. Der Rest wurde kurz abzentrifugiert und nach dem

Entfernen des Überstandes bis auf ein Endvolumen von etwa 200 µl in konzentrierter Form ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert.

#### **4.4.12 Transduktion von Bakterien**

Bei der Transduktion wird DNA durch Phagen von einem Bakterium in ein anderes übertragen. Diese Verfahren ermöglicht es Plasmide in den schwer transformierbaren *S. aureus* Stamm 8325 zu übertragen. Zuerst wurden rekombinante Plasmide in den restriktionsnegativen *S. aureus* Stamm RN4220 elektroporiert und von dort mittels Phagen  $\Phi 85$  in den Stamm 8325 transduziert.

##### **4.4.12.1 Herstellung des Phagenlysats**

Der Donorstamm *S. aureus* RN4220 mit dem entsprechenden Plasmid wurde üN in 20 ml LB-Medium unter Schütteln und Beachtung des entsprechenden Selektionsdruckes angezogen. Es wurden dann 20 % 1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zur ÜNK gegeben und 300 µl von dieser in ein 15 ml-Greiner-Röhrchen pipettiert. Nun folgte die Inaktivierung des eigenen Restriktionssystems des Stammes, indem die Kultur 2 min bei 53 °C inkubiert wurde. Die Kultur wurde bei RT abgekühlt und mit 100 µl des zuvor 1:10 in Phagenpuffer (LB-Medium mit 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) verdünnten Phagenlysats versetzt. Ein Röhrchen blieb frei von Phagen und diente so zur Kontrolle, dass unter den gewählten Bedingungen bakterielles Wachstum stattfindet. Der Ansatz wurde 1-2 h bei RT inkubiert. Danach wurden zu jedem Ansatz 4 ml flüssiger 55 °C warmer Weichagar (LB-Medium mit 0,6 % Agar und 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) gegeben, kurz geschwenkt und sofort auf eine LB-Platte gegossen. Die Platten wurden üN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnte man eine deutliche Bakterien-Lyse feststellen. Es wurde der Weichagar von der Agarplatte abgekratzt, mit 1 ml Phagenpuffer vermischt und anschließend abzentrifugiert (10 min, 6 000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde mittels eines 0,2 µm Millipore-Filters steril filtriert. Im so erhaltenen Überstand können neben intakten Phagen auch Phagenpartikel vorhanden sein, die das entsprechende Plasmid beinhalten.

#### 4.4.12.2 Transduktion des Empfängerstamms

Der Empfängerstamm wurde in 10 ml LB-Medium üN angezogen. Am nächsten Morgen wurden 20 % 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zur ÜNK gegeben. 300 µl dieser Kultur wurde wie oben beschrieben inaktiviert und schließlich mit 100 µl Phagenlysat versetzt. Nach 2-3 h Inkubation bei RT wurden 3 ml flüssiger, 55 °C warmer Weichagar (LB-Medium mit 0,6 % Agar und 20 mM NaCitrat) zum Bakterien-Phagen-Gemisch gegeben, kurz geschwenkt und sofort auf eine LB-Selektionsplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben. Die Platten wurden bei der dem Plasmid entsprechender Temperatur im Brutschank inkubiert. Erste Kolonien erscheinen meist nach 36-48 h. Aufgrund des Selektionsdrucks können nur Bakterien wachsen, die mit dem Plasmid transduziert wurden.

#### 4.4.13 Herstellung von Deletionsmutanten

Für die Herstellung der Phosphatase-Deletionsmutante wurde die codierende Sequenz des *yloO*-Gens (SA1062) durch die Sequenz der Erythromycin-Resistenzkassette (*ermB*) ausgetauscht. Es mussten dazu zuerst die flankierenden „upstream“ und „downstream“ Fragmente des Zielgens amplifiziert werden. Diese Fragmente waren zwischen 700-1100 bp lang. In einer PCR wurden diese amplifiziert und mit Hilfe modifizierter Primer wurden die für die folgenden Klonierungsschritte nötigen Restriktionsschnittstellen angehängt. Die so generierten PCR-Produkte wurden dann, nach einer Aufreinigung (4.4.7), in den Vektor pGEM-T (Promega) ligiert und in *E. coli* DH5α transformiert. Klone konnten nun mittels Blau/Weiß-Selektion auf X-Gal/IPTG/Amp-Platten identifiziert werden. Für die Konstruktion des für die homologe Rekombination in *S. aureus* benötigten Vektors wurde der Shuttle-Vektor pBT2 verwendet (Brückner *et al.*, 1997). Dieser zeichnet sich durch zwei Replikationsstartpunkte aus, die eine temperaturabhängige Replikation in *E. coli* und *S. aureus* ermöglichen. Diese Eigenschaft führt zu einem Replikationsstopp in *S. aureus* bei Temperaturen über 37 °C und stellt eine wichtige Voraussetzung für die Selektion rekombinanter Klone dar. Als Selektionsmarker wurde eine Erythromycin-Resistenzkassette (*ermB*) gewählt, die bereits im Vektor pEC1 kloniert vorlag. Die Restriktionsschnittstellen aller Fragmente wurden so gewählt, dass die Erythromycin-Resistenzkassette von dem „upstream“ Fragment und dem „downstream“ Fragment flankiert wurde. Alle Klonierungen erfolgten zuerst

in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Der Shuttle-Vektor pBT2 (pSD $\Delta y/oO$ ) mit den entsprechenden Fragmenten wurde danach in den restriktionsnegativen *S. aureus* Stamm RN4220 transformiert. Der Vektor wurde schließlich mittels Phagentransduktion (Phage  $\Phi 85$ ) in den *S. aureus*-Stamm 8325 bzw. SH1000 oder Xen29 überführt. Das Vektorkonstrukt wurde nach jedem Schritt durch Plasmid-Minipräparation überprüft. Im Stamm 8325 wurde dann das Zielgen *y/oO* durch homologe Rekombination gegen die Erythromycinkassette ausgetauscht. Durch dreimaliges Überimpfen der Bakterienkultur und Kultivierung bei 42 °C ging der temperatursensitive Shuttle-Vektor verloren und das Rekombinationsereignis wurde begünstigt (Brückner *et al.*, 1997). Potentielle Deletionsmutanten konnten durch ihr Wachstumsverhalten vorselektiert werden. Die Deletionsmutanten wuchsen, nach Erwerb der Erythromycin-Resistenzkassette, auf Erythromycin, waren aber nach Verlust des Shuttle-Vektors pBT2 sensitiv gegenüber Chloramphenicol. Klone die dieses Wachstumsverhalten zeigten wurden zunächst durch semi-quantitative RT-PCR überprüft.

## **4.5 Arbeiten mit RNA**

### **4.5.1 Allgemeines**

Um den Eintrag von RNasen zu vermeiden, wurde bei allen Experimenten mit Handschuhen gearbeitet. Um RNasen aus destilliertem Wasser zu entfernen, wurde es mit 0,1 % DEPC versetzt, üN bei 37 °C inkubiert und anschließend 30 min autoklaviert..

### **4.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Staphylokokken**

Zur RNA-Isolierung wurde das RNeasy-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Je nach Versuchsplanung wurde eine ÜNK des gewünschten Bakterienstammes angesetzt. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur in frischem LB-Medium auf OD<sub>600</sub> = 0,05 eingestellt und man ließ sie im Schüttler bei 37 °C bis zur gewünschten OD<sub>600</sub> wachsen. Für die Isolierung der RNA wurden 5 ml Bakterienkultur mit der doppelten Menge RNaProtect (Qiagen) vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 6 000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet in RLT-Puffer + 10  $\mu$ l/ml  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte

anschließend mittels „Fast Prep FP120“ (Bio 101, Qiogene, Irvine, Kanada): Zweimal 45 s auf Stufe 6,5. Danach wurden die Proben 2 min auf Eis gestellt und dann für 10 min bei 14 000 rpm/4 °C abzentrifugiert. Der Überstand (ca. 800 µl) wurde mit dem gleichen Volumen 100%igem Ethanol vermischt und auf ein RNeasy Mini-Säulchen pipettiert. Die RNA-Proben wurden mit 700 µl RW1-Puffer und dreimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Nun wurden die RNeasy Mini-Säulchen auf neue Eppendorfgefäße überführt und 2 min bei 14 000 rpm/RT trocken zentrifugiert. Die RNA wurde daraufhin mit 40 µl dH<sub>2</sub>O von den Säulchen eluiert. Mittels NanoDrop<sup>®</sup> wurde die Konzentration der RNA bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgt für kurze Zeit bei -20 °C. Für eine höhere Haltbarkeit wird jedoch die Aufbewahrung bei -80 °C empfohlen. Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

### 4.5.3 DNase-Lyse

Für die Lyse der DNA wurden zu 40 µl isolierter RNA folgende Komponenten hinzugefügt:

- 5 µl DNaseI Buffer, RNase frei (Roche)
- 5 µl DNaseI (RNase frei, 10 U/µl, Roche)

Mittels vorsichtigem Auf- und Abpipettieren wurde der Ansatz gemischt und 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Um den Erfolg des DNase-Verdau zu kontrollieren wurde eine PCR durchgeführt. Dabei diente als Template je ein Mikroliter des DNase-Verdau. Da die Polymerase nur DNA als Template verwenden kann, darf bei erfolgreichem DNase-Verdau kein PCR-Produkt entstehen. Als Positivkontrolle diente genomische DNA und als Negativkontrolle H<sub>2</sub>O. Es wurden 16S rRNA-Primer (10 pmol/µl) verwendet. Bei einer positiven PCR-Reaktion wurde die DNase-Lyse wiederholt. Danach erfolgte die Aufreinigung der RNA, damit sie für weitere Arbeiten, wie die Herstellung von cDNA für die RT-PCR und für die Sonden-Herstellung für die Microarray-Hybridisierung verwendet werden konnte.

#### 4.5.4 Aufreinigung der RNA

Für die Aufreinigung der RNA wurde der RNeasy Mini-Kit (Qiagen) verwendet. Dazu wurden zu dem gesamten Ansatz der DNase-Lyse (ca. 50 µl) 175 µl RLT-Puffer + 10 µl/ml β-Mercaptoethanol pipettiert. Anschließend wurden 125 µl 100 % Ethanol zugegeben und der gesamte Ansatz wurde gemischt. Jetzt wurde die gesamte Probe auf ein RNeasy Mini-Säulchen gegeben. Nach kurzem Abzentrifugieren (1 min, 14 000 rpm, RT) wurde der Ansatz zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Das RNeasy Mini-Säulchen wurde auf ein neues Eppendorfgefäß überführt und für 2 min bei 14 000 rpm/RT trocken zentrifugiert. Die RNA wurde dann mit 40 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Die Konzentration der RNA wurde schließlich mittels NanoDrop<sup>®</sup> bestimmt. Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

#### 4.5.5 Konzentrationsbestimmung von RNA

So wie die DNA-Konzentration, kann auch die RNA-Konzentration und Reinheit (=Proteinfreiheit) mit Hilfe des Spectrophotometers NanoDrop<sup>®</sup> bestimmt werden (siehe Konzentrationsbestimmung von DNA, 4.4.4).

#### 4.5.6 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der RNA wurde der Kit „SuperScript III RNaseH<sup>-</sup> Reverse Transkriptase“ der Firma Invitrogen verwendet. Für die cDNA-Synthese wurden standardmäßig 2 µg RNA pro Ansatz eingesetzt. Dazu wurde folgendes Protokoll benutzt:

##### cDNA-Synthese:

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

Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und dann sofort für 3 min auf Eis gekühlt. Nach Abzentrifugation des Ansatzes (1min, 14 000 rpm, RT) wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

4 µl	5x First-Strand Puffer
1 µl	0,1 M DTT
1 µl	RNaseOUT (Invitrogen)
1 µl	SuperScript III RNaseH <sup>-</sup> Reverse Transkriptase

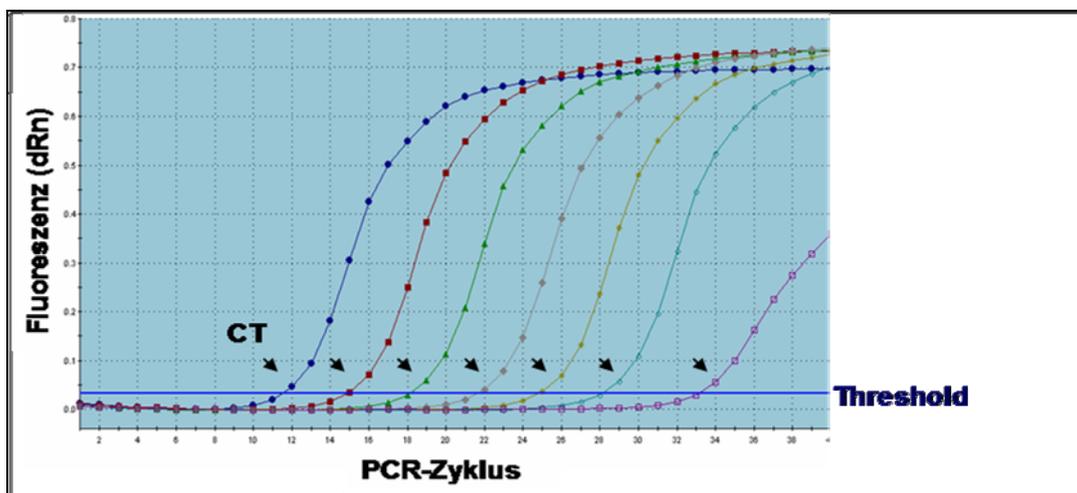
Der gesamte Ansatz wurde durch Pipettieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Dann folgte die reverse Transkription bei 50 °C für 1 h. Durch Erhöhung der Temperatur auf 70 °C und anschließender Inkubation für 15 min wurde die Reaktion schließlich gestoppt. Die so erhaltene cDNA konnte anschließend direkt als Template für PCR-Analysen wie Real-Time PCR oder semiquantitative RT-PCR verwendet werden.

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

Die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist die sensitivste Technik zur Detektion und vor allem Quantifizierung von mRNA die zurzeit zur Verfügung steht. Im Vergleich zu den bekannten sog. Endpunkt-Techniken, wie Northern Blot und RNase Protektionsassay, ermöglicht die Real-Time PCR die Detektion bereits kleiner mRNA-Mengen über den Zeitraum der gesamten PCR (in „real time“) mittels Generierung eines Fluoreszenzsignals während allen PCR-Zyklen. Man kennt mittlerweile vier Fluoreszenzproben: TaqMan<sup>®</sup>, Molecular Beacons, Scorpions<sup>®</sup> und SYBR<sup>®</sup> Green. Das Prinzip der Real-Time PCR mit Hilfe von SYBR Green beruht auf der Möglichkeit, anhand der Zunahme der Fluoreszenz während einer PCR-Reaktion direkt die Zunahme an doppelsträngiger DNA zu verfolgen. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green besitzt in Lösung eine nur geringe Fluoreszenz, jedoch lagert er sich in dsDNA ein und emittiert dann ein starkes Fluoreszenzsignal. Die Akkumulation der PCR-Produkte lässt sich damit anhand einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals direkt detektieren.

In dieser Arbeit wurde SYBR Green I als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Die Real-Time PCR wurde in Sheffield im Labor von Simon Foster durchgeführt. Es wurde ein PCR-Cycler von Stratagen (La Jolla, CA) und der SYBR Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ von Sigma verwendet. Für die Auswertung der Real-Time PCR ist der PCR-Zyklus entscheidend, bei dem das Fluoreszenzsignal sich gerade deutlich von der Hintergrund-Fluoreszenz abhebt. Dieser Zyklus ist der sog. CT-Wert („Cycle of Threshold“). Für eine erfolgreiche Real-Time PCR ist es notwendig, die optimale Annealing-Temperatur für jedes Primer-Paar zu ermitteln. Außerdem muss man die sog. Amplifizierungseffizienz ermitteln. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA hergestellt. Es wurde als Anfangskonzentration  $1 \times 10^{-1}$  für jedes Primer-Paar gewählt und dann eine 1:10-Verdünnungsreihe hergestellt. Für jede Verdünnung wurde der CT-Wert ermittelt (Abb. 7). Dieser CT-Wert wurde in einer Eichgeraden über der jeweiligen cDNA-Verdünnungsstufe aufgetragen. Zur Erstellung der Geraden wurde die Stratagen-Software verwendet. Diese zeichnet die Gerade und ermittelt dann deren Steigung (slope). Anhand dieser Steigung kann man schließlich die PCR-Effizienz nach folgender Gleichung berechnen:

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



**Abbildung 7:** Real-Time PCR Amplifizierungsplot. Dargestellt sind sechs 1:10-Verdünnungsstufen der cDNA (blau-türkis) sowie die Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O als Template in pink.

Um die Expression eines Gens in zwei Proben zu vergleichen, hier also in Deletionsmutante und isogenem Wildtyp, muss für jede Probe der CT-Wert mit Gen-spezifischen Primern ermittelt werden. Die Differenz der CT-Werte der zu vergleichenden Proben ist die Grundlage zur mathematischen Bestimmung der

relativen Expression. Zur Normalisierung der Proben ist es notwendig für jede Probe eine PCR-Reaktion mit einem Haushaltsgen (Referenz) durchzuführen, dessen Expression sich unter den bestehenden Bedingungen nicht ändern sollte. Es sollte hierbei die Differenz der CT-Werte nahezu Null sein. Man kann so auch kontrollieren, ob in jedem PCR-Ansatz die gleiche Menge an cDNA vorhanden war. Leichte Unterschiede werden in der Gleichung zur relativen Quantifizierung berücksichtigt (Pfaffl, 2001); ( $E = \text{PCR-Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$ ):

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

Ein Nachteil der Verwendung von SYBR Green ist, dass sich dieser Fluoreszenzfarbstoff in jede dsDNA einlagert. Dies führt dazu, dass auch ungewollte PCR-Produkte wie Primer-Dimere und andere unspezifische Reaktionsprodukte zur Fluoreszenz des Targets beitragen und damit zu einer Fehleinschätzung der Targetkonzentration führen. Nach jeder Real-Time PCR-Amplifikation wurde deshalb eine Schmelzpunkt-Analyse durchgeführt. Dabei darf für jedes Primer-Paar nur ein spezifisches Produkt mit einem spezifischen Schmelzpunkt nachweisbar sein. Ist das nicht der Fall, sind Primer-Dimere während der PCR-Reaktion entstanden, in denen sich auch der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green eingelagert hat und so zu falschen Fluoreszenzsignalen geführt hat.

#### 4.5.7.1 Quantitative RT-PCR-Analyse

Für die quantitative RT-PCR-Analyse (Real-Time PCR) wurden 2 µg RNA in cDNA umgeschrieben, wie unter 4.4.5.2 (Reverse Transkription) beschrieben. Von dieser cDNA wurde für die Erstellung der Eichgeraden eine 1:10-Verdünnungsreihe in dH<sub>2</sub>O hergestellt. Der Ansatz für die PCR-Reaktion wurde wie folgt hergestellt:

##### 25 µl Real-Time PCR-Ansatz:

12,5 µl	SYBR Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)
0,5 µl	Primer-up (10 pmol/µl)
0,5 µl	Primer-down (10 pmol/µl)
6,5 µl	dH <sub>2</sub> O
5 µl	Template (je Verdünnungsstufe)

## 4.6 Proteinbiochemische Methoden

### 4.6.1 Konstruktion rekombinanter Proteine

Die in dieser Arbeit durchgeführten Proteinexpressionen erfolgten mit Hilfe des pET-Expressionssystems der Firma Novagen (Madison, USA). Es wurde der pET28a-Vektor verwendet, der für einen T7-Promotor codiert. Dieser steht unter der Kontrolle eines *lac*-Operators und kann nach dem Prinzip der Substratinduktion aktiviert werden. Zur Inaktivierung des *lac*-Repressors wurde IPTG verwendet. Außerdem ermöglicht dieses Vektorsystem die Isolierung des Proteins mittels N-terminalen His-Tags. Für die Überexpression der rekombinanten putativen Substrate von PknB wurden die entsprechenden codierenden Sequenzen der putativen Substrate je in den pET28a-Vektor ligiert. Dazu wurden mit den entsprechenden Primern geeignete Schnittstellen angefügt. Diese sind für das jeweilige Protein verschieden und können der Tabelle 8 entnommen werden. Für die Expression der Proteine wurde der Vektor in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert. Es wurde das Protokoll des Herstellers befolgt (Novagen; Madison, USA).

### 4.6.2 Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die rekombinanten Proteine wurden in *E. coli* BL21 (DE3) mittels des Expressionsvektors pET28a (Novagen) überexprimiert. Dazu wurde der entsprechende Stamm üN in 30 ml LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin angezogen und am nächsten Morgen in 1 l LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin 1:50 angeimpft und bis OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 37 °C geschüttelt. Zum Induzieren der Überexpression wurde IPTG auf eine Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben und mindestens 4 h bei 20 °C geschüttelt. Um eine optimale Überexpression von rekombinantem PknB und YloO zu erhalten, war es nötig diese Stämme 24 h bei 20 °C zu inkubieren. Die Bakterien wurden dann für 10 min bei 5 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet trocken bei -20 °C eingefroren.

Für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde der „Protino Protein Purification System“-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Es wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Am nächsten Tag wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und in 10 ml 1x LEW-Puffer mit Protease Inhibitor Cocktail (Complete Mini EDTA-free, Roche) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden

mittels 10x 20 s Impulsen am Ultraschallgerät lysiert, wobei die Proben zwischen den Impulsen 20 s gekühlt wurden. Das Lysat wurde zweimal je 10 min bei 4 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, um Zellbruchstücke zu entfernen. Das klare Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Affinitätschromatographie ermöglicht es, Proteine mittels His-Tag aufzureinigen. Aufgrund des His-Tags bindet das Fusionsprotein an die Ni<sup>2+</sup>-Säule. Dazu wurde erst die Ni<sup>2+</sup>-Säule mit 10 ml 1x LEW-Puffer kalibriert. Dann wurde das Lysat, abgesehen von einem Aliquot für die SDS-PAGE, auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und bei -20 °C gelagert. Nun wurde zweimal mit 5 ml 1x LEW-Puffer die Säule gewaschen, wobei auch hier jeweils Aliquots des Durchflusses genommen wurden. Zum Eluieren des Proteins wurden 9 ml 1x EB-Puffer (+250 mM Imidazol) auf die Säule gegeben und das Eluat in sechsmal 1,5 ml-Fractionen aufgefangen. Die Proteinfraktionen wurden bei 4 °C gelagert.

#### **4.6.3 Entfernung des His-Tag mittels Faktor Xa-Verdau**

Für die Entfernung des His-Tags von den Fusionsproteinen PknB-His und PurA-His wurde das „Faktor Xa“-Kit der Firma Qiagen verwendet. Es wurde genau das Herstellerprotokoll angewendet. Die so erhaltenen rekombinanten Proteine konnten dann nach einem Pufferaustausch in Kinaseassays eingesetzt werden.

#### **4.6.4 Pufferaustausch von Proteinlösungen**

Für die Verwendung der Proteine im Kinaseassay ist es nötig, diese umzupuffern, da das Imidazol sowie die zu hohe Salzkonzentration des Elutionspuffers störend wirken. Um die Proteinlösungen umzupuffern wurden die „Amicon Centrifugal Filter Units“ der Firma Millipore verwendet. Diese ermöglichen durch einen selektiven Größenausschluss die Aufkonzentration des gewünschten Proteins. Gleichzeitig lassen sich auch die Reinigung des gewünschten Proteins sowie ein Pufferaustausch erreichen. Es wurde der SD75-Puffer verwendet. Die Umpufferung und Aufkonzentration der Proteine wurde streng nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

SD75 (pH 7,5):

0,02 M	HEPES
0,15 M	NaCl

#### 4.6.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Roti<sup>®</sup>-Nanoquant Lösung (Roth) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Kurz: 200 µl Proteinprobe wurden mit 800 µl 1x Roti<sup>®</sup>-Nanoquant Lösung gemischt und die Absorption bei 590 nm und 450 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde dann mittels nachfolgender Formel berechnet (basierend auf der BSA-Kalibrierungskurve):

$$\frac{A_{590\text{nm}}/A_{450\text{nm}}-0,4882}{0,0212} = \mu\text{g Protein}$$

#### 4.6.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DGE)

##### 4.6.6.1 Präparation zytoplasmatischer Proteine für 2DGE

Zur Präparation zytoplasmatischer Proteine aus *S. aureus* wurde eine mechanische Aufschlussmethode mittels Fast-Prep durchgeführt. Die Bakterien wurden in LB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 im Schüttler bei 37 °C kultiviert. Es wurden 15 ml Bakterienkultur abzentrifugiert (5 min, 6 000 rpm, 4 °C) und das Pellet zweimal mit 5 ml TE-Puffer mit Phosphatase-Inhibitoren gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 700 µl TE-Phosphataseinhibitor-Puffer aufgenommen und in „Lysing Matrix E“-Gefäße (MP Biomedicals, Heidelberg) überführt. Nun wurden die Bakterienzellen in der Fast-Prep Maschine viermal auf der Stufe 6,0 für je 30 s homogenisiert, wobei die Proben zwischen den Schritten jeweils für mindestens 1 min auf Eis gekühlt wurden. Die Proben wurden nun zentrifugiert (30 min, 12 000 rpm, 4 °C), um Zellreste und andere unlösliche Bestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und konnte bei -20 °C gelagert werden.

##### TE-Puffer mit Phosphatase-Inhibitoren:

1 mM	EDTA
10 mM	Tris
10 mM	NaF
1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>

#### 4.6.6.2 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen in der zweidimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2DGE) beruht auf der Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt in der ersten Dimension und nach ihrer Masse in der zweiten Dimension. Durch die Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten Streifen wird in der ersten Dimension eine hohe Auflösung und Reproduzierbarkeit erreicht.

Die Rehydratisierung, Isoelektrische Fokussierung (IEF), Äquilibrierung und die Elektrophorese der zweiten Dimension wurden exakt nach dem von GE Healthcare/Amersham Biosciences herausgegebenen Handbuch „2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients - Principles and Methods“ durchgeführt.

#### 4.6.7 Färbung der Proteingele

##### 4.6.7.1 Färbung der Proteingele mit ProQ<sup>®</sup> Diamond

Die Behandlung der Proteingele mit der ProQ<sup>®</sup> Diamond-Färbung (Molecular Probes, Oregon, USA) ermöglicht die Anfärbung von phosphorylierten Proteinen. Die Färbelösung interagiert spezifisch mit an Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten phosphorylierten Proteinen. Gleichzeitig erfolgt eine leichte Hintergrundfärbung aller akkumulierter Proteine, was eine leichtere Zuordnung der einzelnen Proteinspots im Laufe der Analyse erlaubt.

Die Gele wurden zweimal für 30 min in je 500 ml Fixierungslösung fixiert. Es folgten vier Waschschrte mit je 500 ml H<sub>2</sub>O für jeweils 15 min. Anschließend wurden die Gele in 450 ml 1:3 verdünnter ProQ<sup>®</sup>-Lösung für 2 h auf einem Vertikalschüttler gefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte viermal für je 30 min mit 500 ml Entfärbungslösung. Nach dem zweimaligen Waschen mit je 500 ml H<sub>2</sub>O für 10 min wurden die Gele mit Hilfe des Molecular Imager FX (BioRad) gescannt.

##### Fixierungslösung:

50 % EtOH

12 % Essigsäure

##### Entfärbungslösung:

20 % Propylenglykol

50 mM Na-Acetat, pH 4

#### 4.6.7.2 Färbung der Proteingele mit SYPRO Ruby

Die Färbelösung SYPRO Ruby (Molecular Probes, Oregon, USA) ermöglicht es, akkumulierte Proteine anzufärben und ist mit einer Coomassie Blue Färbung vergleichbar.

Nach der Färbung mit ProQ<sup>®</sup> Diamond ist eine Fixierung der Gele vor der Behandlung mit SYPRO Ruby nicht mehr nötig. Die Gele wurden direkt in 200 ml SYPRO Ruby auf einem Vertikalschüttler gefärbt und danach dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde 30 min mit Entfärbungslösung entfärbt. Die Gele wurden dann direkt am Typhoon Scanner (Amersham) mit Hilfe der ImageQuant Software eingescannt. Zur Lagerung wurden die Gele erst 15 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und dann in Folie eingeschweißt. Bei 4 °C lassen sie sich so bis zur weiteren Verwendung lagern.

#### 4.6.8 Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der Proteine wurde die MALDI-TOF-MS Analyse verwendet. Die mit SYPRO Ruby gefärbten Proteinspots wurden mit Hilfe eines „Spot Cutters“ (Proteome Work) mit einem 2 mm Pickerkopf aus dem Gel geschnitten und in eine 96-well-Mikrotiterplatte überführt. Der Trypsinverdau der Proteinproben sowie das nachfolgende Spotten der Peptidlösungen auf die MALDI-Targets erfolgte automatisch in einer „Ettan Spot Handling Workstation“ (Amersham Biosciences) und wurde wie die gesamte nachfolgende MALDI-TOF-MS Analyse in Greifswald (AG Hecker) unter Anleitung von Dr. Dörte Becher durchgeführt.

#### 4.6.9 *In vitro*-Kinaseassay

Um die Aktivität von PknB untersuchen zu können, wurde diese in *E. coli* wie unter 4.6.2 beschrieben überexprimiert und aufgereinigt. Zur Untersuchung der Phosphorylierungsaktivität von PknB wurde die Kinase mit dem bekannten Standard-Kinasesubstrat MBP (Myelin Basic Protein, Sigma) in einem radioaktiven *in vitro*-Kinaseassay inkubiert. Dazu wurden 25 µM PknB mit 50 µM MBP in 20 µl Kinasepuffer bei 37 °C inkubiert. Es wurden 0,4 µCi  $\gamma^{32}$ -ATP pro µl Reaktion verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4x SDS-Probenpuffer gestoppt

und die Proben mittels eines 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nachdem das Gel in Coomassie Blue gefärbt wurde, wurde es eingeschweißt und ein ECL-Film für mindestens 24 h aufgelegt.

Die Untersuchung putativer Substrate von PknB erfolgte ebenfalls mit Hilfe des radioaktiven Kinaseassays. Dafür wurden 1-2 µg je Protein in ebenfalls 20 µl Kinasepuffer für 20 min bei 37 °C inkubiert. Als Substrat wurden 200 µCi/µl  $\gamma$  <sup>32</sup>-ATP verwendet.

#### Kinasepuffer:

50 mM	HEPES, pH 7,5
1 mM	DTT
0,01 %	Brij35
3 mM	Mn <sup>2+</sup>
3 mM	Mg <sup>2+</sup>

### **4.6.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Analyse der Expression des *pknB*-Gens wurden Zellysatüberstände oder Gesamtzellysate der *pknB*-Deletionsmutante und des isogenen Wildtyps auf ein denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit geeigneten Antikörpern analysiert. Als Größenmarker diente der „Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™“ (BioRad).

#### **4.6.10.1 Vorbereitung der Proteinproben**

Je nach Versuchsplanung wurde eine ÜNK des gewünschten Bakterienstammes angesetzt. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur in frischem LB-Medium auf OD<sub>600</sub> = 0,05 eingestellt und man ließ sie im Schüttler bei 37 °C bis OD<sub>600</sub> = 1 wachsen. Es wurden 1 bis 4 ml Bakterienkultur entnommen und abzentrifugiert (5 min, 14 000 rpm, RT). Der Überstand wurde mit 1/10 Volumen der Probe 100%iger Trichloressigsäure (TCA) üN bei 4 °C gefällt. Das Probenpellet wurde bei -20 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das Gemisch abzentrifugiert (10 min, 14 000 rpm, RT) und das Pellet mit 500 µl kaltem Aceton einmal gewaschen. Das Aceton wurde abgegossen und die Pellets an der Luft getrocknet. Anschließend

wurden die Überstand-Proteinpellets und die Bakterienpellets in 15 µl 1x Probenpuffer aufgenommen. Zu dem Ansatz der Überstandpellets wurden zur Neutralisation der TCA 2 µl 0,5 M NaOH gegeben. Die Proteinproben wurden 5 min gekocht und dann kurz auf Eis gestellt. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE.

#### 4x Probenpuffer:

40 %	Glycerin
40 mM	0,5 M DTE
10 %	SDS
250 mM	Tris-HCl, pH 6,8
0,4 %	Bromphenolblau

#### **4.6.10.2 Herstellung eines Polyacrylamidgels**

Es wurde standardmäßig ein 12%iges Trenngel verwendet:

1,6 ml	H <sub>2</sub> O
2,0 ml	Acrylamid/bis-Acrylamid (30 %/0,4 %)
1,3 ml	1,5 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,8
0,05 ml	10 % SDS
0,05 ml	10 % Ammoniumpersulfat
0,002 ml	TEMED

Nach der Zugabe der letzten Substanz wurde das Trenngelgemisch sofort in die Gießvorrichtung pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war (~30 min), wurde das Isopropanol wieder entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Es wurde sofort ein Kamm eingesetzt und man ließ für 30 min das Sammelgel auspolymerisieren.

#### Sammelgel:

2,0 ml	H <sub>2</sub> O
0,5 ml	Acrylamid/bis-Acrylamid (30 %/0,4 %)
0,38 ml	1,0 M Tris-HCl-Puffer, pH 6,8
0,03 ml	10 % SDS
0,03 ml	Ammoniumpersulfat
0,003 ml	TEMED

### 4.6.10.3 Elektrophorese-Lauf

Für die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld wurde die Apparatur BioRad-Mini-Protean II Cell (BioRad) verwendet. Der Lauf erfolgte für ein Gel bei konstanten 44 mA und maximaler Spannung für etwa 30 min. Im Anschluss konnten die Gele gefärbt oder weiter für die Western Blot-Analyse verwendet werden.

#### 10x SDS-Laufpuffer:

30 g        Tris  
144 g       Glycin  
10 g        SDS  
ad 1 l dH<sub>2</sub>O

### 4.6.10.4 Anfärben des Gels

SDS-Gele wurden standardmäßig für 30 min in einer Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend 30 min, gegebenenfalls auch länger, in Entfärbelösung entfärbt. Um kleinere Banden sichtbar zu machen, wurde das Gel meist üN in kolloidaler Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte am nächsten Tag in H<sub>2</sub>O.

#### Färbelösung-Coomassie Blue:

0,6 g        Serva-Blau G-250  
0,6 g        Serva-Blau R-250  
454 ml      96 % EtOH  
92 ml        Eisessig  
ad 1 l dH<sub>2</sub>O

#### Entfärbelösung:

330 ml        96 % EtOH  
100 ml        Eisessig  
ad 1 l dH<sub>2</sub>O

#### Färbelösung- kolloidale Coomassie:

50 g        Ammoniumsulfat  
50 ml        85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 125 ml dH<sub>2</sub>O  
+ 0,6 g      Coomassie-Blue; 1 h lösen!  
+ 100 ml     100 % EtOH  
ad 500 ml dH<sub>2</sub>O

#### 4.6.11 Western Blot

Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zwecks Immunodetektion erfolgte mit Hilfe eines Graphit-Elektroblotters. Die Graphitplatte der Anodenseite wurde zuerst mit H<sub>2</sub>O angefeuchtet und darauf sechs Lagen mit Anodenpuffer I und drei Lagen mit Anodenpuffer II getränktes Whatmanpapier gelegt. Darauf wurde die in Anodenpuffer II getränkte Nitrozellulosemembran gelegt. Das Proteingel wurde nun luftblasenfrei auf dem Filter platziert und mit drei Lagen in Kathodenpuffer getränktem Whatmanpapier bedeckt. Dann wurde die mit H<sub>2</sub>O angefeuchtete Graphitplatte der Kathode aufgesetzt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke von 56 mA für ein Gel. Allgemein berechnet man die notwendige Stromstärke nach der Größe des Gels: 0,8 mA/cm<sup>2</sup>.

Nach dem Transfer wurde die Membran 2 h oder üN in Milch (5 % Magermilchpulver in TBS) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:200 bis 1:10 000 in TBS/5 % Magermilch) ÜN bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal mit TBST-Puffer je 15 min gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG bzw. Anti-Maus IgG, 1:5000) für 1 h bei RT. Letztlich wurde der Blot dreimal mit TBST-Puffer für je 10 min gewaschen und anschließend mit einem dünnen Film des ECL-Substrates bedeckt.

##### Anodenpuffer I:

0,3 M Tris-Base  
20 % Methanol

##### Anodenpuffer II:

25 mM Tris-Base  
40 mM ε-Amino-n-Caprinsäure  
20 % Methanol

##### Kathodenpuffer:

25 mM Tris-Base  
40 mM ε-Amino-n-Caprinsäure  
20 % Methanol

##### TBS-Puffer:

10 mM Tris-HCl; pH 7,5  
0,9 % NaCl

##### TBST-Puffer:

TBS-Puffer + 0,05 % Tween20

#### 4.6.12 Antikörperaufreinigung

Zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen PknB wurde die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> als Antigen gewählt. Die Synthese des polyklonalen anti-PknB<sub>1-274</sub> Antikörpers wurde in der Firma ImmunoGlobe (Himmelstadt) durchgeführt. Durch die Immunisierung eines Kaninchens mit dem rekombinanten Protein PknB<sub>1-274</sub> konnte anti-PknB<sub>1-274</sub>-Antiserum gewonnen werden. Dieses wurde aufgereinigt. Zur Aufreinigung und damit Gewinnung des anti-PknB<sub>1-274</sub>-Antikörpers wurde das „Immobilized Protein A“ Kit von Pierce verwendet. Die Aufreinigung beruht dabei auf der Interaktion zwischen Protein A und IgG. Es wurde genau das Protokoll des Herstellers beachtet. Kurz: 3 ml „Immobilized Protein A Plus–settled resin“ wurden mit 5 ml Binding-Buffer in einer Säule äquilibriert. Dann wurden 20 ml Antiserum mit 20 ml Binding-Buffer gemischt und auf diese Säule gegeben. Es folgte ein Waschschrift mit 5 ml Binding-Buffer. Mit 4 ml Elution-Buffer erfolgte die Elution des Antikörpers von der Säule. Es wurden sowohl vom Waschschrift als auch vom Elutionsschrift jeweils die Eluate als 1 ml Aliquots gesammelt. Zur Überprüfung wurden 10 µl je Aliquot mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

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

Unter dem Begriff MHK-Wert versteht man die kleinste Konzentration eines Antibiotikums, die noch in der Lage ist das Wachstum eines Keimes zu hemmen. Für den Versuch wurden die Bakterien einer ÜNK in 40 ml LB-Medium auf OD<sub>600</sub> = 0,05 eingestellt und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 1 bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Für den weiteren Versuch wurde die Kultur dann mit frischem LB-Medium 1:10<sup>3</sup> verdünnt. In einer 96-„well“-Mikrotiterplatte wurde anschließend eine Antibiotikum-verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurde das entsprechende Antibiotikum von einer Anfangskonzentration von 265 µg/ml ausgehend 1:2 verdünnt. Als Wachstumskontrolle blieb eine Vertiefung antibiotikafrei. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 20 µl der verdünnten Bakteriensuspension beimpft und für ~18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als MHK-Wert wurde die geringste Antibiotikumkonzentration definiert, in der keine Trübung und damit kein Bakterienwachstum sichtbar war.

## 4.8 Mikroskopie

Zum mikroskopischen Nachweis von PknB wurden zunächst die relevanten *S. aureus*-Stämme üN in LB-Medium bei 37 °C angezogen. Standardmäßig wurden der Wildtypstamm SA113 und die isogene Protein A-Mutante SA113 $\Delta$ spa verwendet. 1 ml je ÜNK (1 ml als Kontrolle!) wurde zweimal mit PBS gewaschen, die Bakterien dann in 200  $\mu$ l PBS + 3 % BSA aufgenommen und 30 min bei RT geblockt. Dann wurde 1  $\mu$ l des ersten Antikörpers (anti-PknB<sub>1-274</sub>) dazu pipettiert (nicht zur jeweiligen Kontrolle!) und es folgte für 1 h die Inkubation bei RT. Nach drei Waschschrritten mit PBS wurden die Bakterien wieder in 200  $\mu$ l PBS + 3 % BSA aufgenommen und 1  $\mu$ l des Sekundärantikörpers (FITC-anti-rabbit) dazugegeben. Nach 1 h Inkubationszeit wurden die Bakterien dreimal mit PBS gewaschen und unter Verwendung des 100er-Immersionsoobjektives wurden Fluoreszenzbilder aufgenommen.

## 4.9 Bestimmung der Biofilm-Bildung an Polystyren-Mikrotiterplatten

Für den Versuch wurde je eine ÜNK der zu untersuchenden Bakterien (hier: Wildtyp und Deletionsmutante) in 25 ml TSB-Medium angesetzt. Von diesen ÜNKs wurde dann am nächsten Tag je eine 1:200-Verdünnung in TSB+0,25 % Glucose hergestellt und eine 96-„well“-Mikrotiterplatte beimpft. Als Negativkontrolle dienten Bakterien-freie Vertiefungen. Die Platten wurden 24 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt und es folgten zwei Waschschrritte mit je 200  $\mu$ l 1x PBS. Anschließend ließ man die Platten ohne Deckel auf dem Heizblock für ungefähr 1 h bei 50 °C trocknen. Nach dieser Zeit wurden die adhärennten Bakterien mit 50  $\mu$ l Kristallviolett für 5 min gefärbt. Die überschüssige Färbelösung wurde mittels Waschen mit dH<sub>2</sub>O entfernt. Dabei ist darauf zu achten, dass kein Wasser in den Vertiefungen verbleibt. Die Färbung wurde durch Fotografieren dokumentiert.

### 10x PBS:

80 g	NaCl
11,4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2 g	KCl
2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad 1l H <sub>2</sub> O	

#### 4.10 Autolyse-Assay

Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden in TSB-Medium üN bei 37 °C inkubiert. Die Kulturen wurden 1:50 in 25 ml TSB-Medium mit 1 M NaCl verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C geschüttelt. Dann wurde die gesamte Kultur abzentrifugiert (5 min, 5 000 rpm, 4 °C) und mit 1x PBS gewaschen. Der Puffer wurde verworfen und das Pellet in 25 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 0,1 % Triton X-100 aufgenommen. Nun wurde die OD<sub>600</sub> zum Zeitpunkt 0 bestimmt. Im 37 °C-Schüttler wurden danach die Bakterienzellen inkubiert. Jede halbe Stunde wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die relative Zunahme der Lyse der Bakterien wurde nach folgender Formel berechnet:  $t = [(OD_0 - OD \text{ zum Zeitpunkt } t) / OD_0] \times 100$ .

#### 4.11 Intrazelluläre Metabolom-Analyse

Zur Analyse des intrazellulären Metaboloms wurden die Stämme in dem gewünschten Medium (LB oder CDM) bis zur jeweiligen Wachstumsphase inkubiert. Es wurden 20 ml Bakterienkultur von LB-Proben bzw. 40 ml von CDM-Proben mit einer Glaspipette schnell entnommen und zügig mit dem Filtersystem die Zellen vom Medium getrennt. Anschließend wurden die Zellen auf dem Filter zweimal mit einer dem Medium isotonen, kalten NaCl-Lösung gewaschen. Der Filter mit den Zellen wurde mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Filtersystem entfernt und direkt in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen mit 5 ml ca. 0 °C kaltem Extraktionsmittel gegeben. Als Extraktionsmittel verwendet man 60%igen (w/v) EtOH, da er die Untersuchung eines breiten Spektrums an Metaboliten erlaubt. Zu diesem Extraktionsmittel wurde außerdem vor Beginn der Probennahme ein interner Standard (Br-ATP) gegeben. Dann wurde das Röhrchen im Wechsel geschüttelt und gevortext, um die Zellen vom Filter zu spülen. Zum „Quenching“ des Metabolismus wurde das Röhrchen incl. Filter und Zellen in flüssigen Stickstoff gelegt, bis das Extraktionsmittel durchgefroren war (ca. 1-2 min). Es ist darauf zu achten, dass diese Probennahme zügig erfolgt, um den Ist-Zustand des Metabolismus „einfrieren“ zu können. Für den Zellaufschluss wurden die Proben auf Eis aufgetaut und erneut im Wechsel geschüttelt und gevortext (ca. 10 x). 1 ml Zellsuspension wurde zu, mit je 0,5 ml Glasperlen gefüllten, Stammhaltungsröhrchen pipettiert (4 Röhrchen/Probe) und die Zellen einem zweimaligen Aufschluss für 30 s bei 6 800 rpm im Homogenisator aufgeschlossen. Danach wurden die Überstände der Aliquots wieder vereinigt und die Glasperlen mit

1 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen. Zum Abtrennen der Glasperlen sowie Zelltrümmer und Proteine folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 8 000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde entnommen und mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, so dass eine Endkonzentration an organischen Lösungsmittel von ca. 10 % (Endvol. 25 ml) erreicht wurde. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert. Vor der IP-LC-MS-Analyse mussten die Proben noch durch Gefriertrocknung vom Wasser befreit werden.

#### 4.12 PurA Enzym-Assay

Die Aktivität der Adenylosuccinat-Synthase PurA wurde mit Hilfe eines Assays am Photometer bestimmt. PurA katalysiert die Umwandlung von Inosinmonophosphat (IMP) und Aspartat zu Adenylosuccinat in Anwesenheit von Guanosintriphosphat (GTP) und Mg<sup>2+</sup>. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Konzentrationszunahme von Adenylosuccinat in Anwesenheit des Enzyms und Aspartat gemessen. Diese Konzentrationszunahme lässt sich am Photometer durch eine Erhöhung der Absorption bei 280 nm verfolgen und ermöglicht so die Bestimmung der Enzymaktivität von PurA (Juang *et al.*, 1993). Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit Hilfe des Lambert-Beer Gesetzes errechnet

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

$\Delta E$  = ermittelter Extinktionskoeffizient (Steigung A/min)

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient von Adenylosuccinat bei 280 nm = 11 700 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

$d$  = Schichtdicke, 1 cm

$\Delta c$  = Änderung der Adenylosuccinat-Konzentration

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

$$v_0 = \Delta c / \Delta t = \Delta E / \epsilon \times d \times \Delta t = \Delta E \times 8,55 \times 10^{-2} \text{ (}\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}\text{)}$$

Die enzymatische Reaktion wurde in PurA-Puffer mit 0,4 mM IMP, 0,1 mM GTP, 8 mM Aspartat, 8 mM Magnesiumacetat und 50 mM HEPES bei Raumtemperatur in einer Quarzküvette durchgeführt. Das Photometer bestimmte automatisch alle zehn

Sekunden die Extinktion und errechnete die Extinktionsänderung  $\Delta E$  innerhalb einer Minute (Steigung pro Minute). Als Nullwert wurde PurA-Puffer ohne Aspartat verwendet. Die Absorptionserhöhung wurde für eine PurA-Konzentration von 2,5  $\mu\text{g}$  ermittelt, wobei drei unabhängige Messungen durchgeführt wurden. Das Enzym PurA wurde kurz vor der Messung zum Puffergemisch direkt in die Küvette gegeben, da die Reaktion sehr schnell abläuft. Die enzymatische Aktivität von PurA wird in Units pro Minute und Milligramm an Protein (U/min  $\times$  mg) angegeben. Um die Auswirkung der Phosphorylierung von PurA durch PknB auf die enzymatische Aktivität von PurA analysieren zu können, wurde die enzymatische Aktivität von phosphoryliertem PurA im Vergleich zu unphosphoryliertem PurA bestimmt. Als Kontrollen dienten Reaktionen mit PurA in An- bzw. Abwesenheit von ATP. Die Phosphorylierung von PurA durch PknB wurde wie im Kinaseassay unter 4.6.9 beschrieben durchgeführt.

## **4.13 Vergleichende Transkriptom-Analysen**

### **4.13.1 Arbeiten mit DNA-Microarrays**

Bei der Arbeit mit DNA-Microarrays ist darauf zu achten, dass man möglichst staubfrei und mit Handschuhen arbeitet. Für alle verwendeten Puffer und Lösungen wurde das Lichrosolv-H<sub>2</sub>O der Firma Merck verwendet. Zur Transkriptom-Analyse wurde die RNA aus den entsprechenden *S. aureus*-Stämmen bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 isoliert und die Gesamt-RNA mit „random“ Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Es wurde dabei eine kompetitive Microarray-Hybridisierung durchgeführt, bei der man eine Deletionsmutante mit ihrem isogenen Wildtyp vergleichen konnte. Bei der reversen Transkription wurden die Proben mittels Einbau eines an dCTP-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes (Cy5-CTP oder Cy3-CTP, Amersham Pharmacia) markiert.

### **4.13.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese**

Zur RNA-Isolierung wurde der Qiagen „RNeasy Mini Kit“ verwendet. Anschließend wurde ein DNase I-Verdau durchgeführt (s. 4.5.3). Es wurden für die cDNA-Synthese standardmäßig 10  $\mu\text{g}$  RNA mit 1  $\mu\text{g}$  „random“-Hexamer-Primer in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  vermischt und mit Hilfe des „reverse Transkriptase SuperScript III-Kits“ (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Nach Inkubation dieses Gemisches bei

70 °C für 10 min wurde der Ansatz 5 min auf Eis gestellt. Es wurden dann für die reverse Transkription folgende Komponenten dazugegeben:

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

Der Ansatz wurde bei 50 °C für 60 min im Dunkeln inkubiert. Dann wurden nochmals 1 µl SuperScript III dazupipettiert und für weitere 50 min bei 50 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 2 µl 2,5 M NaOH dazugegeben und für 15 min erfolgte dann die alkalische Lyse bei 65 °C. Zur Neutralisation wurden 12,5 µl Tris-HCl (1,0 M, pH 7,5) zum Ansatz gegeben. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Ansätze nach Anleitung des „PCR-Purification Kits“. Dazu wurden die Sonden mit 5 x Volumen an PB-Puffer gemischt und dann auf die im Kit enthaltenen Säulchen gegeben und 3 x mit PE-Puffer gewaschen. Die Sonden wurden nun mit 30 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Die Zusammensetzung der Puffer ist dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

#### 4.13.3 Vergleichende Transkriptom-Analyse von 8325Δ*pknB*

Für die Microarray-Analyse der *pknB*-Deletionsmutante im Stamm 8325 mit ihrem isogenen Wildtyp wurden die Microarrays der Firma Scienion, Berlin verwendet. Auf dem Microarray sind DNA-Sequenzen gespottet. Hierbei handelt es sich um PCR-Fragmente des *S. aureus*-Stammes N315. Diese repräsentieren 2533 ORFs dieses Stammes. Zur statistischen Auswertung dieser Daten wurde die SAM-Analyse (significance analysis of microarrays) nach Tusher *et al.* (2000) angewendet.

Für die Analyse von Microarraydaten ist es nötig Methoden anzuwenden, mit denen man ermitteln kann, ob Veränderungen in der Genexpression experimentell signifikant sind. Eine weit verbreitete Methode basiert auf der Anwendung eines konventionellen t-Tests. Dieses Testverfahren bietet jedoch die Möglichkeit, dass Unterschiede in der Genexpression durch Zufall auftreten. So findet man zum

Beispiel in einem Microarrayexperiment für 10 000 Gene 100 durch Zufall, obwohl ein p-value von 0,01 diese als signifikant berechnet hat. Um dieses Problem zu beheben, wurde von Tusher *et al.* (2000) eine spezielle statistische Methode entwickelt die mit Hilfe der Anwendung von einer Reihe von Gen-spezifischen t-Tests signifikante Unterschiede im Expressionslevel identifiziert. Für jedes Gen wird dabei ein Score auf der Basis seiner Expressionsänderung relativ zur Standardabweichung von wiederholten Messungen für dieses Gen vergeben. Gene, die dann einen Score haben, der höher als ein bestimmter Schwellenwert liegt, werden als potenziell signifikant erachtet. Die Verteilung solcher Gene die dabei durch Zufall identifiziert werden wird als „False Discovery Rate“ (FDR) bezeichnet. Der Schwellenwert kann dabei so gewählt werden, dass kleinere oder größere Sets von Genen ermittelt werden können, und FDRs werden jeweils für jede kalkuliert.

Die hybridisierten und gewaschenen Microarrays wurden mit einem GenePix 4000b Microarray-Scanner (Molecular Dynamics) und der dazugehörigen GenePix 4.0 Software eingelesen. Der Scanner verfügt über einen 532 nm (Cy3) und einen 635 nm (Cy5) Laser. Mit Hilfe des Programms GenePix Pro 4.0 erfolgte dann die Analyse der Bilder. Für die weitere statistische Untersuchung der Microarraydaten wurde die Software Acuity 4.0 (Molecular Dynamics) verwendet. Um Messfehler aufgrund der unterschiedlichen Intensitäten der Farbstoffe Cy3 und Cy5 in Abhängigkeit zur Gesamthelligkeit ausgleichen zu können und damit zu reduzieren, wurde eine LOWESS Normalisierung durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht es unterschiedliche Markierungseffizienzen und Scannereigenschaften auszugleichen sowie experimentelle Schwankungen, die z. B. aufgrund der separat durchgeführten reversen Transkription und der Markierung“ der beiden Proben (cDNA von 8325WT vs. cDNA von 8325 $\Delta$ pknB) auftreten, auszugleichen. Schließlich wurden signifikante Änderungen in der Genexpression mit Hilfe der „SAM Software“ ermittelt. Hierbei wurde der „One Class Response Type“ und eine FDR < 1,5 % angewendet. Diese Daten wurden dann nach Genen gefiltert, die mindestens eine 1,5-fache Änderung der Expression aufwiesen.

#### **4.13.4 Vergleichende Transkriptom-Analyse von 8325 $\Delta$ yloO**

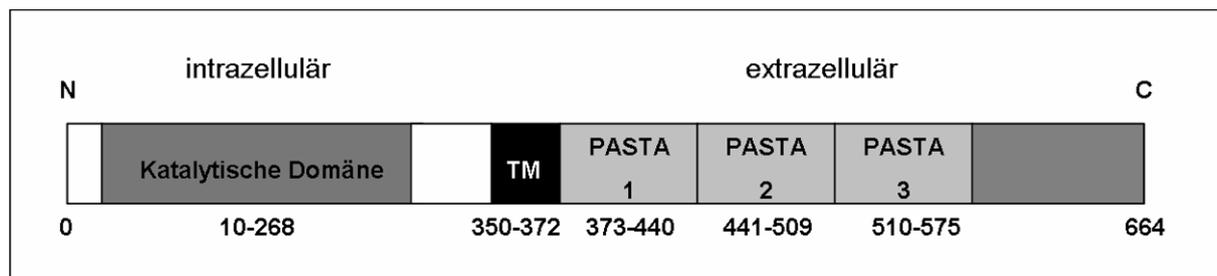
Für die Erstellung des Transkriptoms der  $\Delta$ yloO Mutante im Stamm *S. aureus* 8325 wurde ebenfalls die vergleichende Microarray-Analyse verwendet. Die RNA wurde isoliert wie bereits unter 4.13.2 beschrieben. Nach dem Fällern der RNA mit Ethanol wurde diese nach Genf in das „Genomic Research Laboratory“ des Genfer Universitätsklinikums (AG Schrenzel) geschickt. Hier wurde die Hybridisierung der Microarrays und die statistische Auswertung der Daten durchgeführt. Es wurden vier unabhängige biologische Experimente zur Hybridisierung verwendet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ANOVA Testverfahrens bestimmt und Gene mit einer x-fachen Änderung (Fold Change)  $\leq 0,5$  als stärker exprimiert in der  $\Delta$ yloO Mutante identifiziert, während Gene mit einer Fold Change  $\geq 1,0$  als vermindert exprimiert identifiziert wurden (Pohl *et al.*, 2009).

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung der Ser/Thr-Proteinkinase PknB

#### 5.1.1 *In silico*-Untersuchung von PknB

Um Gene von *S. aureus* zu identifizieren, die für eine Ser/Thr-Proteinkinase codieren, wurde eine Domänensuche („domain search“) durchgeführt, die auf der SMART- (<http://smart.embl-heidelberg.de>) und TIGR- ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)) Datenbank verfügbar ist. Es konnte ein Gen identifiziert werden, das für eine vollständige STPK, *pknB* (TIGR locus SA1063 in *S. aureus* N315), codiert. Aufgrund einer 37%igen Homologie zu PknB von *Mycobacterium tuberculosis* wurde das codierte Protein ebenfalls PknB genannt. In Abbildung 8 ist die Domänenarchitektur von PknB in *S. aureus* dargestellt. Am N-Terminus befindet sich die putativ zytoplasmatische katalytische Domäne, gefolgt von einer putativen Transmembrandomäne und den drei putativ extrazellulären Sensordomänen, den PASTA-Domänen. Die katalytische Domäne von PknB gehört mit einer hohen statistischen Wahrscheinlichkeit (*E* value von  $7,12e-70$ ) zur Familie der STPKs und besitzt alle konservierten Reste, die typisch sind für diese Familie. Interessanterweise kann im Genom des MRSA-Stammes N315 eine zweite STPK-Domäne (SA0077) identifiziert werden. Diese ist auch in den MRSA-Stämmen JH1, JH9, MRSA252 und Mu50 zu finden. Dieses 502 Aminosäure große Protein ist auf einer *SCCmec*-Kassette codiert und enthält die katalytische Domäne STYKc (*E* value von  $5,55e-12$ ), jedoch keine PASTA-Domänen.

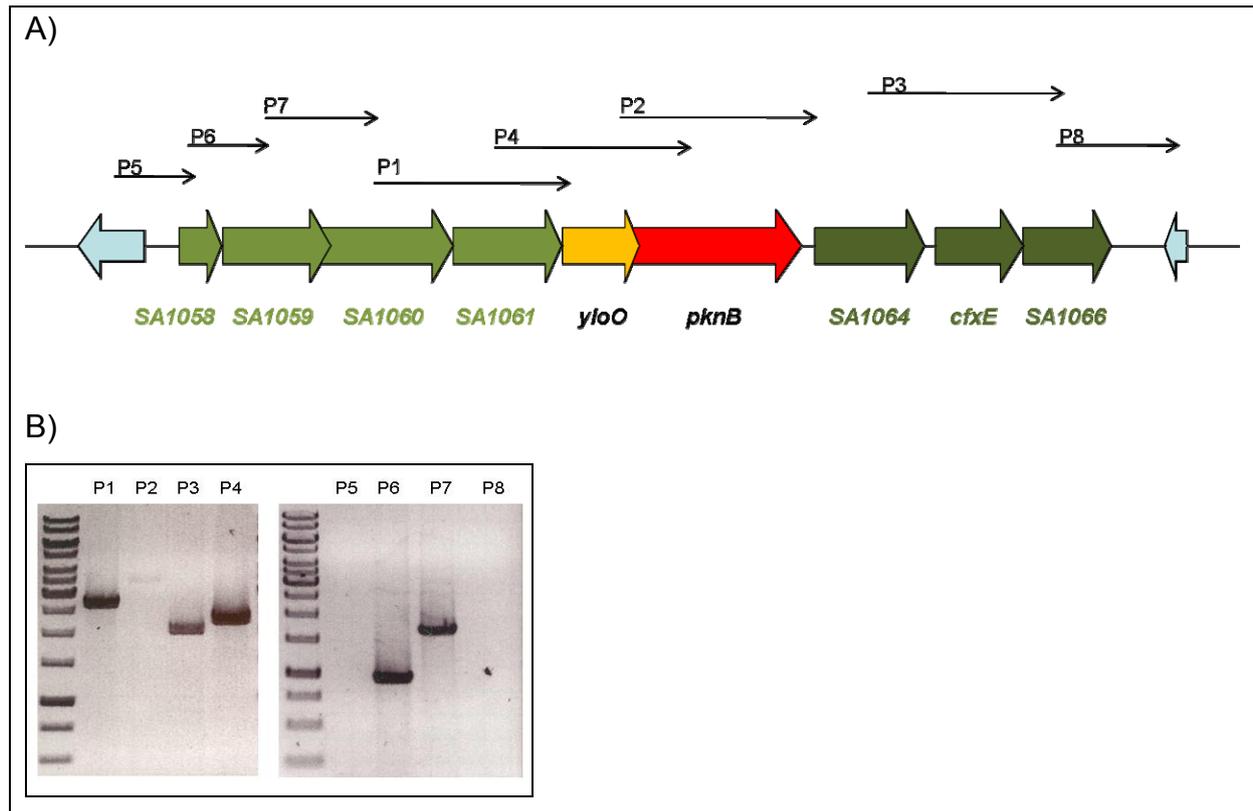


**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Domänenarchitektur der STPK PknB. Dargestellt sind N-terminal beginnend die katalytische Domäne, die Transmembrandomäne TM sowie die drei extrazellulären PASTA-Domänen.

### 5.1.2 RT-PCR-Analyse der putativen Operonorganisation der ORFs SA1058-SA1066

Es ist bereits für verschiedene Ser/Thr-Proteinkinasen gezeigt worden, dass sie in einem Operon mit ihrer korrespondierenden Ser/Thr-Proteinphosphatase transkribiert werden (z.B. PknB, *M. tuberculosis*).

Die Genomanalyse der elf annotierten *S. aureus*-Stämme (N315, Mu50, MW2, USA300, NCTC8325, MRSA252, MSSA476, RF122, Newman, JH9, COL) mittels BlastP (ncbi) zeigt, dass in allen Genomen die ORFs vorhanden sind, die für eine putative STPP und eine STPK codieren. Es wird vermutet, dass diese beiden Gene cotranskribiert werden, da sich die letzten vier Nukleotide (ATGA) der putativen STPP *yloO* mit dem ORF *pknB* überlappen. Im Folgenden wurde untersucht, ob *yloO* und *pknB* alleine ein Operon bilden, oder ob noch weitere Gene stromaufwärts und stromabwärts dieser ORFs cotranskribiert werden. Die Datenbankanalyse zeigt, dass die ORFs SA1058 bis SA1066, also sieben weitere ORFs, als ein putatives Operon vorausgesagt werden. Es wurde die Gesamt-RNA aus dem Wildtyp *S. aureus* 8325 bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 isoliert und 2 µg RNA mittels „random“-Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Die in Abbildung 9A aufgeführten Primerpaare dienten zur spezifischen Analyse der Genomregion von ORF SA1058 bis ORF SA1066. Das Primerpaar P1 sowie P4 die im Genbereich der ORFs SA1060-SA1062 bzw. SA1061-SA1063 binden, liefern beide ein PCR-Produkt, was eine Cotranskription dieser Gene vermuten lässt. Da auch die Primerpaare P6 (SA1058-SA1059) und P7 (SA1059-SA1060) das erwartete PCR-Produkt liefern (Abb. 9B), kann man von einer Organisation der ORFs SA1058-SA1063 in einem Operon ausgehen. Das Primerpaar P2 (SA1062-SA1064) liefert kein Produkt. Ebenso wie die Primerpaare P5 (SA1057-SA1058) und P8 (SA1066-SA1067) (Abb. 9B), die damit die Grenzen der Operons festlegen.



**Abbildung 9:** RT-PCR mit ausgewählten Primern zur Untersuchung der Cotranskription von *yloO* und *pknB*. In A) sind die verwendeten Primer dargestellt; B) zeigt die Ergebnisse der RT-PCR. Als Template wurde cDNA von 8325WT verwendet.

### 5.1.3 Microarray-basierte vergleichende Transkriptom-Analyse von *S. aureus* 8325 und der 8325 $\Delta$ *pknB*-Mutante

Um die Funktion von PknB in *S. aureus* charakterisieren zu können, wurde eine Deletionsmutante im Stamm 8325 hergestellt. Dies wurde im Rahmen der Dissertation von Streker K. (2005) durchgeführt. In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse dieser 8325 $\Delta$ *pknB*-Mutante mittels kompetitiver Microarray-Hybridisierung indem das Transkriptom von 8325 $\Delta$ *pknB* erstellt wurde und mit dem des isogenen Wildtypstammes verglichen wurde. Wie beschrieben, wurden die Bakterienstämme in LB-Medium angezogen und bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 die Gesamt-RNA isoliert. Für die Microarray-Analyse wurden jeweils fünf verschiedene Hybridisierungen des Stammes 8325 und der entsprechenden Deletionsmutante durchgeführt. Hierzu wurden immer vier voneinander unabhängige Gesamt-RNA-Präparationen des Wildtypstammes 8325 und 8325 $\Delta$ *pknB* eingesetzt. Die fünfte Hybridisierung wurde als Dye-Swap-Hybridisierung durchgeführt. Bei der Versuchsdurchführung wurde wie unter 4.13 aufgeführt vorgegangen.

Die Auswertung der Microarrays erfolgte mittels GenePix 4.1 Software (Molecular Dynamics) und die weiterführende statistische Auswertung der Scandaten erfolgte mit Hilfe der Acuity 4.0 Software. Dabei wurden mittels GenePix die aktuellen Intensitäten der Spots kalkuliert, indem der Durchschnittswert („mean value“) der Intensität des lokalen Hintergrundes vom Durchschnittswert der Intensität des individuellen Spots/Signals subtrahiert wurde. Die Datensets wurden dann mittels der Acuity Software normalisiert, indem ein LOWESS Algorithmus angewendet wurde. Signifikante Änderungen in der Genexpression wurden letztlich mit Hilfe von SAM (Significance Analysis of Microarrays; Tusher, *et al.*, 2001.) ermittelt. Dazu wurde der „One-Class Response Typ“ und eine „False Discovery Rate“ (FDR) von < 1,5 % angewendet. Als signifikant in ihrer Expression verändert wurden schließlich Gene mit einer x-fachen Änderung („fold change“)  $\geq 1,5$  identifiziert. Die Einteilung der ORFs in bestimmte Kategorien wurde mit Hilfe der unter KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) verfügbaren Liste des *S. aureus* N315-Genoms vorgenommen. Mit Verwendung dieses multiplen Testverfahrens konnten 72 Gene als vermindert und 185 Gene als verstärkt exprimiert in 8325 $\Delta$ *pknB* identifiziert werden.

In der  $\Delta$ *pknB*-Mutante im Stamm 8325 wurde eine Gruppe von Genen vermindert exprimiert, die in der Purin- und Pyrimidinbiosynthese eine Rolle spielen (Tab. 12). Folgende Gene des Purin-Operons zeigten eine ca. 2,0- bis 6,2-fach verminderte Expression im Vergleich zum Wildtyp: *purK*, *purQ*, *purL*, *purF*, *purM*, *purN*, *purH* und *purD*. Die Gene *pyrP*, *pyrR*, *pyrB*, *pyrC*, *pyrAA*, *pyrAB*, *pyrF* und *pyrE* des Pyrimidin-Operons wiesen eine ca. 3,1- bis 6,8-fach verminderte Expression auf. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die *pknB*-Deletion zu Defekten in der Purin- und Pyrimidinbiosynthese des Stammes 8325 führt.

Weiterhin kann man der Tabelle 12 entnehmen, dass Gene eine erniedrigte Expression aufwiesen, die eine Rolle in verschiedenen physiologischen Prozessen spielen. So war die Expression des Autolysin-Gens *atl* ca. 1,6-fach verringert. Das Gen SA2097, das für ein hypothetisches Protein mit Homologien zu lytischen Transglykosylasen codiert (*SsaA*), war ca. 2,4-fach in der Mutante vermindert exprimiert. Ebenfalls eine verringerte Expression (ca. 1,9-fach) konnte für das Gen SA1961, das für einen putativen Transkriptionsantiterminator der BglG-Familie codiert, ermittelt werden. Eine Reihe von Genen die für Transportproteine codieren wie *oppB*, *oppD*, *oppF*, *oppA*, SA2132, SA2143 und SA2200, um nur einige

aufzuführen, wiesen eine ca. 1,8- bis 2,6-fache Erniedrigung ihres Transkriptionslevels im Vergleich zum Wildtyp auf.

Neben diesen vermindert exprimierten Genen waren auch zahlreiche Gene in  $8325\Delta pknB$  verstärkt exprimiert. So wiesen die für das Zweikomponenten-System VraSR codierenden Gene, *vraS* und *vraR*, eine ca. 2,5-fach höhere Expression auf (Tab. 13). Weiterhin wurde eine Reihe von Genen in der Mutante verändert exprimiert, die am Aminosäuremetabolismus beteiligt sind. So konnte für die Gene des Histidinmetabolismus *hutH* und *hutU* eine ca. 1,9- bzw. 2,6-fach erhöhte Expression ermittelt werden, für die am Arginin- und Prolinmetabolismus beteiligten Gene *rocD* und *rocA* eine ca. 2,5- und 3,5-fache Erhöhung. Auch Gene des Glycin-, Serin- und Threoninmetabolismus wiesen eine erhöhte Expression auf. Interessanterweise waren auch Gene in der *pknB*-Deletionsmutante verstärkt exprimiert, die eine Rolle im Zitratzyklus spielen. Das für die Aconitathydratase codierende Gen *citB* wies eine höhere Expression (ca. 1,7-fach) auf, ebenso wie die Isocitratdehydrogenase *citC* (ca. 1,6-fach). Die Gene *odhA*, *odhB*, *sucC*, *sucD*, *sdhA*, *sdhB*, *citG* und SA2155, die nacheinander die Synthese von Oxoglutarat zu Malat bzw. Oxaloacetat katalysieren, zeigten eine ca. 1,5- bis 2,6-fache verstärkte Expression. Wie man Tabelle 13 weiter entnehmen kann, waren neben den genannten Genen auch Gene des Lipidmetabolismus z.B. SA0224, SA0225, SA1045 ca. 2-fach bis 3-fach sowie Gene des Energiemetabolismus *gudB* und *ald* erhöht exprimiert. Weiterhin waren die Gene *agrA* und *agrC*, das für ein SarA-Homolog codierende Gen SA2089 und das Gen *prsA* um das ca. 2- bis 3-fache in  $\Delta pknB$  erhöht exprimiert. Die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse des Stammes 8325 sind in den Tabellen 12 und 13 zusammengefasst.

**Tabelle 12:** Mittels Microarray-Experimente identifizierte Gene, die in der *S. aureus* 8325Δ*pknB*-Mutante weniger stark exprimiert wurden als im isogenen Wildtyp. Einteilung der ORFs nach KEGG. Aufgeführt sind alle Gene mit einer x-fachen Änderung  $\geq 1.5$  und  $q\text{-value} < 0.015$ .

N315 ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung
<b>Purin- und Pyrimidinbiosynthese</b>			
SA0373	<i>xprT</i>	Xanthinphosphoribosyltransferase	3.7
SA0917	<i>purK</i>	Phosphoribosylaminoimidazolcarboxylase	1.4
SA0920	<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamidinsynthetase I	2.0
SA0921	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamidinsynthetase	2.2
SA0922	<i>purF</i>	Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase	3.0 <sup>a</sup>
SA0923	<i>purM</i>	Phosphoribosylformylglycinamidincycloligase	2.5 <sup>a</sup>
SA0924	<i>purN</i>	Phosphoribosylglycinamidformyltransferase	2.2
SA0925	<i>purH</i>	Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamidformyltransferase	1.8
SA0926	<i>purD</i>	Phosphoribosylaminglycinligase	6.2 <sup>a</sup>
SA1041	<i>pyrR</i>	Pyrimidinoperonrepressor A-Kette	3.1
SA1043	<i>pyrB</i>	Aspartattranscarbamoylase A-Kette	4.1
SA1044	<i>pyrC</i>	Dihydroorotase	4.7
SA1045	<i>pyrAA</i>	Carbamoylphosphatsynthase kleine Kette	5.6
SA1046	<i>pyrAB</i>	Carbamoylphosphatsynthase kleine Kette	6.4
SA1047	<i>pyrF</i>	Orotidin-5-Phosphatdecarboxylase	6.8
SA1048	<i>pyrE</i>	Orotatphosphoribosyltransferase	5.6
<b>ABC-Transporter/Transporterproteine</b>			
SA0255		Hp*, ~ PTS beta-Glucosid-spezifisches Enzym II	2.2
SA0616	<i>vraF</i>	ABC-Transporter ATP-Bindungsprotein	1.8
SA0617	<i>vraG</i>	ABC-Transporter Permease	1.7
SA0845	<i>oppB</i>	Oligopeptidtransportsystem Permeaseprotein	1.8
SA0847	<i>oppD</i>	Oligopeptidtransportsystem ATP-Bindungsprotein OppD	2.5
SA0848	<i>oppF</i>	Oligopeptidtransportsystem ATP-Bindungsprotein OppF	2.0
SA0849	<i>oppA</i>	Hp, ~ Peptid-Bindungsprotein	2.0
SA1960	<i>mtlF</i>	PTS System, Mannitol spezifische IIBC Komponente	4.1
SA2079	<i>fhuD2</i>	Hp, ~ Ferrichrom ABC-Transporter FhuD2	1.8
SA2132		Hp, ~ ABC-Transporter	2.2
SA2143		Hp, ~ ABC-Transporter	2.6
SA2200		Hp, ~ ABC-Transporter, ATP-Bindungsuntereinheit	1.6
SA2202		Hp, ~ ABC-Transporter periplasmatisches Aminosäure-Bindungsprotein	1.9
SA2253		Oligopeptidtransporter, putative Membranpermease-Domäne	1.5
SA2302		HP, ~ ABC-Transporter	1.8
SA2434		Fructosephosphotransferasesystem Enzym, FruA Homolog	2.5
<b>Informationswege- DNA-Replikation/RNA-Synthese/Protein-Synthese</b>			
SA0442		DNA Polymerase III Untereinheit	1.7
SA1120		Hp, ~ Transkriptionsregulator GntR Familie	1.9
SA1704	<i>map</i>	Methionylaminopeptidase	1.6
SA1717		Glutamyl-tRNAGln Amidotransferase Untereinheit C	1.7
SA1961		Hp, ~ Transkriptionsantiterminator BglG	1.9
<b>Aminosäuremetabolismus und Metabolismus verwandter Moleküle</b>			
SA1121		Hp, ~ Proteinase Homolog	1.8
SA1150	<i>glnA</i>	Glutaminammonialigase	1.6
<b>Carbohydratmetabolismus und Metabolismus verwandter Moleküle</b>			
SA1945		Hp, ~ Mannose-6-Phosphatisomerase Pmi	2.5
<b>Nukleotidmetabolismus und Metabolismus von Nukleotidsäuren</b>			
SA0468		Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase Homolog	1.8

## Fortsetzung Tabelle 12

SA0687	<i>nrdF</i>	Ribonukleosiddiphosphatreduktase kleine Untereinheit	1.7
SA1921	<i>tdk</i>	Thymidinkinase	1.6
SA2375		Hp, ~ Dihydroorotatdehydrogenase	2.1
SA2410		Anaerobe Ribonukleosid-Triphosphatreduktase	1.6
<b>Coenzymmetabolismus und Metabolismus prosthetischer Gruppen</b>			
SA1442		Hp, ~ Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase	1.8
SA1734		Pyrazinamidase/Nikotinamidase Homolog	1.7
<b>Miscellaneous</b>			
SA0231		Hp, ~ Flavohämoprotein	2.0
<b>Zellwand und zelluläre Prozesse</b>			
SA0265	<i>lytM</i>	Peptidoglykanhydrolase	1.7
SA0423		Hp, ~ Autolysin	2.1
SA0531	<i>proP</i>	Proline/Betaintransporter Homolog ProP	2.1
SA0905	<i>atl</i>	Autolysin (N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase und Endo- $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase)	1.6
SA1042	<i>pyrP</i>	Uracilpermease	4.1
SA1063	<i>pknB</i>	Ser/Thr-Proteinkinase PknB	8.4
SA1302	<i>gerCC</i>	Heptaprenyldiphosphatsynthase Komponente II	2.1
SA2142		Hp, ~ Multidrug-Resistenzprotein	1.8
SA2203		HP, ~ Multidrug-Resistenzprotein	1.7
<b>Membranbioenergetik (Elektronentransportkette und ATP-Synthase)</b>			
SA0937		Cytochrome D Ubiquinoloxidase Untereinheit I Homolog	1.6
<b>Pathogenitätsfaktoren</b>			
SA2097	<i>ssaA</i>	Hp, ~ SsaA	2.4
SA2356	<i>isaA</i>	Immunodominantes Antigen A	1.6
<b>Detoxifikation</b>			
SA0781		Hp, ~ 2-Nitropropandioxygenase	1.6
<b>Unbekannte Funktion/Hypothetische Proteine</b>			
SA0269		Hp	3.2
SA0289		Chp <sup>#</sup>	1.5
SA0290		Chp	1.7
SA0291		Hp	1.6
SA0467		Hp	2.1
SA0725		Chp	1.8
SA0814		Hp	2.5
SA0885		Hp	2.6
SA1049		Hp	5.6
SA1056		Hp	1.6
SA1130		Chp	1.7
SA1890		Chp	1.8
SA2059		Hp	1.5
SA2332		Hp	2.6
SAS007		Hp	1.6

<sup>a</sup> Gene mit q-value < 0.03<sup>\*</sup> Hp: Hypothetisches Protein<sup>#</sup> Chp: Konserviert Hypothetisches Protein.

**Tabelle 13:** Mittels Microarray-Experimente identifizierte Gene, die in der *S. aureus* 8325 $\Delta$ *pknB*-Mutante stärker exprimiert wurden als im isogenen Wildtyp. Einteilung der ORFs nach KEGG. Aufgeführt sind alle Gene mit einer x-fachen Änderung  $\geq 1.5$  und q-value  $< 0.015$ .

N315 ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung
<b>Zitratzyklus</b>			
SA1244	<i>odhB</i>	Dihydrolipoamidsuccinyltransferase	2.4
SA1245	<i>odhA</i>	Oxoglutaratdehydrogenase E1	2.2
<b>Zweikomponenten-Systeme</b>			
SA0252	<i>lrgA</i>	Holin-ähnliches Protein LrgA	2.8
SA0253	<i>lrgB</i>	Holin-ähnliches Protein LrgB	2.3
SA1700	<i>vraR</i>	Zweikomponenten Responsregulator	2.7
SA1701	<i>vraS</i>	Zweikomponenten Sensorkinase	2.5
SA1843	<i>agrC</i>	“Accessory gene regulator” C	2.1
SA1844	<i>agrA</i>	“Accessory gene regulator” A	2.3
SA1882	<i>kdpD</i>	Sensorprotein	2.8
<b>ABC-Transporter/Transporterproteine</b>			
SA0209		Maltose/Maltodextrintransportpermease Homolog	2.5
SA0599		ATP-Bindungskassette Transporter A	2.5
SA1243		ABC-Transporter Homolog	1.6
SA1744		ABC-2 Typ Transportsystem/Permeaseprotein	3.9
SA1745		Hp*, ~ ABC-Transporter, ATP-Bindungsprotein	3.4
SA2227		“truncated” Hp, ~ D-Serin/D-Alanin/Glycin-Transporter	1.9
<b>Phosphotransferase-Systeme</b>			
SA0186		PTS, Sucrose-spezifische IIBC Komponente, putativ	3.1
SA0318		PTS	2.9
SA0320		Putative PTS Enzym IIA Komponente	2.8
SA1255		PTS, Glucose-spezifische Enzym IIA Komponente	2.0
SA2114	<i>glvC</i>	PTS, Arbutin-ähnliche IIBC Komponente	1.7
<b>Membranbioenergetik (Elektronentransportkette und ATP-Synthase)</b>			
SA0210		Hp, ~ NADH-abhängige Dehydrogenase	2.0
SA0411	<i>ndhF</i>	NADH Dehydrogenase Untereinheit 5	2.5
SA0799		Hp, ~ NADH-Dehydrogenase	1.5
SA1904	<i>atpC</i>	FoF1-ATP-Synthase $\epsilon$ -Untereinheit	1.8
SA1905	<i>atpD</i>	ATP-Synthase $\beta$ -Kette	1.6
<b>Zellwand und zelluläre Prozesse</b>			
SA0115	<i>sbnD</i>	Hp, ~ Multidrug-Resistenz Effluxpumpe	2.3
SA0172	<i>lmrP</i>	Hp, ~ Integrales Membranprotein	1.7
SA0207		Hp, ~ Maltose/Maltodextrin-Bindungsprotein	1.6
SA0248		Hp ~ $\beta$ -Glycosyltransferase	1.5
SA0259	<i>rbsD</i>	Ribosepermease	1.9
SA0260	<i>rbsU</i>	Hp, ~ Ribosetransporter	1.7
SA0303		Hp, ~ Natrium-gekoppelte Permease	2.2
SA0719	<i>trxB</i>	Thioredoxinreduktase	1.5
SA0758		Hp, ~ Thioredoxin	1.6
SA1283	<i>pbp2</i>	Penicillin-Bindeprotein PBP2	1.5
SA1691	<i>sgtB</i>	Hp, ~ Penicillin-Bindeprotein 1A/1B	2.5
SA1718	<i>putP</i>	Prolinpermease	2.1
SA1926	<i>murZ</i>	UDP-N-Acetylglucosamin1-Carboxylvinyltransferase 2	1.5
SA2437		Hp, ~ Autolysinvorläufer	1.9
SA2480	<i>drp35</i>	Drp35	4.1
SAS023		Hp, ~ Thioredoxin	1.5
<b>Informationswege– RNA-Synthese/Proteinfaltung/DNA-Modifikation und -Reparatur</b>			
SA0006	<i>gyrA</i>	DNA-Gyrase Untereinheit A	1.5

## Fortsetzung Tabelle 13

SA0009	<i>serS</i>	Seryl-tRNA Synthase	1.5
SA0187		Hp, ~ Transkriptionsregulator	3.9
SA0189	<i>hsdR</i>	~ Typ I Restriktionsenzym	1.9
SA0321		Hp, ~ Transkriptionsantiterminator BglG Familie	2.2
SA0480	<i>ctsR</i>	Transkriptionsrepressor Klasse III Stressgene Homolog	1.9
SA0498	<i>rplL</i>	50S ribosomales Protein L7/L12	1.5
SA0652		Hp, ~ Transkriptionsregulationsprotein	1.6
SA0653		Hp, ~ Transkriptionsrepressor des Fruktoseoperons	1.5
SA1257		Peptidmethioninsulfoxidreduktase	1.7
SA1287	<i>asnS</i>	Asparaginyl-tRNA Synthase	1.6
SA1305	<i>hu</i>	DNA-Bindungsprotein II (HB)	1.6
SA1360		Xaa-Pro Dipeptidase	1.5
SA1586	<i>rot</i>	"Repressor of toxins" Rot	1.8
SA1659	<i>prsA</i>	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase Homolog	2.9
SA1748		Hp, ~ Transkriptionsregulator, GntR Familie	2.8
SA1836	<i>groEL</i>	GroEL Protein	1.8
SA2089	<i>sarR</i>	"Staphylococcal accessory regulator" A Homolog	2.3
SA2103	<i>lytR</i>	Hp, ~ <i>lyt</i> Divergon Expressionsattenuator	2.3
SA2108		Hp, ~ Transkriptionsregulator, RpiR Familie	2.2
SA2296		Hp, ~Transkriptionsregulator, MerR Familie	2.0
<b>Aminosäuremetabolismus und Metabolismus verwandter Moleküle</b>			
SA0008	<i>hutH</i>	Histidinammonia-Lyase	1.9
SA0818	<i>rocD</i>	Ornithinaminotransferase	2.5
SA0819	<i>gudB</i>	NAD-spezifische Glutamatdehydrogenase	2.0
SA1348	<i>bfmBAA</i>	branched-chain $\alpha$ -Ketosäuredehydrogenase E1	1.5
SA1365		Glycinderhydrogenase Subunit 2 Homolog	2.4
SA1366		Glycinderhydrogenase Subunit 1	2.2
SA1367		Aminomethyltransferase	1.5
SA1531	<i>ald</i>	Alaninderhydrogenase	2.3
SA1585		Prolinderhydrogenase Homolog	3.3
SA1931	<i>blt</i>	Hp, ~ Spermin/Spermidinacetyltransferase	1.5
SA1968	<i>arg</i>	Arginase	2.4
SA2084	<i>ureC</i>	Urease $\alpha$ -Untereinheit	1.7
SA2085	<i>ureE</i>	Urease-assoziiertes Protein	1.7
SA2122	<i>hutU</i>	Urocanathydratase	2.6
SA2125		Hp, ~ Formiminoglutamase	1.9
SA2220		Glyceratkinase	2.1
SA2318		Putative L-Serinderhydratase	2.4
SA2319		Putative $\beta$ -Untereinheit der L-Serinderhydratase	2.0
SA2341	<i>rocA</i>	1-Pyrrolin-5-Carboxylatdehydrogenase	3.5
<b>Coenzymmetabolismus und Metabolismus prosthetischer Gruppen</b>			
SA0181		Hp, ~ Isochorismatase	2.0
SA0915	<i>foID</i>	bifunktionelles Protein FoID	1.7
SA1587	<i>ribA</i>	Riboflavinbiosynthese Protein	1.8
SA1588	<i>ribB</i>	Riboflavinsynthese $\alpha$ Kette	1.6
<b>Nukleotidmetabolismus und Metabolismus von Nukleotidsäuren</b>			
SA0133	<i>dra</i>	Deoxyribose-Phosphataldolase	1.7
SA0511		Hp, ~ UDP-Glucose-4-Epimerase	1.7
SA0545	<i>pta</i>	Phosphotransacetylase	1.8
SA1308		30S ribosomales Protein S1	1.8
SA1938	<i>pdp</i>	Pyrimidinnukleosidphosphorylase	1.7
SA1939		Deoxyribose-Phosphataldolase	1.8
<b>Lipidmetabolismus</b>			
SA0224		Hp, ~ 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase	2.6
SA0225		Hp, ~ Glutaryl-CoA Dehydrogenase	3.1
SA1075	<i>hmrB</i>	HmrB Protein	1.5
SA2240		Hp, ~ p-Nitrobenzylesterase A-Kette	1.5

## Fortsetzung Tabelle 13

SA2334	<i>mvaS</i>	Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase	2.0
<b>Carbohydratmetabolismus und Metabolismus verwandter Moleküle</b>			
SA0162	<i>aldA</i>	Aldehyddehydrogenase	2.7
SA0182		Hp, ~ Indol-3-Pyruvatdecarboxylase	1.8
SA0239		Sorbitoldehydrogenase	1.8
SA0258	<i>rbsK</i>	Ribokinase	2.1
SA0304	<i>nanA</i>	N-Acetylneuraminatlyase Untereinheit	2.0
SA0342		Acetyl-CoA C-Acetyltransferase Homolog	1.9
SA0823	<i>pgi</i>	Glucose-6-Phosphatisomerase A	1.5
SA0945	<i>pdhC</i>	Dihydrolipoamid S-Acetyltransferase Komponente des Pyruvatdehydrogenasekomplexes E2	1.5
SA0946	<i>pdhD</i>	Dihydrolipoamiddehydrogenase Komponente der Pyruvatdehydrogenase E3	1.5
SA0958		Myo-Inositol-1(or 4)-Monophosphatase Homolog	1.7
SA0995	<i>sdhA</i>	Succinatdehydrogenase Flavoprotein Subunit	1.7
SA0996	<i>sdhB</i>	Succinatdehydrogenase Eisen-Sulfur Protein Subunit	1.9
SA1088	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA-Synthetase $\beta$ -Subunit	1.9
SA1089	<i>sucD</i>	Succinyl-CoA-Synthetase $\alpha$ -Kette	2.2
SA1141	<i>glpK</i>	Glycerolkinase	1.8
SA1142	<i>glpD</i>	Aerobe Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase	1.8
SA1184	<i>citB</i>	Aconitathydratase	1.7
SA1517	<i>citC</i>	Isocitratdehydrogenase	1.6
SA1553	<i>fhs</i>	Formyltetrahydrofolatsynthetase	2.1
SA1554	<i>acsA</i>	Acetyl-CoA Synthetase	1.9
SA1609	<i>pckA</i>	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase	2.6
SA1669	<i>citG</i>	Fumarathydratase, Klasse-II	1.7
SA1679		Hp, ~ D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase	1.5
SA1927	<i>fbaA</i>	Fructose-bisphosphat Aldolase	1.5
SA2155		Hp, ~ Malat:Quinonoxidoreductase	1.5
SA2304	<i>fbp</i>	Fructose-bisphosphatase	1.7
SAS020		Hp, ~ Phosphoglyceratmutase	1.6
<b>Miscellaneous</b>			
SA0114	<i>sbnC</i>	Siderophorbiosyntheseprotein	1.8
SA0117	<i>sbnF</i>	Siderophorbiosyntheseprotein	1.6
SA0173		Hp, ~ Surfactinsynthetase	1.8
SA0914		Hp, ~ Chitinase B	2.3
SA1238		Hp, ~ Tellurit-Resistenzprotein	1.6
SA1549	<i>htrA</i>	Hp, ~ Serinproteinase Do, Hitze-Schock Protein	1.6
SA1606		Dehydrogenase Homolog	2.1
SA1617		Hp, ~ latentes nukleares Antigen	1.7
SA1656	<i>hit</i>	Hit-ähnliches Protein, Zell-Zyklus Regulation	1.5
<b>Pathogenitätsfaktoren</b>			
SA0091	<i>plc</i>	1-Phosphatidylinositolphosphodiesterase Vorläufer	1.5
SA0483	<i>clpC</i>	Endopeptidase	2.3
SA0909	<i>fmtA</i>	FmtA	2.3
SA1007		$\alpha$ -Hämolyisin Vorläufer	3.1
SA1752	<i>hlb</i>	„Truncated“ $\beta$ -Hämolyisin	23.1
SA1811	<i>hlb</i>	„Truncated“ $\beta$ -Hämolyisin	13.9
SA2209	<i>hlgB</i>	$\gamma$ -Hämolyisin Komponente B	2.0
SA2463	<i>lip</i>	Triacylglycerollipase Vorläufer	4.8
<b>Unbekannte Funktion/Hypothetische Proteine</b>			
SA0079		Chp <sup>#</sup>	2.3
SA0129		Hp	1.7
SA0174		Chp	2.4
SA0184		Chp	3.6
SA0185		Chp	4.5
SA0307		Chp	1.8

Fortsetzung Tabelle 13

---

SA0372	Hp	1.8
SA0403	Hp [Pathogenicity island SaPIn2] Ipl7	2.9
SA0412	Chp	2.7
SA0413	Chp	1.7
SA0546	Chp	1.9
SA0570	Hp	1.8
SA0606	Chp	2.6
SA0607	Chp	2.7
SA0707	Chp	1.9
SA0752	Hp	2.0
SA0861	Chp	1.6
SA0873	Chp	1.8
SA1001	Hp	3.0
SA1019	Chp	2.0
SA1256	Chp	1.8
SA1281	Chp	1.9
SA1331	Chp	1.7
SA1432	Chp	1.6
SA1476	Hp	2.8
SA1528	Chp	1.6
SA1529	Chp	1.7
SA1532	Chp	2.0
SA1578	Chp	1.6
SA1583	Chp	1.7
SA1618	Chp	1.7
SA1682	Chp	1.6
SA1702	Chp	2.4
SA1703	Hp	2.0
SA1712	Chp	2.2
SA1726	Hp	2.2
SA1746	Hp	3.9
SA1867	Chp	1.5
SA1925	Chp	1.5
SA1937	Chp	1.7
SA1942	Chp	2.1
SA1976	Chp	2.3
SA2221	Hp	2.4
SA2323	Chp	1.5
SA2331	Hp	1.7
SA2366	Chp	1.5
SAS089	Hp	1.6

---

Hp: Hypothetisches Protein

#Chp: Konserviert Hypothetisches Protein.

#### 5.1.4 Untersuchung der Expression ausgewählter Gene in 8325 $\Delta$ *pknB* mittels RT-PCR-Analyse

Die Microarray-Analysen haben unter Verwendung des multiplen Testverfahrens SAM gezeigt, dass 72 Gene vermindert und 185 Gene verstärkt in der  $\Delta$ *pknB*-Mutante im Stamm 8325 im Vergleich zum isogenen Wildtyp exprimiert werden. Mittels RT-PCR-Analysen sollten die Ergebnisse der Microarray-Analyse validiert werden. Dazu wurde von den in den Tabellen 12 und 13 aufgeführten Genen die relative Expression der Gene *purF*, *purH*, *fmtA*, *sgtB*, *lrgA*, *prsA* mittels semi-quantitativer RT-PCR sowie die Expression der Gene *rocA*, *rocD*, *vraS* mittels Real-Time PCR in 8325 $\Delta$ *pknB* ermittelt. Es wurden die gleichen Wachstumsbedingungen wie für die Microarray-Experimente gewählt. Die Bakterien wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,0 inkubiert. Dann erfolgte die Gesamt-RNA-Isolierung wie unter 4.5.2 beschrieben. Es wurden 2  $\mu$ g der isolierten Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und mittels semi-quantitativer RT-PCR bzw. Real-Time PCR (quantitative RT-PCR) analysiert. Als Referenzgen wurde das für die 16S rRNA codierende Gen verwendet.

Die Ergebnisse der Microarray-Analyse konnten mittels der gewählten RT-PCR-Analysen bestätigt werden. So zeigten die an der Purinbiosynthese beteiligten Gene *purF* und *purH* wie in der Microarray-Analyse eine ca. 3- bzw. 2-fach erniedrigte Expression in  $\Delta$ *pknB*. Die Transkriptom-Analyse ergab eine ca. 2,3-fach stärkere Expression des Gens *fmtA*. Das Genprodukt von *fmtA* spielt eine Rolle bei der Autolyse und in der Resistenz gegen Methicillin. Dieser erhöhte Transkriptlevel in  $\Delta$ *pknB* konnte durch eine ca. 3,5-fach erhöhte Expression mittels RT-PCR Analyse bestätigt werden. Die RT-PCR-Analyse ergab weiterhin eine verstärkte Expression des Penicillin-Bindeproteins *sgtB* (ca. 4-fach) und des Holin-ähnlichen Proteins *lrgA* (ca. 3-fach). Die Untersuchung des für die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase codierenden Gens *prsA* ergab eine ca. 3,4-fache Erhöhung der Transkription im Vergleich zu einer ca. 2,9-fachen Erhöhung in der Microarray-Analyse. Für die am Aminosäuremetabolismus beteiligten Gene *rocA* und *rocD* konnte ebenfalls in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Microarray-Analyse eine um das ca. 9- bzw. 3-fache verstärkte Expression in  $\Delta$ *pknB* ermittelt werden. Eine ca. 10-fach höhere Expression wurde mittels RT-PCR-Analyse in  $\Delta$ *pknB* für das Gen *vraS* detektiert. Die Transkriptom-Analyse zeigte bereits eine ca. 2,5-fach verstärkte Expression dieses für die Sensorkinase VraS codierenden Gens. Die RT-PCR-Experimente konnten

somit die Ergebnisse der Microarray-Analyse für die ausgewählten Gene bestätigen (Tab. 14).

**Tabelle 14:** RT-PCR Validierung des Transkriptomvergleichs 8325WT und 8325 $\Delta$ *pknB*.

Genprodukt	Gen	N315 ORF	DNA Microarray <sup>a</sup>	RT-PCR <sup>b</sup>
Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase	<i>purF</i>	SA0922	-3.0	-3.0
Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamideformyltransferase	<i>purH</i>	SA0925	-1.8	-2.0
Autolyse und Methicillin-Resistenz Protein	<i>fmtA</i>	SA0909	2.3	3.5
Hypothetisches Protein, ~Penicillin-Bindeprotein 1A/1B	<i>sgtB</i>	SA1691	2.5	4.0
Holin-ähnliches Protein	<i>lrgA</i>	SA0252	2.8	3.0
Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-Homolog	<i>prsA</i>	SA1659	2.9	3.4
1-Pyrrolin-5-Carboxylatdehydrogenase	<i>rocA</i>	SA2341	3.5	9.0
Ornithinaminotransferase	<i>rocD</i>	SA0818	2.5	3.0
Sensorkinase des VraSR-Zweikomponenten-Systems	<i>vraS</i>	SA1701	2.5	10.0

<sup>a</sup> Expression der Gene mit einer x-fachen Änderung >1,5 und einer „false discovery rate“ <1,5%.

Negative Expressionlevels beruhen auf einer verminderten Expression in  $\Delta$ *pknB* und positive auf einer verstärkten Expression im Vergleich mit dem isogenen 8325Wildtyp.

<sup>b</sup> Mittels RT-PCR ermittelte Expression. Negative Expressionlevels beruhen auf einer verminderten Expression in  $\Delta$ *pknB* und positive auf einer verstärkten Expression im Vergleich mit dem isogenen 8325Wildtyp.

### 5.1.5 Funktionelle Charakterisierung der katalytischen Domäne PknB<sub>1-274</sub>

Der Homologievergleich mit bekannten bakteriellen STPKs hat ergeben, dass PknB aus *S. aureus* 8325 die für bakterielle STPKs typische Domänenstruktur aufweist (Abb. 8; 5.1.1). Es sollte deshalb im Weiteren untersucht werden, ob das Protein PknB auch als Proteinkinase funktionell ist. Dazu wurde die katalytische Domäne in *E. coli* überexprimiert und das aufgereinigte rekombinante Protein PknB<sub>1-274</sub> in *in vitro*-Kinasereaktionen getestet. Die Überexpression, Aufreinigung und Abspaltung des His-Tag von PknB<sub>1-274</sub> wurde in Kooperation von Sonja Rakette (Universität Tübingen) durchgeführt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> hinsichtlich ihrer Autophosphorylierungsfähigkeit, kationenabhängigkeit und Fähigkeit das Modellkinasesubstrat MBP (Myelin Basisches Protein) zu phosphorylieren in *in vitro*-Kinasereaktionen mit radioaktiv-markierten ATP ( $\gamma$ <sup>33</sup>-ATP) untersucht.

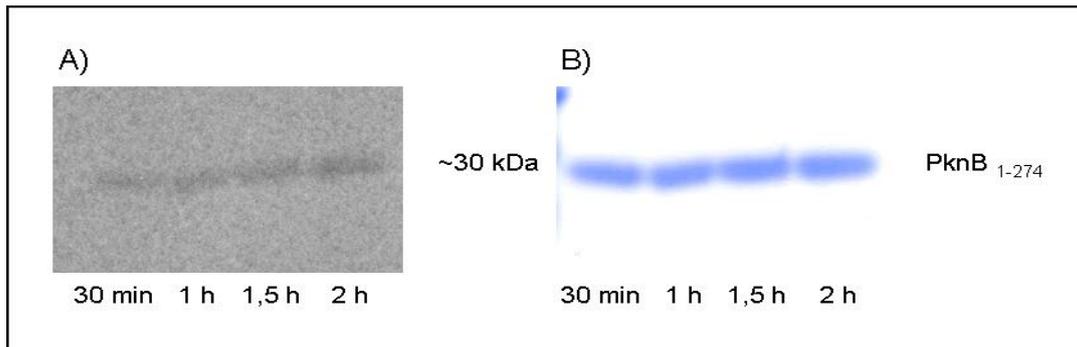
### 5.1.5.1 Die katalytischen Domäne PknB<sub>1-274</sub> besitzt Autophosphorylierungsaktivität

STPKs werden durch verschiedene Faktoren reguliert. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem Kofaktoren, Aktivator- und Inhibitorproteine sowie Pseudosubstrate. Außerdem erfolgt eine Regulation durch die Phosphorylierung im aktiven Zentrum der STPK. Diese *cis*-Phosphorylierung dient der eigentlichen Aktivierung der Kinase und ermöglicht die Übertragung des Phosphatrestes an spezifische Substrate. Der Homologievergleich mit den beschriebenen katalytischen Domänen der STPKs PknB, PknD, PknE und PknF von *M. tuberculosis* (Duran *et al.*, 2005) liefert die in Abbildung 10 dargestellte Konsensussequenz für die zur Autophosphorylierung entscheidenden Aminosäurereste im aktiven Zentrum der STPKs. Die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> von *S. aureus* 8325 weist demnach alle für diese Autophosphorylierung konservierten Aminosäurereste auf. Dabei scheinen vor allem die Threoninreste T164 und T166 die für die Phosphorylierung entscheidenden Reste zu sein.

<b>aktives Zentrum</b>	
<b>PknB</b> <i>M. tuberculosis</i>	151 KVM <b>DFGI</b> IARAIADSGNSV <b>TQT</b> AAVIGTAQYLS <b>PE</b>
Konsensus	K+ <b>DFG</b> IA+A++++ S+ <b>TQT</b> V+GT QY <b>SPE</b>
<b>PknB</b> <i>S. aureus</i>	148 KIF <b>DFGI</b> AKALSET--SL <b>TQT</b> NHVLGTVQYFS <b>PE</b>

**Abbildung 10:** Homologievergleich von PknB von *M. tuberculosis* und PknB von *S. aureus*. In rot sind die begrenzenden Aminosäuren des aktiven Zentrums der STPKs dargestellt (**DFG** und **SPE**). Weiterhin ist die Konsensussequenz aufgeführt sowie blau die konservierten autophosphorylierten Threoninreste.

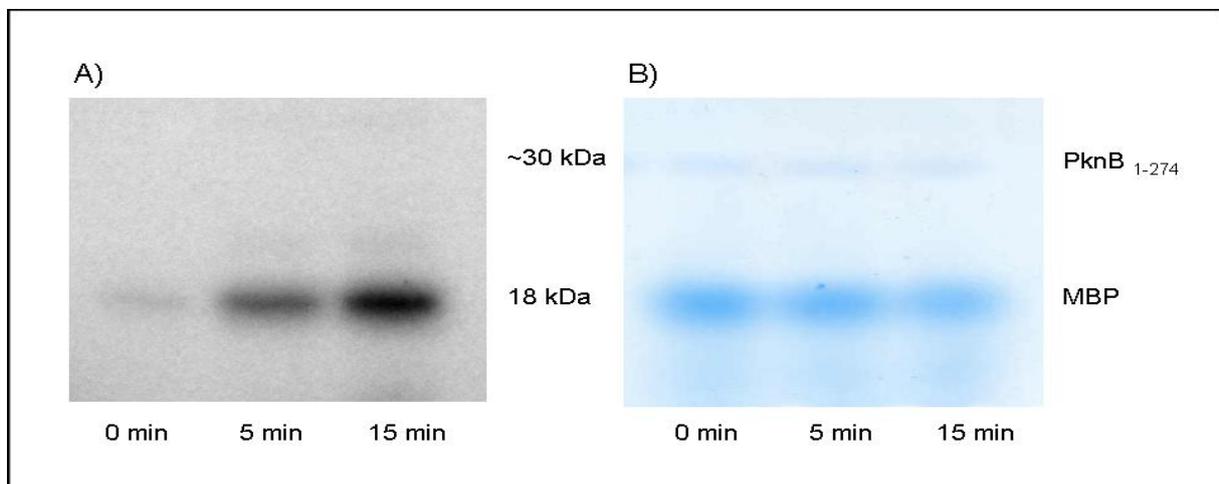
Um die *cis*-Phosphorylierungsaktivität der katalytischen Domäne PknB<sub>1-274</sub> zu untersuchen, wurde diese *in vitro* mit  $\gamma^{33}$ -ATP und in Anwesenheit von  $Mn^{2+}$  in einem HEPES-Kinasepuffer bei 37 °C inkubiert (Abb. 11). In 30 Minutenintervallen wurden Aliquots entnommen und mittels 12%igem SDS-PAGE aufgetrennt und anschließender Autoradiographie visualisiert. Wie man in Abbildung 11A sieht, weist PknB<sub>1-274</sub> eine deutliche Autophosphorylierungsaktivität auf, die mit zunehmender Inkubationszeit verstärkt wird.



**Abbildung 11:** Autophosphorylierung der katalytischen Domäne PknB<sub>1-274</sub>. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mittels 12%igem SDS-PAGE analysiert. A)  $\gamma^{33}$ -ATP Phosphorylierung; B) Coomassie Blue gefärbtes Gel.

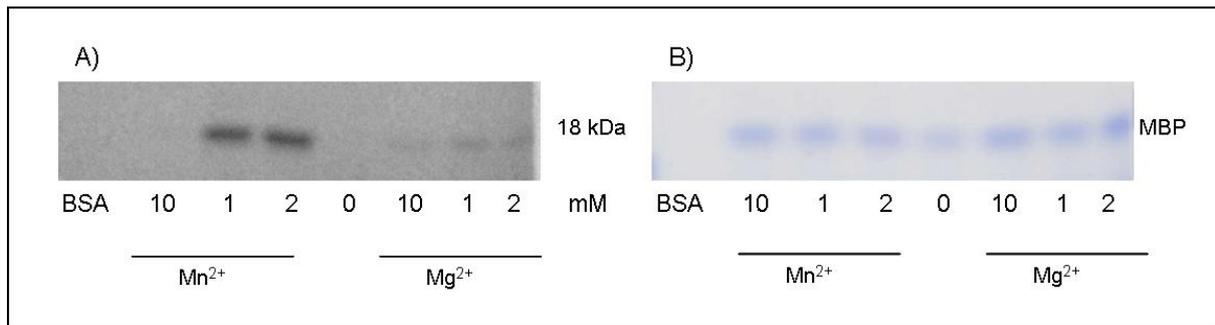
### 5.1.5.2 PknB<sub>1-274</sub> phosphoryliert MBP zeit- und kationenabhängig

Des Weiteren sind STPKs fähig das Modellsubstrat MBP (Myelin Basisches Protein) zu phosphorylieren. Die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> phosphoryliert MBP zeitabhängig. Bereits nach 5 min Inkubationszeit kann man eine deutliche Phosphorylierung erkennen (Abb. 12A). Diese lässt sich durch eine Verdopplung der Reaktionszeit ebenfalls deutlich um das ca. 2-fache verstärken.



**Abbildung 12:** Zeitabhängige Phosphorylierung des konventionellen Kinasesubstrats MBP. A)  $\gamma^{33}$ -ATP Phosphorylierung; B) Coomassie Blue gefärbtes Gel.

PknB<sub>1-274</sub> benötigt zur Aktivierung als Kofaktor divalente Kationen. Bakterielle STPKs bevorzugen dabei die Kationen Mg<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup>. Es wurde im Folgenden getestet, inwiefern diese die Phosphorylierungsaktivität von PknB<sub>1-274</sub> beeinflussen.



**Abbildung 13:** Abhängigkeit der Phosphorylierungsaktivität von PknB<sub>1-274</sub> von den divalenten Kationen Mn<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>. Getestet wurde die Phosphorylierung von MBP in Anwesenheit unterschiedlicher Kationenkonzentrationen. A) <sup>33</sup>P-ATP Phosphorylierung; B) Coomassie Blue gefärbtes Gel.

Die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> wurde in Anwesenheit von <sup>33</sup>P-ATP und MBP in einem HEPES-Kinasepuffer bei 37 °C inkubiert. Dieser enthielt verschiedene Konzentrationen an divalenten Kationen. Wie das Radiogramm 13A zeigt, werden divalente Kationen für die Phosphorylierung von MBP durch PknB<sub>1-274</sub> benötigt. Sowohl ohne Mn<sup>2+</sup> als auch ohne Mg<sup>2+</sup> besitzt PknB<sub>1-274</sub> keine Phosphorylierungsaktivität. Am stärksten erfolgt die Phosphorylierung in Anwesenheit von 1-2 mM Mn<sup>2+</sup>, während mit derselben Konzentration Mg<sup>2+</sup> nur eine deutlich schwächere Reaktion im gleichen Zeitraum stattfindet. Sowohl 10 mM Mn<sup>2+</sup> als auch 10 mM Mg<sup>2+</sup> inhibieren jedoch die Phosphorylierungsreaktion vollständig. PknB<sub>1-274</sub> ist demnach eine Mn<sup>2+</sup>-abhängige STPK.

Insgesamt zeigten die *in vitro*-Kinasereaktionen, dass die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> eine funktionelle Kinase ist, die sowohl *cis*- als auch *trans*-Phosphorylierungsaktivität besitzt. Des Weiteren phosphoryliert PknB<sub>1-274</sub> das Modellsubstrat MBP in Abhängigkeit von der Zeit und den vorhandenen Kationen, wobei Mn<sup>2+</sup> der bevorzugte Kofaktor *in vitro* ist.

### 5.1.6 Identifizierung putativer Phosphorylierungsstellen von PknB mittels MS-Analyse

Im Genom von *M. tuberculosis* sind elf Ser/Thr-Proteinkinasen identifiziert worden. Vier dieser STPKs, PknB, PknD, PknE und PknF, weisen ein konserviertes Phosphorylierungsmuster auf (Duran *et al.*, 2005). Entscheidend für die Auto-phosphorylierungsaktivität der STPKs sind dabei die konservierten Serin- und Threoninreste im aktiven Zentrum (Aktivierungsloop) dieser Kinasen.

Wie unter 5.1.5.1 und 5.1.9.2 gezeigt werden konnte, ist PknB von *S. aureus* fähig zur Autophosphorylierung. Um die für die Phosphorylierungsaktivität wichtigen Phosphorylierungsstellen identifizieren zu können, wurden sowohl die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> als auch die gesamte Proteinkinase PknB mittels Trypsinverdau und anschließender MS-Analyse untersucht. Dazu wurden PknB<sub>1-274</sub> und PknB in einem *in vitro*-Kinaseassay mit ATP und Mn<sup>2+</sup> für 2 min bei 37 °C inkubiert, um die Autophosphorylierung zu erreichen. Dann wurden die phosphorylierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und zur MS-Analyse nach Greifswald geschickt (Kooperation mit D. Becher). Der Phosphorylierungsstatus der tryptischen Peptide der beiden rekombinanten Proteine PknB<sub>1-274</sub> und PknB (His-Tag-Fusionsprotein) ist in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 15:** Phosphorylierungsstellen der rekombinanten Proteine PknB und PknB<sub>1-274</sub>.

	Phosphorylierte tryptische Peptidsequenz	-PO <sub>4</sub> - Gruppen	Phosphorylierte AS-Reste	Score <sup>a</sup>
<b>PknB</b>				
15-36	K.LGGGGMS#TVYLAEDTILNIK.V	1	S22	4,82
156-183	K.ALSETSLTQT#NHVLGT#VQYFSPEQAK.G	2	T166, T172	6,21
156-183	K.ALSET#SLT#QTNH#VLGTVQYFSPEQAK.G	2	T161,T164,H168	7,21
156-183	K.ALSET#S#LTQT#NHVLGTVQYFSPEQAK.G	3	T161,S162, T166	5,44
156-183	K.ALSETSLTQT#NH#VLGT#VQYFSPEQAK.G	3	T166,H168, T172	5,67
156-183	K.ALSETSLTQT#NHVLGTVQYFSPEQAK.G	1	T166	7,11
156-183	K.ALSET#SLTQT#NHVLGTVQYFSPEQAK.G	2	T161, T166	5,94
156-183	K.ALSETSLTQTNHVLGTVQYFSPEQAK.G	0	/	5,49
156-183	K.ALSETSLTQT#NH#VLGTVQYFSPEQAK.G	2	T166, H168,	5,44

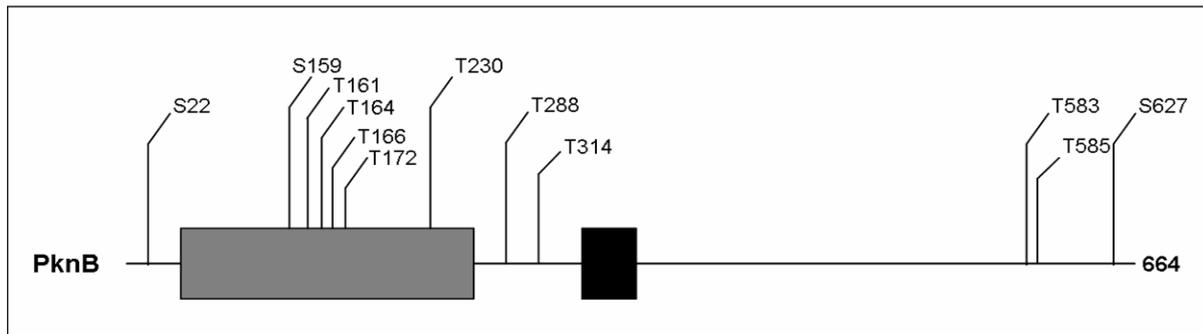
Fortsetzung Tabelle 15

220-235	K.HIQDSVPNVT#TDVR.K	1	T230	5,18
285-294	K.M*KT#IAVPLK.K	1	T288	2,40
311-330	K.RET#TQVPIVNGPAHHQQF.Q	1	T314	5,46
575-599	K.SDSSDVKT#TTESVDVPYTGK.N	1	T583	4,58
584-599	K.TTT#ESVDVPYTGK.N	1	T585	4,32
620-631	K.GSFDITS#DQR.I	1	S627	3,30
<b>PknB<sub>1-274</sub></b>				
15-36	K.LGGGGMS#TVYLAEDTILNIK.V	1	S22	4,01
156-183	K.ALS#ET#SLTQT#NHVLGTVQYFSPEQAK.G	3	S159,T161, T166	4,99
156-183	K.ALS#ETSLTQTNHVLGTVQYFSPEQAK.G	1	S159	6,52
156-183	K.ALSETSLTQTNHVLGTVQYFSPEQAK.G	0	/	5,43
156-183	K.ALSET#SLT#QTNH#VLGTVQYFSPEQAK.G	2	T161,T164, H168	7,14
156-183	K.ALSETSLTQT#NHVLGTVQYFSPEQAK.G	1	T166	6,80
156-183	K.ALS#ETSLT#QTNHVLGTVQYFSPEQAK.G	2	S159, T164	6,21
220-235	K.HIQDSVPNVT#TDVRK.D	1	T230	5,02

In der Tabelle aufgeführt sind die mittels MS-Analyse identifizierten tryptischen Peptide und deren Phosphorylierungsstatus.

<sup>a</sup> Der Score gibt die Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen Phosphorylierung der angegebenen Reste an. Je größer dieser ist, umso wahrscheinlicher findet die Phosphorylierung statt. Bei  $z=2$  sollte der Score  $>2$  liegen.

Wie man anhand der in Tabelle 15 aufgeführten tryptischen Peptide erkennen kann, liegen die meisten Phosphorylierungsstellen innerhalb der katalytischen Domäne (AS 10-268) von PknB. Es konnten fünf Aminosäurereste im aktiven Zentrum als phosphoryliert identifiziert werden: S159, T161, T164, T166 und T172. Des Weiteren wurden die Threoninreste T230, T288 und T314 sowie der Serinrest S22 außerhalb des Aktivierungsloops als phosphoryliert identifiziert (Abb. 14). Interessanterweise waren auch drei AS-Reste außerhalb der dritten PASTA-Domäne am C-terminalen Ende von PknB phosphoryliert: T583, T585 und S627.



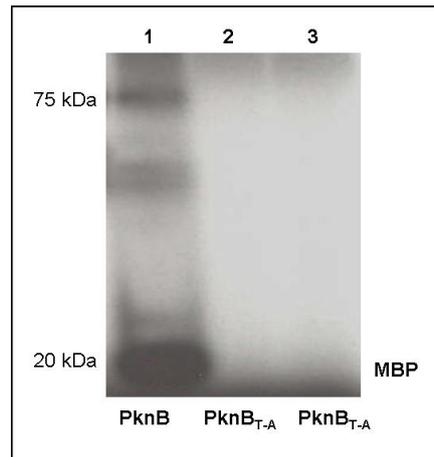
**Abbildung 14:** Mittels MS-Analyse identifizierte autophosphorylierte Aminosäurereste von PknB. Die katalytische Domäne ist in Grau dargestellt (AS 10-268), die putative Transmembrandomäne in Schwarz (AS 350-372).

### 5.1.6.1 Einfluss der autophosphorylierenden Threoninreste T164 und T166 auf die Kinaseaktivität von PknB

Mittels Massenspektrometrie konnten vor allem im aktiven Zentrum der STPK PknB fünf autophosphorylierende Aminosäurereste identifiziert werden: S159, T161, T164, T166 und T172 (Tab. 15 und Abb. 14). Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung dieser Aminosäurereste eine entscheidende Rolle für die Kinaseaktivität von PknB spielt, wurden die Threoninreste T164 und T166 durch die Aminosäure Alanin mittels Mutagenese ausgetauscht. Diese „site directed Mutagenese“ wurde von der Firma Sloning BioSells (Puchheim) durchgeführt. Das so entstandene Mutantenprotein PknB<sub>T-A</sub> (PknB<sub>T-A</sub>-His) wurde durch Überexpression in *E. coli* erhalten und in einem *in vitro*-Kinaseassay auf seine Fähigkeit das konventionelle Substrat MBP zu phosphorylieren getestet.

PknB phosphoryliert MBP nach 20 min Inkubation in Anwesenheit von  $\gamma^{32}$ -ATP und  $Mn^{2+}$  als Kofaktor (Abb. 15). Dagegen zeigte das Radiogramm keine Phosphorylierung von MBP durch die Substitutionsmutante PknB<sub>T-A</sub> sowohl nach 20 als auch nach 30 min Inkubation.

Die Substitution der Threoninreste T164 und T166 durch Alanin führte demnach zu einem kompletten Verlust der Fähigkeit von PknB<sub>T-A</sub> MBP zu phosphorylieren. Es kann vermutet werden, dass die Reste T164 und T166 des aktiven Zentrums entscheidend für die Kinaseaktivität von PknB sind.



**Abbildung 15:** PknB und PknB<sub>T-A</sub> Phosphorylierung des konventionellen Kinasesubstrats MBP. Rekombinantes PknB und PknB<sub>T-A</sub> wurden mit MBP und  $\gamma^{32}$ -ATP in einem HEPES-Kinasepuffer bei 37 °C für 20 min (Spur 1: PknB; Spur 2: PknB<sub>T-A</sub>) bzw. 30 min (Spur 3: PknB<sub>T-A</sub>) mit Mn<sup>2+</sup> inkubiert und in einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels anschließender Autoradiographie visualisiert.

### 5.1.7 Identifikation von putativen Substraten von PknB durch Phosphoproteom-Analysen

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Proteinphosphorylierung an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten nicht nur in Eukaryoten stattfindet und dort eine wichtige Rolle spielt, sondern dass man diese posttranslationale Proteinmodifikation auch in gramnegativen und grampositiven Bakterien finden kann (Cozzone *et al.*, 2004; Deutscher & Saier, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Proteinkinasen unter anderem im Metabolismus, der Stressantwort und Sporulation verschiedener Prokaryoten eine wichtige regulatorische Rolle spielen (Vincent *et al.*, 2000; Madec *et al.*, 2002; Rajagopal *et al.*, 2006). Außerdem tragen sie zur Virulenz verschiedener pathogener Bakterien bei (Cozzone *et al.*, 2005). Obwohl viele bakterielle Proteinkinasen identifiziert und biochemisch charakterisiert wurden, weiß man dennoch nur relativ wenig über deren Funktion sowie deren endogene Substrate und extrazellulären aktivierenden Signale.

Um diese Substrate der Ser/Thr-Proteinkinase PknB zu identifizieren, wurde im Folgenden ein Phosphoproteom der *S. aureus*-Wildtypstämme 8325, COL und SH1000 und deren isogenen  $\Delta pknB$ -Mutanten in Kooperation mit der Universität Greifswald (AG Engelmann) erstellt. Dazu wurden die zytoplasmatischen Proteinextrakte dieser Stämme bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 isoliert und mittels 2DGE aufgetrennt. Diese Gele wurden dann nacheinander einer Doppelfärbung unterzogen, wobei in einem ersten Schritt die phosphorylierten Proteine mittels ProQ-Färbung

detektiert wurden und in einem zweiten Schritt alle akkumulierten Proteine mittels SYPRO-Ruby angefärbt wurden. Man erhielt so von jedem Stamm zwei Gelbilder, die man mit Hilfe der Delta2D-Software (Decodon, Greifswald) zusammen analysieren konnte. Es galt nun Spots aus der Gesamtheit herauszufiltern, die eine definierte Änderung in der SYPRO- oder ProQ-Intensität in der  $\Delta pknB$ -Mutante verglichen mit dem Wildtyp erfahren haben. Deshalb wurde für die statistische Auswertung ein absoluter Schwellenwert (Threshold) von 1,5 festgelegt. Dabei wird die 1,5-fache Änderung sowohl für die Induktion als auch für die Repression berücksichtigt. Außerdem wurden die Spots mittels MS-MS-Analyse bezüglich ihres Phosphorylierungsstatus überprüft. Proteine, die eine  $<$  oder  $>$  1-fache Veränderung in ihrem ProQ- und damit Phosphorylierungssignal erfahren wurden als vermindert bzw. verstärkt phosphoryliert in der Mutante angesehen. In den Tabellen 16, 17 und 18 sind je nach Stammhintergrund als „Akkumulation in der Mutante“ die Ratio  $\Delta pknB$ -Mutante/Wildtyp auf SYPRO-Ebene sowie unter „ProQ-Signal in der Mutante“ die Ratio  $\Delta pknB$ -Mutante/Wildtyp auf ProQ-Ebene angegeben.

**Tabelle 16:** Deregulierte Proteine der  $\Delta pknB$ -Mutante 8325 nach Phosphoproteom-Analysen.

Annotation	ORF	ProQ-Signal in der Mutante <sup>b</sup>	Akkumulation in der Mutante <sup>a</sup>
Ribosomales Protein S4	SAOUHSC_01829	unverändert (~0,9)	induziert (~3)
Adenylosuccinat-Synthase PurA	SAOUHSC_00019	verringert (~0,6)	unverändert (~0,9)
5S rRNA E-loop Bindeprotein Ctc/L25/TL5	SAOUHSC_00474	verringert, da nicht gefunden	induziert (~1,7)
Translationselongationsfaktor Tu	SAOUHSC_00530	verringert (~0,7)	unverändert (~0,9)
Responseregulator GraR	SAOUHSC_00665	verringert (~0,5)	verringert (~0,8)
HP	SAOUHSC_00767	verringert (~0,6)	unverändert (~1)
Enolase Eno	SAOUHSC_00799	verringert (~0,6)	verringert (~0,8)
“Glycine Cleavage System H” Protein	SAOUHSC_00836	verringert (~0,7)	induziert (~1,6)
Glutamatdehydrogenase, NAD-spezifisch, GudB	SAOUHSC_00895	verringert (~0,8)	verringert (~0,6)
HP/HAM1 Protein	SAOUHSC_01107	verringert (~0,6)	induziert (~1,2)
HP/CbbQ/NirQ/NorQ/GpvN Familie Protein	SAOUHSC_01413	verringert (~0,5)	induziert (~1,7)

Fortsetzung Tabelle 16

2-Oxoisovaleratdehydrogenase, E1 Komponente, $\beta$ -Untereinheit, putativ	SAOUHSC_01612	verringert (~0,7)	unverändert (~1,1)
"Glycine Cleavage System P"-Protein	SAOUHSC_01632	verringert (~0,6)	verringert (~0,8)
HP	SAOUHSC_01672	verringert (~0,8)	induziert (~3,4)
Transkriptionselongationsfaktor GreA	SAOUHSC_01714	verringert (~0,7)	induziert (~1,5)
Triggerfaktor Tig	SAOUHSC_01779	verringert (~0,7)	induziert (~2,2)
HP/RNAIII-aktivierendes Protein	SAOUHSC_01964	verringert (~0,4)	verringert (~0,7)
Ferritin, putativ	SAOUHSC_02108	verringert (~0,6)	verringert (~0,8)
HP/Hydrolase	SAOUHSC_02594	verringert (~0,7)	induziert (~1,7)
Fructose-bisphosphat-Aldolase Klasse-I, putativ	SAOUHSC_02926	verringert (~0,4)	verringert (~0,5)
DNA-Gyrase, B Untereinheit	SAOUHSC_00005	erhöht (~1,8)	unverändert (~1)
HP/Chaperonprotein HchA	SAOUHSC_00533	erhöht (~3,5)	unverändert (~1)
L-Ribulokinase	SAOUHSC_00534	erhöht (~2,3)	induziert (~1,2)
Alkoholdehydrogenase I, putativ	SAOUHSC_00608	erhöht (~1,6)	verringert (~0,5)
HP/Fumarylacetoacetylhydrolase	SAOUHSC_00906	erhöht (~2,7)	unverändert (~1)
Oligoendopeptidase F	SAOUHSC_00937	erhöht (~5)	induziert (~1,3)
Malonyl CoA-Acyl-Carrierprotein-Transacylase	SAOUHSC_01198	erhöht (~5)	induziert (~1,3)
HP	SAOUHSC_01415	erhöht (~1,2)	induziert (~3)
HP/Pyridinnukleotid-Disulfidoxidoreduktase	SAOUHSC_01499	erhöht (~2,2)	induziert (~1,2)
Co-Chaperone GrpE	SAOUHSC_01684	erhöht (~3,8)	induziert (~3,7)
Format-Tetrahydrofolatligase, putativ	SAOUHSC_01845	erhöht (~2,4)	unverändert (~0,9)
D-Aminosäure-Aminotransferase	SAOUHSC_01867	erhöht (2,5)	unverändert (~0,9)
HP	SAOUHSC_02383	erhöht (~2,6)	induziert (~1,3)
HP/50S ribosomales Protein L4	SAOUHSC_02511	erhöht (~1,3)	induziert (~1,6)

<sup>a</sup> Akkumulation in der Mutante: Ratio  $\Delta pknB$ -Mutante/Wildtyp auf SYPRO-Ebene (alle Proteine).

<sup>b</sup> ProQ-Signal in der Mutante: die Ratio  $\Delta pknB$ -Mutante/Wildtyp auf ProQ-Ebene (phosphorylierte Proteine).

HP: Hypothetisches Protein.

Eine verminderte Ratio Mutante/Wildtyp auf ProQ-Ebene zeigten im *S. aureus*-Stamm 8325 19 Proteine, u. a. Adenylosuccinat-Synthase PurA (0,6-fach), Transkriptionsregulator GreA (0,7-fach), Glutamatdehydrogenase GudB (0,8-fach), Triggerfaktor Tig (0,7-fach), Translationelongationsfaktor Tu (0,7-fach), Enolase Eno (0,6-fach) und Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (0,4-fach). Interessanterweise gibt es auch einige Proteine, die ein erhöhtes ProQ-Signal in 8325 $\Delta$ *pknB* zeigten. Dazu zählen u. a. D-Aminosäuretransferase (2,5-fach), Co-Chaperon GrpE (3,8-fach), Alkoholdehydrogenase I (1,6-fach) und Chaperon HchA (3,5-fach) (Tab. 16).

Neben dem Stamm 8325 wurden auch die Stämme COL und SH1000 mittels 2DGE und anschließender Phosphoproteom-Analyse untersucht. Der MRSA-Stamm COL exprimiert ebenfalls eine Ser/Thr-Proteinkinase PknB. Dieses Protein ist jedoch nur 502 aa groß und exprimiert keine PASTA-Domänen. Das Fehlen der PASTA-Domänen im Stamm COL sollte das Phosphorylierungsmuster der Proteine im Vergleich zu den Stämmen 8325 und SH1000 beeinflussen. Neun Proteine wiesen eine verminderte Ratio  $\Delta$ *pknB*-Mutante/Wildtyp bei der ProQ-Färbung im Stamm COL auf (Tab. 17). Dazu zählen: Thioredoxin (0,4-fach), „Glycine Cleavage System H“-Protein (0,5-fach), Coenzym A Disulfidreduktase Cdr (0,5-fach), Sun-Protein (0,4-fach), „Heat Shock“ Protein HslU (0,3-fach), Hydrolase (0), 3-Deoxy-7-Phosphoheptulonat-Synthase (0,4-fach) sowie ein konserviertes hypothetisches Protein SACOL2133 (0,5-fach) und die Mur-Ligase (0,6-fach).

**Tabelle 17:** Deregulierte Proteine der  $\Delta$ *pknB*-Mutante COL nach Phosphoproteom-Analysen.

Annotation	Gene-ORF	ProQ-Signal in der Mutante <sup>b</sup>	Akkumulation in der Mutante <sup>a</sup>
Glutamyl-tRNA-Synthetase	SACOL0574	unverändert (~1)	induziert (~1,9)
Ribosomale Untereinheit "interface" Protein	SACOL0815	unverändert (~1)	verringert (~0,6)
Enolase Eno	SACOL0842	unverändert (~1)	verringert (~0,5)
Pyruvatdehydrogenase, E1-Komponente, $\beta$ Untereinheit	SACOL1103	unverändert (~1)	verringert (~0,6)
Phosphoglucomutase/Phospho mannomutase Family-Protein	SACOL2501	unverändert (~0,9)	verringert (~0,5)
Thioredoxin, putativ	SACOL0875	verringert (~0,4)	nicht gefunden
"Glycine Cleavage System H" Protein	SACOL0877	verringert (~0,6)	verringert (~0,8)

Fortsetzung Tabelle 17

Coenzym A Disulfidreductase Cdr	SACOL0975	verringert (~0,5)	verringert (~0,8)
Sun-Protein	SACOL1229	verringert (~0,4)	unverändert (~1)
“Heat Shock Protein” HslVU, ATPase Untereinheit HslU	SACOL1271	verringert (~0,3)	unverändert (~0,9)
Hydrolase,	SACOL1365	verringert, da nicht gefunden	induziert (~1,7)
3-Deoxy-7-Phosphoheptulonatsynthase	SACOL1787	verringert (~0,4)	verringert (~0,7)
Mur-Ligase Protein	SACOL1951	verringert (~0,6)	unverändert (~1)
CHP	SACOL2133	verringert (~0,5)	verringert (~0,8)
RNA-Methyltransferase, TrmH-Familie	SACOL0578	erhöht (~1,2)	verringert (~0,4)
CHP	SACOL0721	erhöht (~2,4)	induziert (~1,2)
Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase GapA1	SACOL0838	erhöht (~2,1)	verringert (~0,5)
Phosphoglyceratmutase, Pgm	SACOL0841	erhöht (~1,7)	nicht gefunden
Phospholipidsynthese-Protein	SACOL1243	errhöht (~1,5)	verringert (~0,7)
Malonyl CoA-Acyl Carrier Protein Transacylase FabD	SACOL1244	erhöht (~2,7)	verringert (~0,8)
Transkriptionsregulator, GntR Familie, putativ	SACOL1296	erhöht (~4)	induziert (~1,4)
CHP	SACOL1447	erhöht (~1,7)	induziert (~1,8)
TPR-Domain-Protein	SACOL1503	erhöht (~1,4)	induziert (~1,7)
Transkriptionselongationsfaktor GreA	SACOL1665	erhöht (~1,7)	induziert (~1,1)
Triggerfaktor	SACOL1722	erhöht (~2,1)	unverändert (~1,1)
CHP	SACOL0721	erhöht (~2,4)	induziert (~1,2)
MutT/Nudix Family-Protein	SACOL1724	erhöht (~2,3)	induziert (~1,5)
Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase Homolog	SACOL1897	erhöht (~2)	verringert (~0,5)
ATP-abhängige DNA-Helikase PcrA	SACOL1966	erhöht (~1,9)	induziert (~1,5)
Anti-anti-SigmaB-Faktor RsbV	SACOL2056	erhöht (~1,6)	nicht gefunden
Molybden-Kofaktor Biosyntheseprotein A MoaA	SACOL2261	erhöht (~2,5)	nicht gefunden

Fortsetzung Tabelle 17

Epimerase-Dehydratase, putativ	SACOL2446	erhöht (~1,7)	verringert (~0,7)
-----------------------------------	-----------	---------------	-------------------

<sup>a</sup> Akkumulation in der Mutante: Ratio  $\Delta pknB$ -Mutante/Wildtyp auf SYPRO-Ebene (alle Proteine).<sup>b</sup> ProQ-Signal in der Mutante: die Ratio  $\Delta pknB$ -Mutante/Wildtyp auf ProQ-Ebene (phosphorylierte Proteine).

HP: Hypothetisches Protein; CHP: Konserviertes hypothetisches Protein.

Der *S. aureus*-Stamm 8325 besitzt eine 11 bp-Deletion im *rsbU*-Gen. Um zu untersuchen, ob das Fehlen des alternativen Sigmafaktors B sich auf das Phosphorylierungsmuster in *S. aureus* auswirkt, wurde der Sigma B-positive Stamm SH1000 verwendet. Man findet hier 12 Proteine, die eine verminderte Ratio Mutante/Wildtyp auf ProQ-Ebene aufweisen (Tab. 18): Pyridoxinbiosyntheseprotein (0,4-fach), DNA-abhängige RNA-Polymerase (0,3-fach), Glutamatdehydrogenase GudB (0,2-fach), Pyruvatdehydrogenase (0,7-fach), Katalase (0,4-fach), Aconit hydratase CitB (0,9-fach), Acetyl-CoA-Carboxylase (0,6-fach), Transkriptions-elongationsfaktor GreA (0,5-fach), hypothetisches Protein der MutT-Nudix Familie (0,5-fach), Threonyl-tRNA-Synthetase (0,4-fach), hypothetisches Protein (0,5-fach) und die Pyruvatkinase (0,3-fach).

**Tabelle 18:** Deregulierte Proteine der  $\Delta pknB$ -Mutante SH1000 nach Phosphoproteom-Analysen.

Annotation	Gene-ORF	ProQ-Signal in der Mutante <sup>b</sup>	Akkumulation in der Mutante <sup>a</sup>
Formatacetyltransferase PflB	SAOUHSC_00187	unverändert (~1)	induziert (~1,9)
Alkylhydroperoxidreduktase Untereinheit C AhpC	SAOUHSC_00365	unverändert (~1)	verringert (~0,5)
UDP-N-Acetylglucosaminpyrophosphorylase	SAOUHSC_00471	unverändert (~0,9)	verringert (~0,4)
Glutamyl-tRNA-Synthetase GltX	SAOUHSC_00509	unverändert (~1)	induziert (~1,6)
Ribonukleotid-Diphosphatreduktase $\alpha$ -Untereinheit NrdE	SAOUHSC_00742	unverändert (~1)	induziert (~1,8)
3-Oxoacylsynthase FabH	SAOUHSC_00920	unverändert (~1,1)	verringert (~0,6)
HP	SAOUHSC_01480	unverändert (~0,9)	verringert (~0,3)
DNA-abhängige RNA-Polymerase, $\delta$ -Untereinheit, putativ	SAOUHSC_02369	unverändert (~1)	verringert (~0,6)
50S ribosomales Protein L4 RplD	SAOUHSC_02511	unverändert (~1)	verringert (~0,5)
Pyridoxinbiosynthese Protein	SAOUHSC_00499	verringert (~0,4)	verringert (~0,3)

Fortsetzung Tabelle 18

DNA-abhängige RNA-Polymerase, $\beta$ -Untereinheit, putativ	SAOUHSC_00525	verringert (~0,3)	verringert (~0,5)
Glutamatdehydrogenase, NAD-spezifisch, GudB	SAOUHSC_00895	verringert (~0,2)	induziert (~1,4)
Pyruvatdehydrogenase Komplex, E1 Komponente, $\alpha$ -Untereinheit, putativ	SAOUHSC_01040	verringert (~0,7)	verringert (~0,4)
HP	SAOUHSC_01323	verringert (~0,5)	verringert (~0,7)
Katalase	SAOUHSC_01327	verringert (~0,4)	verringert (~0,3)
Aconitathydratase CitB	SAOUHSC_01347	verringert (~0,9)	verringert (~0,6)
Acetyl-CoA-Carboxylase, Biotincarboxyl Carrierprotein	SAOUHSC_01624	verringert (~0,6)	unverändert (~1)
Transkriptionselongationsfaktor GreA	SAOUHSC_01714	verringert (~0,5)	verringert (~0,7)
HP/MutT-Nudix Familie-Protein	SAOUHSC_01782	verringert (~0,5)	verringert (~0,7)
Threonyl-tRNA-Synthetase	SAOUHSC_01788	verringert (~0,4)	verringert (~0,8)
Pyruvatkinase	SAOUHSC_01806	verringert (~0,3)	verringert (~0,5)
HP	SAOUHSC_00039	erhöht (~1,5)	induziert (~1,5)
HP	SAOUHSC_00135	erhöht (~3,4)	verringert, da nicht gefunden
Alkylhydroperoxidreduktase, Untereinheit F AhpF	SAOUHSC_00364	erhöht (~1,7)	unverändert (~1)
HP/Chaperonin, 33 kDa	SAOUHSC_00487	erhöht (~6)	verringert (~0,8)
HP/Cysteinsynthase	SAOUHSC_00488	erhöht (~2)	verringert (~0,8)
Pyridoxinbiosynthese Protein	SAOUHSC_00499	erhöht (~1,6)	induziert (~1,6)
HP	SAOUHSC_00549	erhöht (~2)	unverändert (~1)
Phosphoglyceratmutase, Pgm	SAOUHSC_00798	erhöht (~1,6)	verringert (~0,7)
HP/Hydrolase,	SAOUHSC_00909	erhöht (~1,4)	erhöht (~2,1)
HP	SAOUHSC_00935	erhöht (~1,3)	verringert (~0,6)
Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase Familie-Protein, putativ	SAOUHSC_00985	erhöht (~2,7)	verringert, da nicht gefunden
HP	SAOUHSC_01026	erhöht (~1,5)	unverändert (~0,9)
Malonyl CoA-Acyl-Carrier Proteintransacylase FabD	SAOUHSC_01198	erhöht (~1,9)	unverändert (~1)

Fortsetzung Tabelle 18

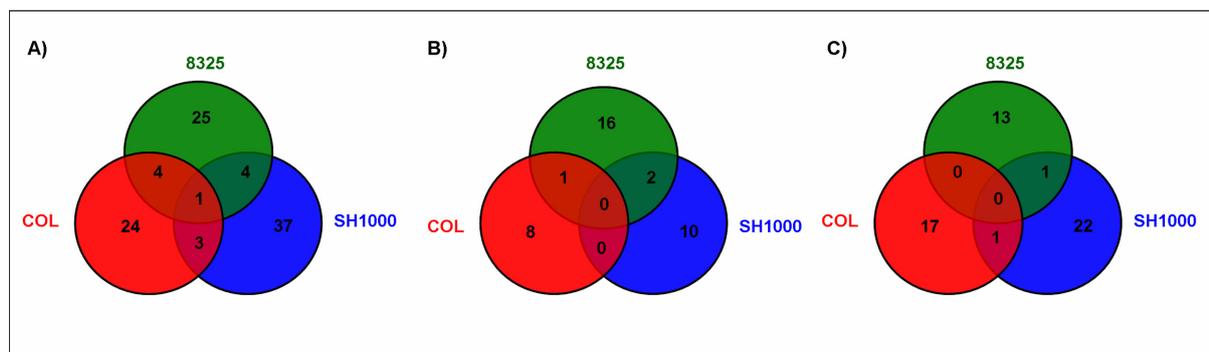
Glutaminsynthetase, Typ I GlnA	SAOUHSC_01287	erhöht (~1,3)	verringert (~0,5)
HP	SAOUHSC_01680	erhöht (~13)	verringert, da nicht gefunden
Hitze-induzierter Transkriptionsrepressor HrcA	SAOUHSC_01684	erhöht (~3,2)	unverändert (~1,1)
D-Aminosäure-Aminotransferase	SAOUHSC_01867	erhöht (~3,5)	induziert (~1,2)
HP	SAOUHSC_01907	erhöht (~1,6)	verringert (~0,6)
ABC-Transporter, ATP-Bindungsprotein, putativ	SAOUHSC_01967	erhöht (~12)	unverändert (~0,9)
Sigmafaktor B, putativ	SAOUHSC_02298	erhöht (~1,8)	verringert (~0,4)
Serinhydroxymethyltransferase, putativ	SAOUHSC_02354	erhöht (~2,2)	unverändert (~1)
Fructose-bisphosphat-Aldolase	SAOUHSC_02366	erhöht (~2,2)	induziert (~1,2)
Epimerase/Dehydratase, putativ	SAOUHSC_02737,	erhöht (~3,2)	unverändert (~0,9)
Putative Phosphomannomutase	SAOUHSC_02793	erhöht (~1,3)	induziert (~1,5)

<sup>a</sup>Akkumulation in der Mutante: Ratio  $\Delta pknB$ -Mutante/Wildtyp auf SYPRO-Ebene (alle Proteine).

<sup>b</sup>ProQ-Signal in der Mutante: die Ratio  $\Delta pknB$ -Mutante/Wildtyp auf ProQ-Ebene (phosphorylierte Proteine).

HP: Hypothetisches Protein; CHP: Konserviertes hypothetisches Protein.

Es zeigte sich, dass es nur wenige Übereinstimmungen in den Phosphorylierungsmustern der drei analysierten Stämme gibt. Diese Schnittmengen sind in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16:** Schnittmengen der in ihrem Phosphorylierungsstatus veränderten Proteine in den *S. aureus* Stämmen 8325, COL und SH1000 verglichen mit ihren isogenen  $\Delta pknB$ -Mutanten. A) Alle in ihrem Phosphorylierungsstatus veränderten Proteine; B) Alle in ihrem Phosphorylierungsstatus verminderten Proteine und C) Alle in ihrem Phosphorylierungsstatus verstärkten Proteine.

In den  $\Delta pknB$ -Stämmen 8325 und SH1000 zeigten zwei Proteine eine verminderte putative Phosphorylierung: die Glutamatdehydrogenase GudB und der Transkriptionselongationsfaktor GreA. Dagegen findet man als Übereinstimmung zwischen den Stämmen  $8325\Delta pknB$  und  $COL\Delta pknB$  nur das „Glycin Cleavage System H“-Protein mit einem verminderten ProQ-Signal. Für die Stämme  $SH1000\Delta pknB$  und  $COL\Delta pknB$  konnte dagegen kein gemeinsames Protein mit verringertem Phosphorylierungsstatus identifiziert werden. Damit lieferte auch der Vergleich aller drei untersuchten Stämme  $8325\Delta pknB$ ,  $COL\Delta pknB$  und  $SH1000\Delta pknB$  kein gemeinsames Protein mit verringertem ProQ-Signal und somit verringertem Phosphorylierungsstatus (Abb. 16B).

Ein erhöhtes ProQ-Signal sowohl im Stamm  $8325\Delta pknB$  als auch im Stamm  $SH1000\Delta pknB$  und damit auch einen erhöhten Phosphorylierungsstatus, ließ sich nur bei einem Protein, der D-Aminosäure-Aminotransferase, nachweisen (Abb. 16C). Auch der Vergleich der Stämme  $SH1000\Delta pknB$  und  $COL\Delta pknB$  lieferte nur ein gemeinsames Protein mit erhöhtem Phosphorylierungsstatus: die Phosphoglyceratmutase Pgm. Es konnte jedoch keine Übereinstimmung in einem erhöhten ProQ-Signal für alle drei Stämme sowie für die Stämme  $8325\Delta pknB$  und  $COL\Delta pknB$  ermittelt werden.

Insgesamt wurden im Stamm  $8325\Delta pknB$  34 Proteine mittels 2DGE detektiert, die eine 1,5-fache Änderung entweder in ihrem SYPRO- oder ProQ-Signal erfahren haben (Abb. 16A). Im Stamm  $COL\Delta pknB$  sind es 32 und im Stamm  $SH1000\Delta pknB$  45 Proteine. Davon haben die Stämme 8325 und COL vier gemeinsam, 8325 und SH1000 ebenfalls vier und die Stämme COL und SH1000 drei. Eine veränderte Expression/Phosphorylierung konnte in allen drei untersuchten Stämmen für den Transkriptionselongationsfaktor GreA ermittelt werden. GreA war in den Stämmen 8325 und SH1000 vermindert phosphoryliert (0,7-fach bzw. 0,5-fach), im Stamm COL dagegen verstärkt phosphoryliert (1,7-fach).

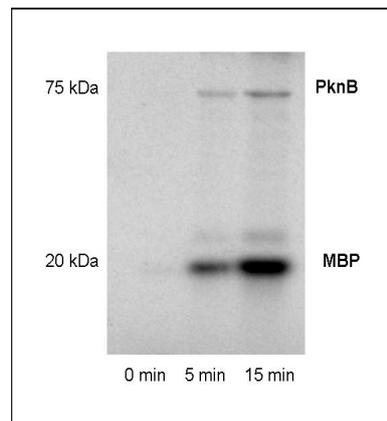
### 5.1.8 Überexpression und Reinigung putativer Substrate von PknB

Mit Hilfe der 2DGE und des daraus resultierenden Phosphoproteoms der Stämme Wildtyp 8325, COL und SH1000 sowie deren isogenen  $\Delta pknB$ -Mutanten, konnten Proteine identifiziert werden, die in der Deletionsmutante weniger oder gar nicht mehr phosphoryliert wurden (s. Tab. 16, 17 und 18). Um zu zeigen, dass die STPK PknB diese Proteine auch in einem *in vitro*-Kinaseassay phosphorylieren kann und, dass diese somit als Substrate von PknB phosphoryliert werden, mussten diese zuerst in *E. coli* überexprimiert werden. Dazu wurden die codierenden Sequenzen folgender Proteine in das Vektorsystem pET28a der Firma Novagen kloniert: Triggerfaktor Tig, Glutamatdehydrogenase GudB, Translationselongationsfaktor Tu, Transkriptionselongationsfaktor GreA, Pyruvatdehydrogenase Pyk, Isocitratdehydrogenase CitC sowie die Adenylosuccinat-Synthase PurA. Neben diesen wurde auch die Ser/Thr-Proteinkinase PknB und die Ser/Thr-Proteinphosphatase YloO (Stp) mit Hilfe dieses Vektorsystems überexprimiert. Es handelt sich bei dem pET28a System um einen Expressionsvektor, bei dem das gewünschte Protein nach Induktion des T7-Promotors mittels IPTG-Zugabe exprimiert wird. Unter nicht induzierenden Bedingungen hingegen wird die Expression durch die Bindung des Lac-Repressors an das *lac*-Operon verhindert. Zur Reinigung des Proteins befindet sich die Sequenz für den His-Tag stromaufwärts des zu exprimierenden Gens, so dass eine N-terminale Fusion mit dem gewünschten Protein entsteht. Dieses Vektorsystem wurde gewählt, um eine einfache Aufreinigung der Fusionsproteine über den His-Tag zu ermöglichen. Die oben angegebenen codierenden Sequenzen der ausgewählten Proteine wurden mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe der unter Tab. 8 aufgeführten Restriktionsschnittstellen in die „Multiple Cloning Site“ (BamHI-XhoI) des Vektors ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide sind: pET-Tig, pET-Tu, pET-GudB, pET-PurA, pET-GreA, pET-Pyk, pET-CitC sowie pET-PknB und pET-YloO.



### 5.1.9.1 PknB phosphoryliert MBP zeit- und kationenabhängig

Wie unter 5.1.5 gezeigt werden konnte, ist bereits die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> eine funktionelle STPK und fähig ein konventionelles Kinasesubstrat, das Myelin Basische Protein (MBP), zu phosphorylieren. Damit konnte die intrazelluläre Domäne von PknB als die für die Phosphorylierung verantwortliche Domäne identifiziert werden. Es sollte gezeigt werden, dass auch die vollständige Proteinkinase PknB das Substrat MBP phosphorylieren kann. Dazu wurde das aufgereinigte Fusionsprotein PknB (PknB-His) in einem Kinasepuffer wie unter Methoden 4.6.9 beschrieben mit radioaktiven  $\gamma^{32}$ -ATP und MBP für die angegebene Zeit bei 37 °C inkubiert und dann in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Visualisierung wurde mit Hilfe anschließender Autoradiographie erreicht.

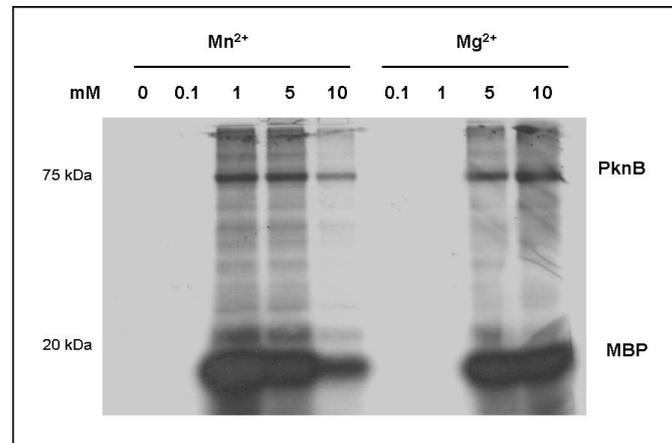


**Abbildung 19:** PknB phosphoryliert das konventionelle Kinasesubstrat MBP zeitabhängig. Rekombinantes PknB (PknB-His) wurde mit MBP und  $\gamma^{32}$ -ATP in einem HEPES-Kinasepuffer bei 37 °C für die angegebene Zeit inkubiert und in einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels anschließender Autoradiographie visualisiert.

Neben der Fähigkeit MBP zeitabhängig zu phosphorylieren, wurde auch untersucht, ob die Phosphorylierungsaktivität von PknB (PknB-His) durch divalente Kationen beeinflusst werden kann. Wie unter 5.1.5.2 gezeigt, ist die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> Mn<sup>2+</sup>-abhängig, während in Anwesenheit der gleichen Konzentration Mg<sup>2+</sup>-Ionen eine deutlich schwächere Phosphorylierung von MBP nachweisbar war. PknB<sub>1-274</sub> ist demnach wie auch PknB von *M. tuberculosis* und andere beschriebene bakterielle STPKs eine Mn<sup>2+</sup>-abhängige Proteinkinase.

Um die Kationenabhängigkeit von PknB zu untersuchen, wurde PknB (PknB-His) mit MBP in einem Kinasepuffer für 20 min mit der jeweiligen Konzentration Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>

oder  $\text{Ca}^{2+}$  bei 37 °C und in Anwesenheit von  $\gamma^{32}\text{-ATP}$  inkubiert. Es wurden 0 mM, 0,1 mM, 1 mM, 5 mM und 10 mM des jeweiligen Kations eingesetzt.

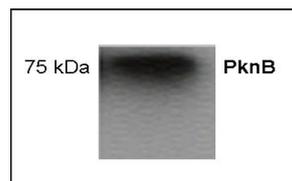


**Abbildung 20:** PknB phosphoryliert das konventionelle Kinasesubstrat MBP kationenabhängig. Rekombinantes PknB (PknB-His) wurde mit MBP und  $\gamma^{32}\text{-ATP}$  in einem HEPES-Kinasepuffer bei 37 °C für 20 min mit den angegebenen Konzentration an  $\text{Mn}^{2+}$  bzw.  $\text{Mg}^{2+}$  inkubiert und in einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels anschließender Autoradiographie visualisiert.

PknB zeigte mit 1 mM  $\text{Mn}^{2+}$  das stärkste MBP-Phosphorylierungssignal (Abb. 20). Dieses nahm deutlich mit einer Erhöhung der  $\text{Mn}^{2+}$ -Konzentration auf 5 bzw. 10 mM ab, was auf eine Inhibition der Kinase PknB durch eine zu große Menge an  $\text{Mn}^{2+}$  hindeutet. Wurden Magnesiumkationen dem Kinasepuffer zugesetzt, führten erst 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  zu einer Phosphorylierung von MBP. Diese ließ sich auch durch eine Verdopplung der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration nicht weiter verstärken. Im Unterschied zu  $\text{Mn}^{2+}$ , scheint sich die Erhöhung von  $\text{Mg}^{2+}$  auf 10 mM jedoch auch nicht negativ auf die Phosphorylierungsaktivität von PknB auszuwirken (Abb. 20). Dass PknB eindeutig auf die Anwesenheit von divalenten Kationen angewiesen ist, wird deutlich durch die ausbleibende Phosphorylierung bei Abwesenheit von sowohl  $\text{Mn}^{2+}$  als auch  $\text{Mg}^{2+}$ . Weiterhin wurde der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen an Calciumkationen auf die Phosphorylierungsfähigkeit von PknB getestet. PknB war jedoch nicht fähig in Anwesenheit von 1-10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  MBP unter den oben beschriebenen Bedingungen zu phosphorylieren.

### 5.1.9.2 PknB besitzt Autophosphorylierungsaktivität

Ein wichtiges Merkmal aller Proteinkinasen ist ihre Fähigkeit zur Autophosphorylierung oder auch *cis*-Phosphorylierung. Dieses Ereignis aktiviert die Proteinkinase und ermöglicht so die weitere Phosphorylierung (*trans*-Phosphorylierung) bestimmter Substrate. Wie bereits unter 5.1.5 gezeigt werden konnte ist die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> bereits eine funktionelle Proteinkinase und phosphoryliert neben dem konventionellen Substrat MBP auch sich selbst. Es sollte deshalb getestet werden, ob auch das Gesamtprotein PknB (PknB-His) eine Autophosphorylierungsaktivität aufweist. Wie bereits PknB<sub>1-274</sub> wurde auch PknB bei 37 °C in einem Kinasepuffer mit  $\gamma^{32}$ -ATP inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Mittels Autoradiographie erfolgte die Visualisierung. Abbildung 21 zeigt eine deutliche Phosphorylierung von PknB nach 30 min Inkubationszeit.



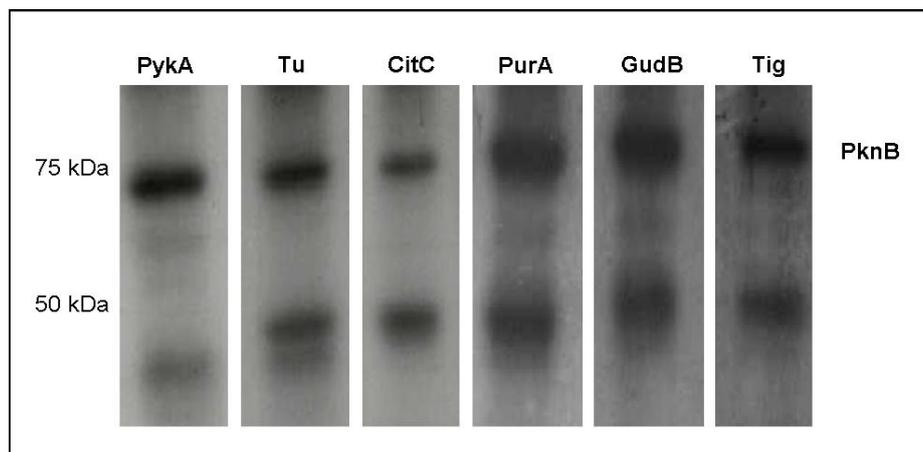
**Abbildung 21:** PknB besitzt Autophosphorylierungsaktivität. Rekombinantes PknB (PknB-His) wurde mit  $\gamma^{32}$ -ATP in einem HEPES-Kinasepuffer bei 37 °C für 20 min inkubiert und in einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels anschließender Autoradiographie visualisiert.

Die *in vitro*-Kinaseassays zeigen eindeutig, dass PknB ebenso wie PknB<sub>1-274</sub> eine funktionelle Ser/Thr-Proteinkinase ist. Die Phosphorylierungsaktivität von PknB ist dabei zeit- und kationenabhängig, wobei  $Mn^{2+}$  das bevorzugte divalente Kation *in vitro* darstellt. PknB ist neben der Phosphorylierung des konventionellen Substrats MBP auch zur Autophosphorylierung fähig.

### 5.1.9.3 PknB phosphoryliert verschiedene Substrate *in vitro*

Es sollte im Weiteren untersucht werden, inwieweit PknB die mittels 2DGE ermittelten putativen *in vivo*-Substrate phosphorylieren kann. Hierzu wurden die Proteine Triggerfaktor Tig, Adenylosuccinat-Synthase PurA, Glutamatdehydrogenase GudB und Elongationsfaktor Tu ausgewählt, für die eine verringerte Phosphorylierung im Stamm 8325 $\Delta$ pknB ermittelt werden konnte. Außerdem die

Proteine Pyruvatdehydrogenase PykA und Isocitratdehydrogenase CitC. Diese waren in SH1000 $\Delta$ pknB verringert phosphoryliert. Diese beschriebenen Proteine wurden in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt, um sie dann mit PknB und  $\gamma^{32}$ -ATP in einem HEPES-Kinasepuffer zu inkubieren. Wie man in Abbildung 22 sieht, phosphoryliert PknB (PknB-His) die rekombinanten Proteine PykA, Tu, CitC, PurA, GudB und Tig (jeweils His-Fusionsproteine) nach 20 min Inkubationszeit. Damit konnte nachgewiesen werden, dass diese Proteine *in vivo* phosphoryliert werden und damit Substrate von PknB in *S. aureus* sind.



**Abbildung 22:** *In vitro* Phosphorylierung putativer PknB-Substrate. Rekombinantes PknB (PknB-His) wurde mit  $\gamma^{32}$ -ATP in einem HEPES-Kinasepuffer bei 37 °C für 20 min mit dem jeweiligen Protein (PykA-His, Tu-His, CitC-His, PurA-His, GudB-His oder Tig-His) inkubiert und in einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels anschließender Autoradiographie visualisiert. Als Kontrollen dienten jeweils Ansätze ohne PknB (nicht gezeigt).

### 5.1.10 Einfluss der Phosphorylierung auf die enzymatische Aktivität von PurA

Das zu PurA homologe Protein PurA in *S. agalactiae* (Gruppe B Streptokokken, GBS) ist als Substrat der STPK Stk1 bereits beschrieben worden (Rajagopal *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Stk1 die GBS in der *de novo*-Purinbiosynthese attenuiert sind und, dass im Vergleich zum Wildtypstamm eine deutlich geringere A-Nukleotid-Konzentration in der *stk1*-Mutante bei Wachstum in CDM festgestellt werden kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Aktivität der Adenylosuccinat-Synthase PurA durch die Phosphorylierung durch Stk1 verändert werden kann. Daher wurde untersucht, ob die STPK PknB von *S. aureus* ebenfalls die enzymatische Aktivität von PurA durch Phosphorylierung regulieren kann. PurA

katalysiert die Synthese von Adenylosuccinat aus IMP und L-Aspartat in Anwesenheit von GTP und  $Mg^{2+}$ . Dabei wird die PurA-Aktivität als Zunahme der Absorption bei 280 nm bei RT bestimmt. Diese Erhöhung geht einher mit der Umwandlung von IMP zu Adenylosuccinat in Anwesenheit von L-Aspartat (Juang *et al.*, 1993). Die spezifische Aktivität konnte dann unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 11\,700\text{ M/cm}$  bestimmt werden und als U/min x mg Protein ausgedrückt werden. Die Reaktion wurde unter gesättigten Bedingungen wie in den Methoden beschrieben (4.12) in einem 50 mM HEPES-Puffer mit 400  $\mu\text{M}$  IMP, 100  $\mu\text{M}$  GTP, 8 mM Magnesiumacetat und 8 mM Aspartat durchgeführt (Juang *et al.*, 1993). Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche in die Auswertung einbezogen. Die Phosphorylierung von PurA durch PknB wurde als erstes in einem *in vitro*-Kinaseassay durchgeführt. Als Kontrolle diente im Weiteren unphosphoryliertes PurA. Die Messung der Spezifischen Enzymaktivität von PurA und phosphoryliertem PurA (PurA-P) konnte dann wie oben beschrieben erfolgen. Als Kontrollen dienten Ansätze mit PurA mit und ohne ATP in Abwesenheit von PknB. Da gezeigt werden konnte, dass eine unspezifische Phosphorylierung des His-Tags bei rekombinanten Proteinen stattfinden kann (Boitel *et al.*, 2003), die zu einem falsch-positiven Phosphorylierungssignal führen kann, wurde der His-Tag vor Verwendung der Proteine PurA und PknB mittels Faktor X-Verdau abgespalten. Es konnte jedoch kein Einfluss des His-Tags auf die Phosphorylierung von PurA durch PknB festgestellt werden. PknB phosphoryliert PurA nach 20 min Inkubation mit  $\gamma^{32}$ -ATP ebenso wie das Fusionsprotein PurA-His (Abb. 22).

**Tabelle 19:** Effekt der Phosphorylierung durch PknB auf die spezifische Aktivität von PurA.

	Spezifische Aktivität (U/min mg) <sup>a</sup>
PurA+ PknB + ATP	1,44 ± 0,06
PurA + PknB	2,64 ± 0,29
PurA+ ATP	2,96 ± 0,09
PurA	2,65 ± 0,53

<sup>a</sup>*In vitro* Phosphorylierung von PurA wurde in Anwesenheit von PknB und ATP wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Kontrollen umfassen unphosphoryliertes PurA sowie Reaktionen ohne ATP bzw. PknB. Die PurA-Enzymassays wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von Aspartat durchgeführt. Die durchschnittliche spezifische Enzymaktivität und die Standardabweichungen wurden mittels drei unabhängiger Experimente ermittelt. Eine Unit ist als Menge an Enzym definiert, die benötigt wird um ein  $\mu\text{mol}$  Adenylosuccinat in einer Minute zu synthetisieren.

Interessanterweise konnte eine 1,8-fache Erniedrigung der Aktivität gemessen werden (Tab. 19), wenn PurA phosphoryliert vorlag (PurA-P: 1,44 U/min mg), im Vergleich zu unphosphoryliertem PurA (PurA: 2,64 U/min mg). Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von PurA-P wurde nach der Phosphorylierung im *in vitro*-Kinaseassay in Anwesenheit von PknB und ATP durchgeführt, während Kontrollreaktionen entweder ohne PknB oder ohne ATP durchgeführt wurden. Diese Ergebnisse belegen, dass die Phosphorylierung die Aktivität von PurA erniedrigt.

### 5.1.11 Zusammenfassung I:

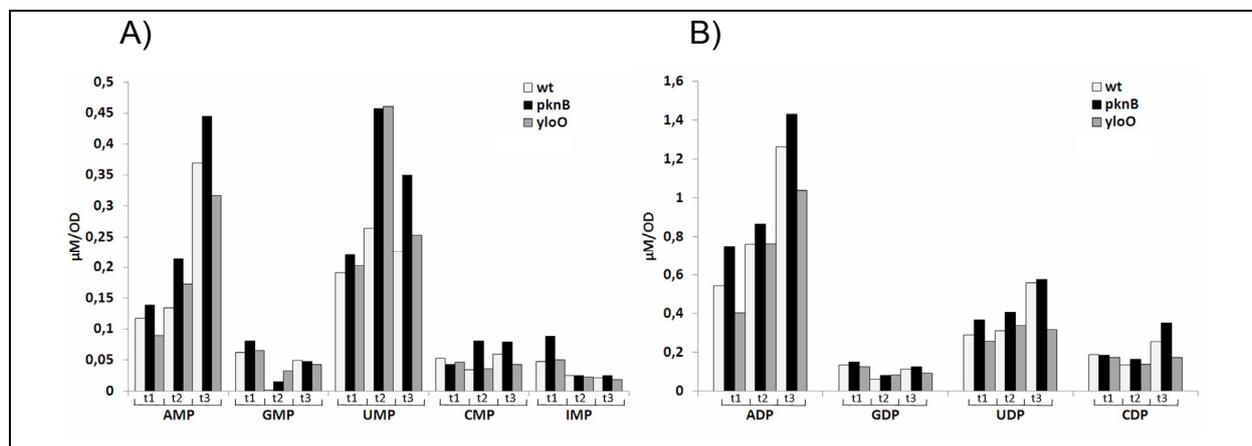
- *In silico*-Untersuchungen verdeutlichten die STPKs-typische Domänenstruktur für PknB von *S. aureus*.
- Die Gene *yloO* und *pknB* werden cotranskribiert. Außerdem sind die ORFs SA1058 bis SA1061 ebenfalls in diesem Operon organisiert.
- Die Microarray-Analyse des Stammes 8325 $\Delta$ *pknB* ergab:
  - eine erniedrigte Expression von Genen der *de novo*-Purinbiosynthese in der  $\Delta$ *pknB*-Mutante.
  - eine erniedrigte Expression von an der Pyrimidinbiosynthese beteiligten Genen in der  $\Delta$ *pknB*-Mutante.
  - eine verstärkte Expression von Genen des Zitratzykluses, des Lipidmetabolismus und des Energiemetabolismus in der  $\Delta$ *pknB*-Mutante.
  - eine stärkere Expression der für das Zweikomponenten-System codierenden Gene *vraS* und *vraR* sowie eine verstärkte Expression von 11 Genen des *vraSR*-Regulons in der  $\Delta$ *pknB*-Mutante.
- Die Ergebnisse der Microarray-Analyse des Stammes 8325 konnten mit Hilfe der RT-PCR Analyse für die Gene *purF*, *purH*, *fmtA*, *sgtB*, *lrgA*, *prsA*, *rocA*, *rocD* und *vraS* bestätigt werden.
- PknB ist eine funktionelle STPK:
  - Die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> besitzt bereits eine vollständige *in vitro*-Kinaseaktivität.
  - Die Phosphorylierung erfolgt sowohl *cis* als auch *trans*.
  - Die Phosphorylierungsaktivität ist zeitabhängig und benötigt divalente Kationen, mit Prävalenz für Mn<sup>2+</sup>.
  - Die Aktivierung von PknB erfolgt durch *cis*-Phosphorylierung von vermutlich vier Threoninresten (T161, T164, T166, T172) und einem Serinrest (S159) im aktiven Zentrum der Kinase.
  - Mittels Substitution der Reste T164 und T166 konnten diese eindeutig als essentielle Phosphorylierungsstellen der aktiven PknB identifiziert werden.

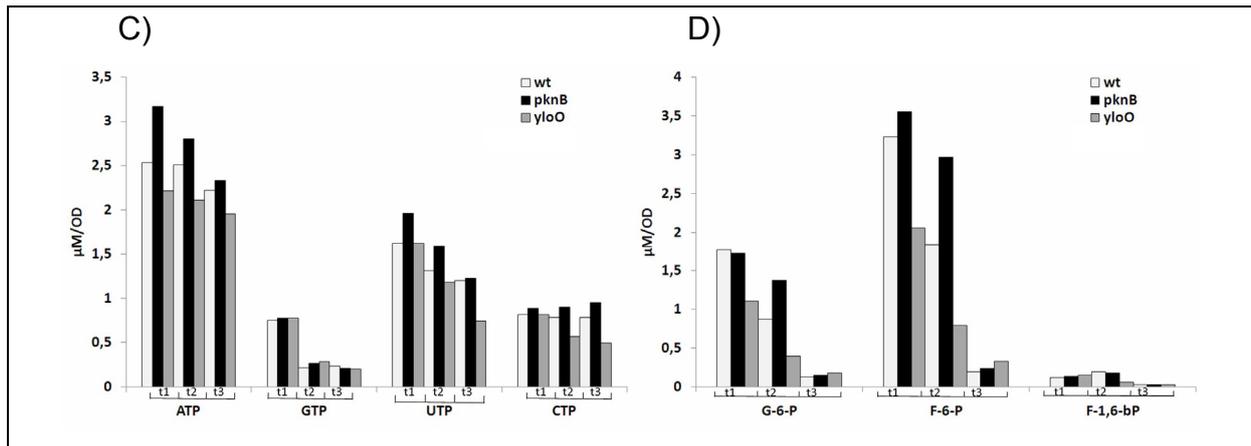
- Identifizierung phosphorylierter Proteine in WT und  $\Delta pknB$ -Mutante der *S. aureus*-Stämme 8325, COL und SH1000:
  - Im Stamm 8325 $\Delta pknB$  wurden 19 Proteine mit putativ erniedrigter Phosphorylierung identifiziert.
  - Im Stamm COL $\Delta pknB$  wurden 9 Proteine mit putativ erniedrigter Phosphorylierung identifiziert.
  - Im Stamm SH1000 $\Delta pknB$  wurden 12 Proteine mit putativ erniedrigter Phosphorylierung identifiziert.
  
- PknB phosphorylierte in einem *in vitro*-Kinaseassay die putativen Substrate/Proteine PykA, Tu, CitC, PurA, GudB und Tig.
  
- Die Enzymaktivität der Adenylosuccinat-Synthase PurA wird durch die Phosphorylierung durch PknB inhibiert. PurA-P ist 1,8-fach weniger aktiv.
  
- Der His-Tag hat keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der Fusionsproteine.

### 5.1.12 Metabolom-Analyse der intrazellulären Metabolite des *S. aureus*-Stammes 8325 und dessen isogener $\Delta pknB$ - und $\Delta yloO$ -Mutante

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PknB und die korrespondierende Phosphatase YloO (Stp) in einem Operon transkribiert werden (5.1.2). Um die Rolle von YloO genauer zu charakterisieren, wurde die codierende Sequenz *yloO* im Stamm 8325 deletiert (wie unter 5.2.1 beschrieben). Diese  $\Delta yloO$ -Mutante konnte dann hinsichtlich ihres Transkriptoms und Metaboloms analysiert werden.

Wie die Transkriptom-Analyse mittels kompetitiver Microarray-Hybridisierung zeigte, wurden sowohl in der  $\Delta pknB$ -Mutante als auch in der  $\Delta yloO$ -Mutante Gene der Purinbiosynthese vermindert exprimiert (Tab. 12 und Tab. 21). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PknB ein Schlüsselenzym der *de novo*-Purinbiosynthese, die Adenylosuccinat-Synthase PurA, *in vitro* phosphoryliert (5.1.9.3) und, dass deren enzymatische Aktivität durch diese Phosphorylierung inhibiert wird (5.10). Es sollte deshalb untersucht werden, ob sich Unterschiede im intrazellulären Metabolom des 8325-Wildtyp im Vergleich zu den isogenen Mutanten  $8325\Delta pknB$  und  $8325\Delta yloO$  detektieren lassen. Dazu wurden die Bakterien sowohl in LB-Medium als auch in chemisch definiertem Medium (CDM) inkubiert und Proben bei OD<sub>600</sub> von 1,0, 2,0 und 3,0 im Falle der LB-Kulturen und bei OD<sub>600</sub> von 0,45 im Falle der CDM-Kulturen genommen. Diese wurden wie unter 4.11 beschrieben bearbeitet und mittels IP-LC-MS-Analyse wurde das intrazelluläre Metabolom bestimmt. Die IP-LC-MS-Analyse wurde in Kooperation mit dem Institut für Pharmazie, Kompetenzzentrum „Functional Genomics“ der Universität Greifswald (AG Lalk) durchgeführt.





**Abbildung 23:** Intrazelluläre Metabolom-Analyse des *S. aureus* 8325 Wildtyp und seiner isogenen  $\Delta pknB$ - und  $\Delta yloO$ -Mutante. Es wurden Proben bei  $\text{OD}_{600}$  von 1,0 (t1), 2,0 (t2) und 3,0 (t3) genommen und wie unter 4.11 beschrieben isoliert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten. Die quantitativen Angaben sind absolut bezogen auf die OD ( $\mu\text{M}/\text{OD}$ ). Die Stämme wurden bei 37 °C in LB-Medium inkubiert.

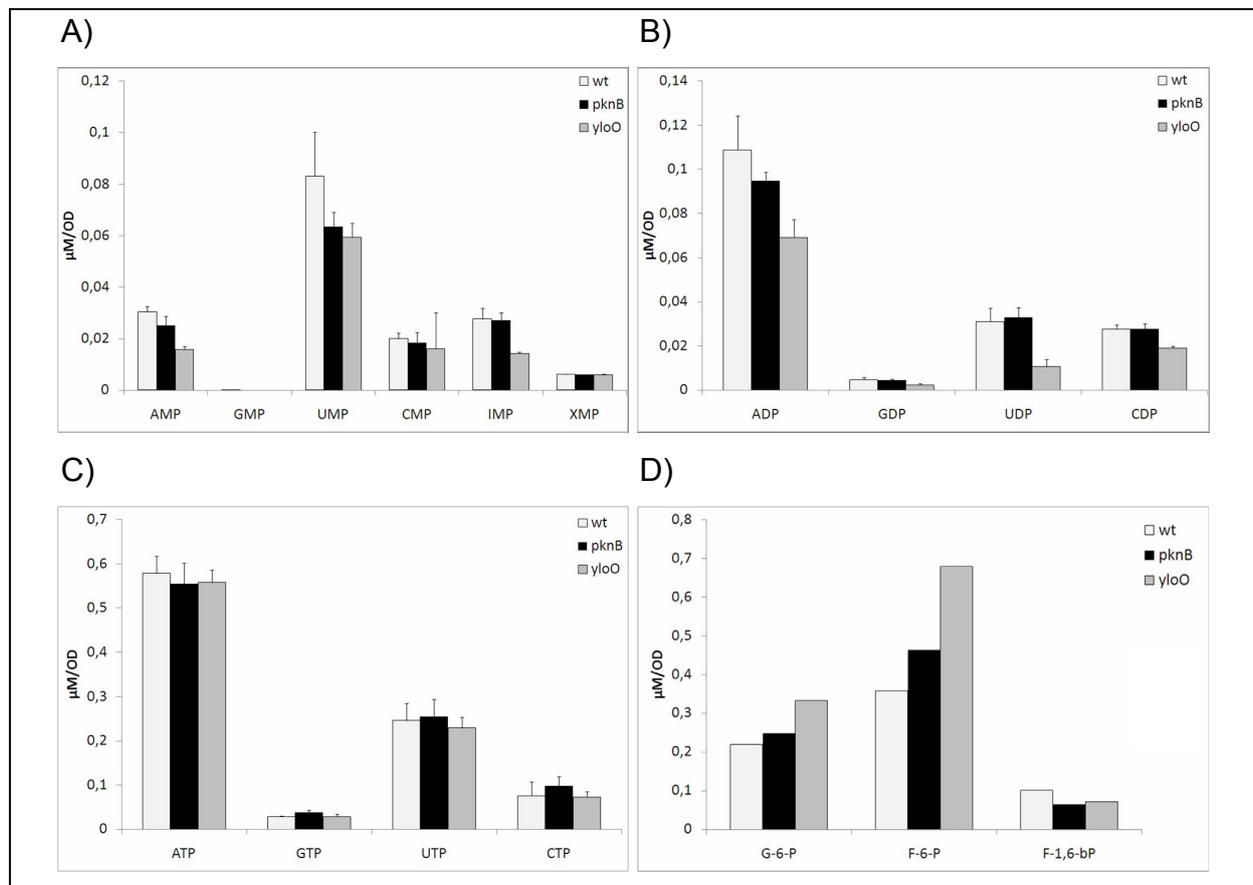
Wie man aus der Abbildung 23 entnehmen kann, wies die  $\Delta pknB$ -Mutante eine leicht höhere A-Nukleotid-Konzentration (AMP, ADP und ATP) im Vergleich zum isogenen Wildtyp auf. Dieser Unterschied blieb auch über die Wachstumskurve bei allen drei untersuchten Zeitpunkten  $\text{OD}_{600}$  von 1,0 (t1), 2,0 (t2) und 3,0 (t3) bestehen. Im Vergleich dazu konnte für die G-Nukleotide (GMP, GDP und GTP) kein signifikanter Unterschied detektiert werden wie auch für die Konzentration an C-Nukleotiden (CMP, CDP und CTP). Lediglich bei t2 zeigte sich eine fast 2-fach höhere CMP-Konzentration in der  $\Delta pknB$ -Mutante sowie eine leicht höhere CDP-Konzentration bei t3. Die UMP-Konzentration war in  $\Delta pknB$  dagegen zum Zeitpunkt t2 um das 1,8-fache und zum Zeitpunkt t3 um das 1,4-fache höher, während bei t1 sich nur leichte Unterschiede erkennen ließen. Die UDP- und UTP-Konzentrationen waren in der  $\Delta pknB$ -Mutante zu allen drei Zeitpunkten lediglich gering erhöht. Interessanterweise war in der  $\Delta pknB$ -Mutante zu allen drei untersuchten Zeitpunkten die Konzentration der A-Nukleotide erhöht. Sowohl die AMP- als auch die ADP- und ATP-Konzentrationen waren um das 1,2- bis 1,8-fache erhöht. Für die IMP-Konzentration ließ sich für t1 eine 2-fach höhere Konzentration messen. Zu den Zeitpunkten t2 und t3 war jedoch kein Unterschied detektierbar. Neben den Nucleotid-Konzentrationen wurde auch die Konzentration von Glucose-6-phosphat (G-6-P), Fructose-6-phosphat (F-6-P) und Fructose-1,6-bisphosphat (F-1,6-bP) mittels IP-LC-MS-Analyse bestimmt. Es zeigte sich, dass in der  $\Delta pknB$ -Mutante die G-6-P-Konzentration zum t2 um das 1,5-fache erhöht war. Bei t1 und t3 ließ sich kein Unterschied zwischen

Wildtyp und Mutante feststellen. Die F-6-P-Konzentration war jedoch zu t1 bereits leicht in der  $\Delta pknB$ -Mutante erhöht, deutlicher wurde dieser Unterschied zum Zeitpunkt t2. Die  $\Delta pknB$ -Mutante wies eine 1,6-fache Erhöhung an F-6-P auf. Die F-1,6-bP-Konzentrationen unterschieden sich nicht im Vergleich der beiden Stämme.

Die  $\Delta yloO$ -Mutante zeigte im Vergleich mit dem 8325 Wildtyp eine tendenziell verminderte bzw. gleiche Konzentration der untersuchten intrazellulären Metabolite. Lediglich die Konzentration von UMP zum Zeitpunkt t2 ist, wie auch schon in der  $\Delta pknB$ -Mutante, um das 1,8-fache erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Die UDP- und UTP-Konzentrationen sind zu den Zeitpunkten t1 und t2 nahezu gleich zum Wildtyp, während sich jedoch zum Zeitpunkt t3 für beide U-Nukleotide eine 1,5- bis 2-fach geringere Konzentration in der  $\Delta yloO$ -Mutante feststellen ließ. Die Konzentration der G-Nukleotide dagegen unterschied sich nicht zwischen  $\Delta yloO$ -Mutante und ihrem isogenen Wildtyp. Weiterhin zeigte die Analyse, dass sich die  $\Delta yloO$ -Mutante nur zum Zeitpunkt t3 in der Konzentration von CMP und CDP unterschied. Es konnte eine leicht verringerte Konzentration (1,3-fache) festgestellt werden. Auch die CTP-Konzentration war im Wildtypstamm zu t2 und t3 nur leicht höher als in der Phosphatasemutante. Es ließ sich jedoch kein Unterschied in der IMP-Konzentration messen. Interessanterweise war die AMP-Konzentration in der  $\Delta yloO$ -Mutante zum Zeitpunkt t1 leicht geringer. Zum Zeitpunkt t2 jedoch konnte man eine erhöhte Konzentration feststellen. Bei t3 war die AMP-Konzentration jedoch in der Mutante wieder verringert im Vergleich zum Wildtyp. Die ADP- und ATP-Konzentrationen waren für alle Zeitpunkte in der  $\Delta yloO$ -Mutante niedriger (1,3-fach), mit Ausnahme der gleichen ADP-Konzentration zum t2. Dies steht im Gegensatz zur A-Nukleotid-Konzentration in der  $\Delta pknB$ -Mutante, die im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Ebenfalls im Gegensatz zu  $\Delta pknB$  war die Konzentration von G-6-P in der  $\Delta yloO$ -Mutante 1,8-fach niedriger zu t1 und t2, ebenso wie die F-6-P-Konzentration. Zum Zeitpunkt t3 konnte man jedoch keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante feststellen. Auch ließ sich für die F-1,6-bP-Konzentration nur für t2 eine leicht niedrigere Konzentration messen.

*S. aureus* kann die verschiedenen Nukleotide und deren Vorläufer entweder über den Syntheseweg der *de novo*-Purinbiosynthese synthetisieren oder über den sog. „salvage pathway“. Je nach Wachstumsmedium und darin vorhandenen Nährstoffen

kann einer oder beide Wege genutzt werden. Da in LB-Medium die Vorläufer der Nukleotide, Adenin, Guanin, Inosin, Xanthin, Cystein und Uracil, in ausreichender Menge vorhanden sind bzw. sie leicht über den „salvage pathway“ synthetisiert werden können, sollte untersucht werden ob sich das Metabolom der Stämme 8325WT, 8325 $\Delta$ pknB und 8325 $\Delta$ yloO im Bezug auf die Nukleotidkonzentrationen unterscheidet. Dazu wurden der Wildtypstamm 8325 und die isogenen Mutanten  $\Delta$ pknB und  $\Delta$ yloO in CDM bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,45 inkubiert und die intrazellulären Metabolite bestimmt.



**Abbildung 24:** Intrazelluläre Metabolom-Analyse des Wildtypstamms 8325 und seiner isogenen  $\Delta$ pknB- und  $\Delta$ yloO-Mutante. Es wurden Proben bei OD<sub>600</sub> von 0,45 genommen und wie unter 4.11 beschrieben isoliert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten. Die quantitativen Angaben sind absolut bezogen auf die OD ( $\mu\text{M}/\text{OD}$ ). Die Stämme wurden bei 37 °C in CD-Medium inkubiert.

Im Gegensatz zur A-Nukleotid-Konzentration in LB-Medium war diese in CDM in der  $\Delta$ pknB-Mutante im Vergleich mit dem Wildtypstamm leicht niedriger. Auch für UMP ließ sich eine geringere (1,3-fach) Konzentration in der Mutante messen. Dagegen war kein Unterschied in der UDP- sowie UTP-Konzentration zwischen Wildtyp und

$\Delta pknB$  messbar. Ebenfalls in gleicher Konzentration lagen die gemessenen G-Nukleotide GMP, GDP und GTP sowie IMP und XMP vor. Interessanterweise konnte bei Wachstum in LB-Medium eine höhere IMP-Konzentration in der Kinasemutante gemessen werden. Bei Wachstum in CDM ließ sich dagegen keine veränderte C-Nukleotid-Konzentration in  $\Delta pknB$  feststellen. Die Konzentration von G-6-P war in  $\Delta pknB$  nicht verändert, jedoch konnte eine 1,3-fach niedrigere F-6-P-Konzentration im Wildtyp im Vergleich mit  $\Delta pknB$  festgestellt werden. Die F-1,6-bP-Konzentration dagegen war in  $\Delta pknB$  fast 2-fach niedriger.

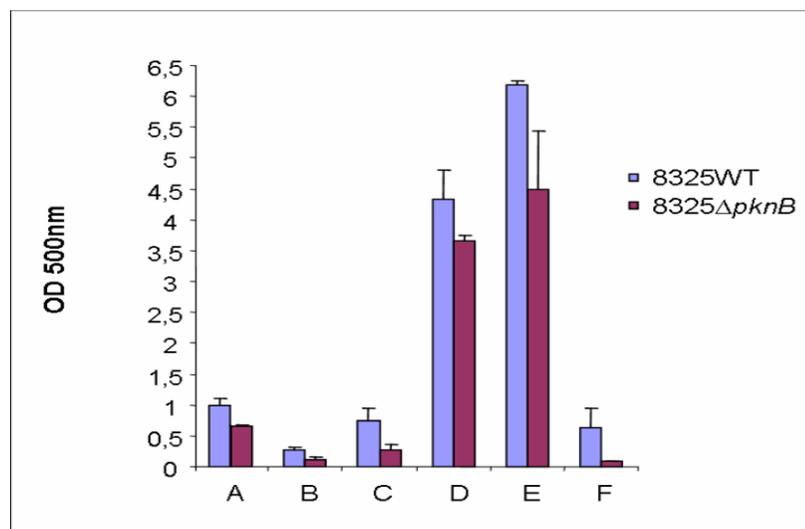
Neben der Kinase-Mutante  $\Delta pknB$  wurde auch die Phosphatase-Mutante  $\Delta yloO$  hinsichtlich ihrer intrazellulären Metabolite bei Wachstum in CDM untersucht. Wie schon bei der  $\Delta pknB$ -Mutante, zeigte sich auch bei der  $\Delta yloO$ -Mutante eine geringere A-Nukleotid-Konzentration.  $\Delta yloO$  zeigte eine 1,8-fach niedrigere AMP-Konzentration, während die ADP-Konzentration um das 1,6-fache von 0,11  $\mu\text{M}/\text{OD}$  auf 0,07  $\mu\text{M}/\text{OD}$  in  $\Delta yloO$  verringert war. Wie sich bereits für  $\Delta pknB$  gezeigt hat, war auch in  $\Delta yloO$  die Konzentration der G-Nukleotide GMP, GDP und GTP unverändert im Vergleich zum Wildtyp. Auch für die XMP-Konzentration konnte kein Unterschied festgestellt werden. Eine deutlich höhere Nukleotid-Konzentration konnte man für UMP (1,5-fach) und UDP (3-fach) im Wildtyp feststellen. Dagegen war die UTP-Konzentration nicht deutlich verändert. Ebenfalls nur gering verändert war die Konzentration der C-Nukleotide CMP, CDP und CTP. Interessanterweise wurde im Wildtyp eine IMP-Konzentration von 0,03  $\mu\text{M}/\text{OD}$  gemessen, die in  $\Delta yloO$  mehr als 2-fach geringer bei 0,01  $\mu\text{M}/\text{OD}$  lag. Die bestimmten Konzentrationen der einfach phosphorylierten Zucker G-6-P und F-6-P waren in der  $\Delta yloO$ -Mutante 1,6-fach bzw. 2-fach höher. Dagegen war die F-1,6bP-Konzentration nur geringfügig niedriger.

### 5.1.13 Effekt von PknB auf das Wachstum von *S. aureus* in CDM

Die Transkriptom-Analyse der 8325 $\Delta pknB$ -Mutante hat eine erniedrigte Expression von Genen der Purinbiosynthese und der Pyrimidinsynthese gezeigt. Dies lässt vermuten, dass die Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp einen veränderten Stoffwechsel aufweist, der sich in einem veränderten Wachstumsverhalten widerspiegeln sollte. Es ließ sich jedoch kein Unterschied zwischen beiden Stämmen feststellen, wenn diese in LB-Medium inkubiert wurden. Es konnte bereits für die

Ser/Thr-Proteinkinase Stk1 aus *S. agalactiae* eine Rolle im Purinmetabolismus beschrieben werden (Rajagopal *et al.*, 2005). Das Fehlen von *stk1* führte zu einem deutlichen Wachstumsdefekt bei Wachstum in CDM. Erst durch die Zugabe von Adenin als Purinquelle konnte dieser ausgeglichen werden.

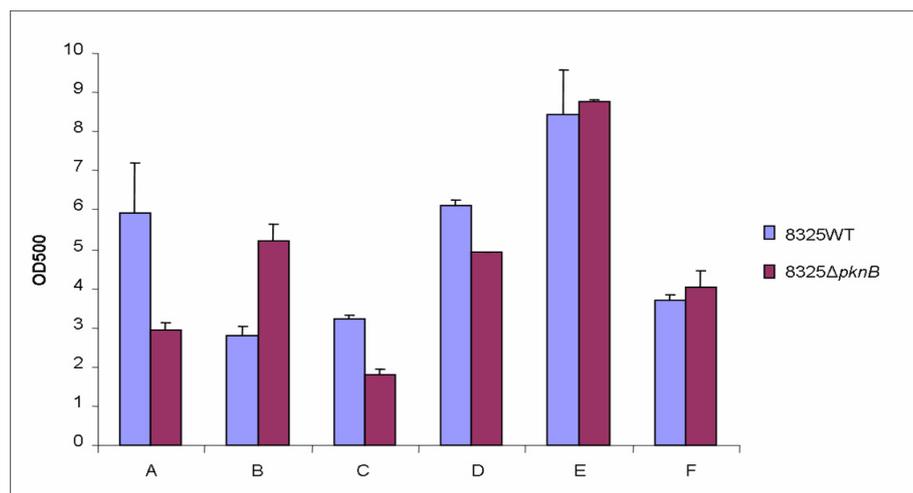
Um einen Einfluss der veränderten Expression der Gene der Purin- und Pyrimidinbiosynthese auf das Wachstum von  $\Delta pknB$  zu untersuchen, wurden die  $\Delta pknB$ -Mutante im Stamm 8325 und ihr isogener Wildtyp in dCDM (CDM ohne Purin- bzw. Pyrimidinquelle) geschüttelt. Nach Zugabe von Purinen (Adenin, Guanin, Xanthin) und Pyrimidinen (Uracil) wurde das Wachstumsverhalten untersucht, indem die OD<sub>500</sub> nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C bestimmt wurde. Wie man in Abbildung 25 erkennt, erreichte der Wildtyp in dCDM eine OD<sub>500</sub> von ~0,9 nach 24 h, während  $\Delta pknB$  eine OD<sub>500</sub> von 0,6 erreichte. Die verringerte Wachstumsrate der  $\Delta pknB$ -Mutante beim Fehlen von Purin- und Pyrimidinquellen wurde nach längerer Inkubationsdauer bis 48 h (Abb. 26A) noch deutlicher.



**Abbildung 25:** Wachstumsversuch der *pknB* 8325-Mutante im Vergleich zu ihrem isogenen Wildtyp 8325 in CDM. Das Wachstum wurde durch Messung der OD<sub>500</sub> nach 24 h Inkubation bei 37 °C bestimmt. A) dCDM ohne Purine und Pyrimidine, B) dCDM supplementiert mit Adenin, C) dCDM supplementiert mit Guanin, D) dCDM supplementiert mit Adenin und Guanin, E) dCDM supplementiert mit Xanthin, F) dCDM supplementiert mit Uracil.

Um zu untersuchen, ob dieser Wachstumsdefekt beseitigt werden kann, wurde entweder Adenin oder Guanin als einzige Purinquelle dem Medium zugegeben. Es zeigte sich jedoch, dass diese einzelne Zugabe nicht geeignet war, um den Wachstumsdefekt der Mutante nach 24 h Inkubation auszugleichen. Beide Stämme konnten ohne Repression wachsen, wenn beide Purine, Adenin und Guanin, dem

dCDM zugegeben wurden. Der Wildtyp erreichte eine  $OD_{500}$  von  $\sim 4,3$  während  $\Delta pknB$   $\sim 3,6$  erreichte. Diese Aufhebung des Wachstumsdefekts wurde mit Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 h noch deutlicher.  $\Delta pknB$  erreichte nach 48 h Wachstum mit Adenin als Purinquelle eine  $OD_{500}$  von  $\sim 5,5$ , der Wildtyp  $\sim 3,0$ . Die Zugabe von Xanthin erhöhte die Wachstumsrate für beide Stämme und scheint damit die bevorzugte Purinquelle zu sein. Nach 24 h konnte man bereits eine höhere  $OD_{500}$  für beide Stämme feststellen. Mit Xanthin als Purinquelle war es der  $\Delta pknB$ -Mutante möglich nach 48 h die gleiche  $OD_{500}$  wie der isogene Wildtyp zu erreichen (Abb. 26E). Auch die Zugabe von Uracil zum Wachstumsmedium ermöglichte erst nach 48 h Inkubation der Mutante ihren Wachstumsdefekt auszugleichen (Abb. 25F und Abb. 26F). Diese Wachstumsversuche zeigen, dass das Fehlen von PknB zu einer verringerten Fähigkeit zur Synthese ausreichender Konzentrationen an Purinen führt.



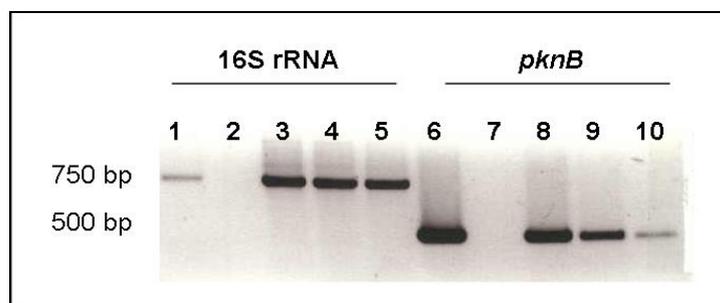
**Abbildung 26:** Untersuchung des Wachstums der *pknB* 8325-Mutante im Vergleich zu ihrem isogenen Wildtyp 8325 in CDM. Das Wachstum wurde durch Messung der  $OD_{500}$  nach 48 h Inkubation bei 37 °C bestimmt. A) dCDM ohne Purine und Pyrimidine, B) dCDM supplementiert mit Adenin, C) dCDM supplementiert mit Guanin, D) dCDM supplementiert mit Adenin und Guanin, E) dCDM supplementiert mit Xanthin, F) dCDM supplementiert mit Uracil.

### 5.1.14 Untersuchungen der *pknB*-Expression in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen unter Stressbedingungen

Ser/Thr-Kinasen spielen sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. So können sie z.B. der Bakterienzelle in ihrer Umgebung vorliegende Stressfaktoren signalisieren (Kang *et al.*, 1996; Iordanov *et al.*, 1999). In *Mycobacterium tuberculosis* wurde deshalb die Expression der STPK PknH unter Stressbedingungen untersucht. Unter pH- und Hitze-Stress fand man eine deutlich verringerte *pknH*-Transkription, während andere Stressbedingungen wie Hypoxie, osmotischer Stress oder Nährstoffentzug keinen Effekt auf die Transkription von *pknH* zeigten (Sharma *et al.*, 2004).

#### 5.1.14.1 *pknB*-Expression unter EtOH-Stress in *S. aureus* 8325

Bereits in meiner Diplomarbeit wurde der Einfluss von EtOH auf die *pknB*-Transkription im Stamm COL untersucht. Es konnte eine deutliche Erniedrigung der *pknB*-Transkription mit zunehmender EtOH-Konzentration und Inkubationsdauer festgestellt werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob sich die Transkriptmenge von *pknB* im Stamm 8325 ebenfalls unter EtOH-Stress verändert. Dazu wurden die Bakterien in LB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,0 kultiviert. Dann wurden 7 % EtOH dazugegeben und nach 5 min und nach 20 min wurden Proben zur RNA-Isolierung entnommen und mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die *pknB*-Transkriptmenge bestimmt.



**Abbildung 27:** Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der *pknB*-Expression unter EtOH-Stress in *S. aureus* 8325. Die Bakterien wurden in LB-Medium bis OD<sub>600</sub> = 1,0 kultiviert und dann für 5 min und 20 min mit 7% EtOH gestresst.

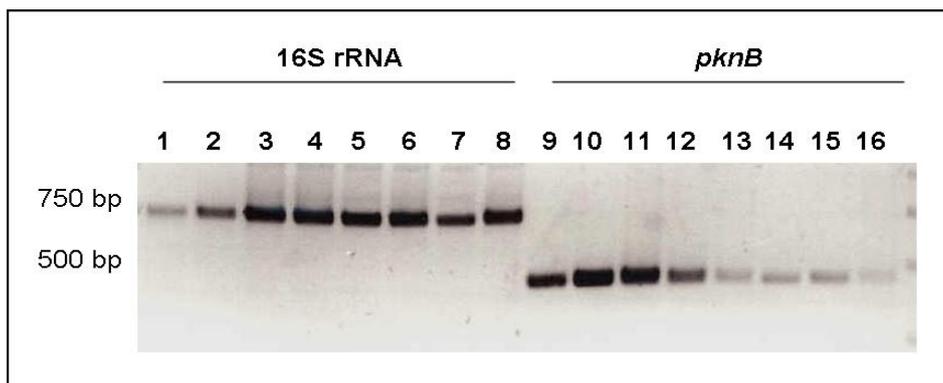
**16S rRNA** (~ 748 bp / Spur 1-5): 1: Positivkontrolle (genomische DNA); 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3: 0 min/7 % EtOH; 4: 5 min/7 % EtOH; 5: 20 min/7 % EtOH.

***pknB*** (~480 bp / Spur 6-10): 6: Positivkontrolle (genomische DNA); 7: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 8: 0 min/7 % EtOH; 9: 5 min/7 % EtOH; 10: 20 min/7 % EtOH.

Die Abbildung 27 zeigt, dass sich nach 5 min Inkubation mit 7 % EtOH die *pknB*-Transkriptmenge um das ca. 3-fache erniedrigt hat (Spur 9). Mit Verlängerung der Inkubationszeit auf 20 min konnte eine weitere Abnahme der *pknB*-Transkription beobachtet werden. Die Transkriptionsmenge war ca. 4-fach niedriger als ohne EtOH-Stress und ca. 2-fach niedriger als nach 5 min Inkubation. Die Ergebnisse stimmen mit der bereits ermittelten stark verminderten *pknB*-Expression im Stamm COL überein. Auch für den Stamm 8325 konnte eine stark verminderte Expression von *pknB* unter EtOH-Stress detektiert werden.

#### 5.1.14.2 *pknB*-Expression unter Hitze-Stress in *S. aureus* 8325 und COL

Unter EtOH-Stress ließ sich eine stark verminderte *pknB*-Transkription mittels semiquantitativer RT-PCR feststellen. Weiterhin wurde untersucht, ob die Inkubation der Bakterien bei 49 °C ebenfalls einen Einfluss auf die *pknB*-Transkriptmenge hat. Dazu wurden die Bakterien in LB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 inkubiert und dann die Temperatur von 37 °C auf 49 °C erhöht. Für die RNA-Isolierung wurden Proben nach 5 min und 20 min entnommen, sowie Kontrollen vor der Temperaturerhöhung. Wie schon bei EtOH-Stress wurde mit diesen Hitze-Stress-Proben eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt.



**Abbildung 28:** Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der *pknB*-Expression unter Hitz-Stress in *S. aureus* COL und 8325. Die Bakterien wurden in LB-Medium bis OD<sub>600</sub> = 1,0 kultiviert und dann für 5 min und 20 min durch Erhöhung der Temperatur auf 49 °C gestresst.

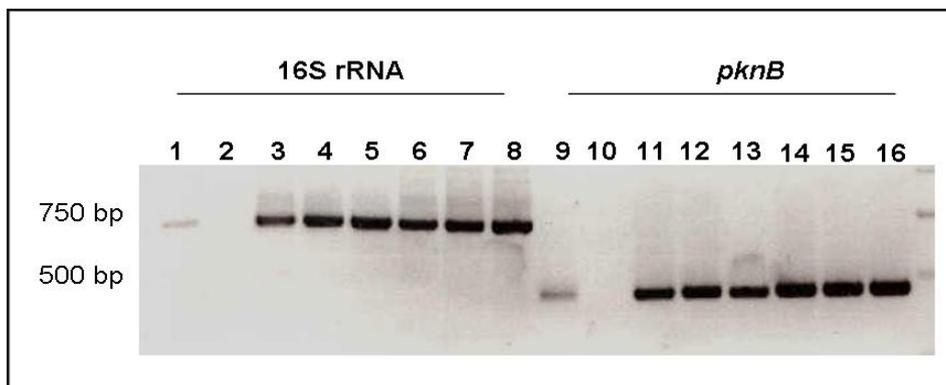
**16S rRNA** (~ 748 bp / Spur 1-8): 1: Positivkontrolle (genomische DNA/COL); 2: Positivkontrolle (genomische DNA/8325); 3: 0 min /49 °C/COL; 4: 5 min/49 °C/COL; 5: 20 min/49 °C/COL; 6: 0 min /49 °C/8325; 7: 5 min/49 °C/8325; 8: 20 min/49 °C/8325.

***pknB*** (~480 bp / Spur 9-16): 9: Positivkontrolle (genomische DNA/COL); 10: Positivkontrolle (genomische DNA/8325); 11: 0 min /49 °C/COL; 12: 5 min/49 °C/COL; 13: 20 min/49 °C/COL; 14: 0 min /49 °C/8325; 15: 5 min/49 °C/8325; 16:20 min/49 °C/8325.

Nach 5 min Inkubation der Bakterien des Stammes COL bei 49 °C kann man eine 2-fache Erniedrigung der *pknB*-Transkriptmenge feststellen (Abb. 28, Spur 12). Diese erniedrigt sich bei längerer Inkubationsdauer (20 min) weiter um das ca. 4-fache im Vergleich zur Kontrolle (Spur 13). Am deutlichsten wird der Einfluss von Hitze-Stress auf die *pknB*-Transkription im Stamm 8325. Nach 20 min Inkubation liegt nur noch ein Drittel der *pknB*-Transkriptmenge im Vergleich zur Transkriptmenge nach 5 min vor (Spur14).

### 5.1.14.3 *pknB*-Expression unter NaCl-Stress in *S. aureus* COL

Es konnte kein Einfluss von NaCl auf die Transkription von *pknH* bei *M. tuberculosis* festgestellt werden. Auch auf die *pknB*-Transkription hat NaCl keinen Einfluss im *S. aureus* Stamm COL. Den Bakterien wurde wie oben bereits beschrieben nach der Inkubation bis OD<sub>600</sub> von 1,0 1 % bzw. 3 % NaCl zugegeben und nach 5 min und 20 min Proben zur RNA-Isolierung entnommen. Wie man in Abbildung 29 sehen kann, liegt zu allen untersuchten Zeitpunkten und Salzkonzentrationen (1 % NaCl bzw. 3 % NaCl) die gleiche *pknB*-Transkriptmenge vor. Demnach hat eine Erhöhung der NaCl-Konzentration keinen Einfluss auf die *pknB*-Expression.



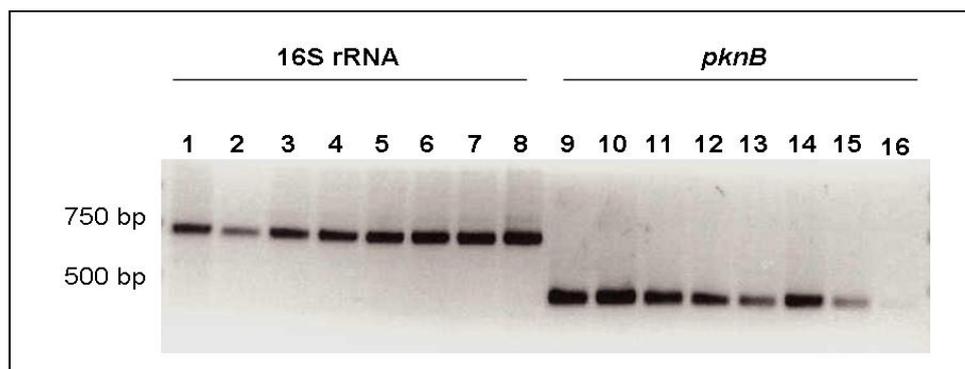
**Abbildung 29:** Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der *pknB*-Expression unter NaCl-Stress in *S. aureus* COL. Die Bakterien wurden in LB-Medium bis zu OD<sub>600</sub> = 1,0 kultiviert und dann für 5 min und 20 min mit Zugabe von 1 % bzw. 3 % NaCl gestresst.

**16SrRNA** (~ 748 bp / Spur 1-8): 1: Positivkontrolle (genomische DNA); 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3:0 min /1 % NaCl; 4: 5 min/1 % NaCl; 5: 20 min/1 % NaCl; 6: 0 min /3 % NaCl; 7: 5 min/3 % NaCl; 8: 20 min/3 % NaCl.

***pknB*** (~480 bp / Spur 9-16): 9:Positivkontrolle (genomische DNA); 10: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 11:0 min /1 % NaCl; 12:5 min/1 % NaCl; 13:20 min/1 % NaCl; 14:0 min /3 %NaCl; 15:5 min/3 % NaCl; 16:20 min/3 % NaCl.

#### 5.1.14.4 *pknB*-Expression unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress in den *S. aureus*-Stämmen COL, 8325, SH1000 und 8325-4

Um zu testen ob oxidativer Stress einen Einfluss auf die *pknB*-Transkription hat, wurden die Stämme COL, 8325, SH1000 und 8325-4 bis zur OD<sub>600</sub> von 1,0 bei 37 °C inkubiert und dann mit 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst. Nach 5 min und 20 min wurden jeweils Proben entnommen und die RNA isoliert. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die *pknB*-Transkriptmenge bestimmt. In allen vier untersuchten Stämmen konnte eine Erniedrigung der *pknB*-Transkription mit zunehmender Inkubationsdauer mit 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> festgestellt werden (Abb. 30 und Abb. 31). Im Stamm COL lag nach 20 min Inkubation noch die Hälfte des *pknB*-Transkriptes vor (Abb. 30, Spur 13). Beim Stamm 8325 war bereits nach 5 min Inkubation mit 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine 3- bis 4-fache Erniedrigung der Transkriptmenge zu erkennen. Nach 20 min war, wie man in Spur 16 feststellen kann, kaum noch das *pknB*-Transkript vorhanden.

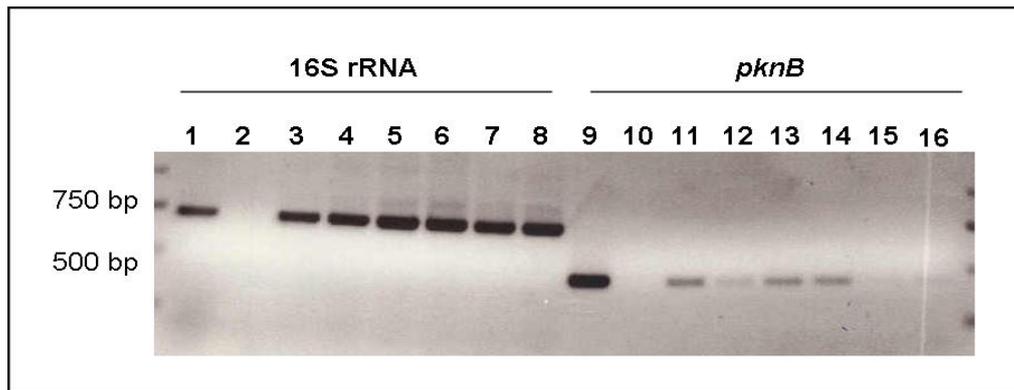


**Abbildung 30:** Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der *pknB*-Expression unter 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress in *S. aureus* COL und 8325. Die Bakterien wurden in LB-Medium bis zu OD<sub>600</sub> = 1,0 kultiviert und dann für 5 min und 20 min durch Zugabe von 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst.

**16SrRNA** (~ 748 bp / Spur 1-8): 1: Positivkontrolle (genomische DNA/COL); 2: Positivkontrolle (genomische DNA/8325); 3: 0 min/COL; 4: 5 min/COL; 5: 20 min/COL; 6: 0 min/8325; 7: 5 min/8325; 8: 20 min/8325.

***pknB*-Primer** (~480 bp / Spur 9-16): 9: Positivkontrolle (genomische DNA/COL); 10: Positivkontrolle (genomische DNA/8325); 11: 0 min/COL; 12: 5 min/COL; 13: 20 min/COL; 14: 0 min/8325; 15: 5 min/8325; 16: 20 min/8325.

Auch für die Stämme SH1000 und 8325-4 konnte eine deutliche Abnahme des *pknB*-Transkriptes mit zunehmender Inkubationszeit in Anwesenheit von 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> festgestellt werden (Abb. 31). Nach 20 min Inkubation war kaum noch *pknB*-Transkript erkennbar (Spur 13 bzw. 16). Im Stamm 8325-4 lag bereits nach 5 min kaum noch *pknB*-Transkript vor (Abb. 31, Spur 12).



**Abbildung 31:** Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der *pknB*-Expression unter 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress in den Stämmen SH1000 und 8325-4. Die Bakterien wurden in LB-Medium bis zu OD<sub>600</sub> = 1,0 kultiviert und dann für 5 min und 20 min durch Zugabe von 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst.

**16SrRNA** (~ 748 bp / Spur 1-8): 1: Positivkontrolle (genomische DNA); 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3: 0 min/SH1000; 4: 5 min/SH1000; 5: 20 min/SH1000; 6: 0 min/8325-4; 7: 5 min/8325-4; 8: 20 min/8325-4.

***pknB*** (~480 bp / Spur 9-16): 9: Positivkontrolle (genomische DNA); 10: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 11: 0 min/SH1000; 12: 5 min/SH1000; 13: 20 min/SH1000; 14: 0 min/8325-4; 15: 5 min/8325-4; 16: 20 min/8325-4.

### 5.1.15 Einfluss von PknB auf die Antibiotikaempfindlichkeit

Die Ser/Thr-Kinase PknB von *S. aureus* besitzt in ihrem C-terminalen Bereich drei putative PASTA-Domänen (Penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated domain) (Yeast *et al.*, 2002). Es wird davon ausgegangen, dass diese putativ extrazellulären PASTA-Domänen an den  $\beta$ -Lactamring von  $\beta$ -Lactamantibiotika binden könnten. Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob die Deletion von PknB einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Mutante gegenüber Zellwandaktiven Antibiotika hat, wurden die MHK-Werte verschiedener Zellwandaktiver Antibiotika in den wildtypischen Stämmen 8325 und COL und den entsprechenden isogenen Deletionsmutante bestimmt. Die ermittelten MHK-Werte der jeweiligen Antibiotika sind in Tabelle 20 dargestellt.

**Tabelle 20:** MHK-Bestimmung der *S. aureus* Stämme 8325 und COL sowie deren isogenen *pknB*-Mutanten gegenüber verschiedenen Antibiotika.

Antibiotikum	MHK ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	<i>S. aureus</i> 8325, WT	<i>S. aureus</i> 8325, $\Delta pknB$	<i>S. aureus</i> COL, WT	<i>S. aureus</i> COL, $\Delta pknB$
Bacitracin	32	32	16	16
Cefepim	2	1	128	64
Ceftriaxon	2	1	265	128
Chloramphenicol	4	8	n.b.	n.b.
D-Cycloserin	32	32	32	32
Fosfomycin	16	8	16	8
Gentamicin	0,25	0,5	n.b.	n.b.
Methicillin	0,25	0,125	256	16
Sulfadiazin	128	128	n.b.	n.b.
Trimethoprim	128	128	n.b.	n.b.
Tunicamycin	64	1	128	32
Vancomycin	1	1	2	2

n.b. : nicht bestimmt

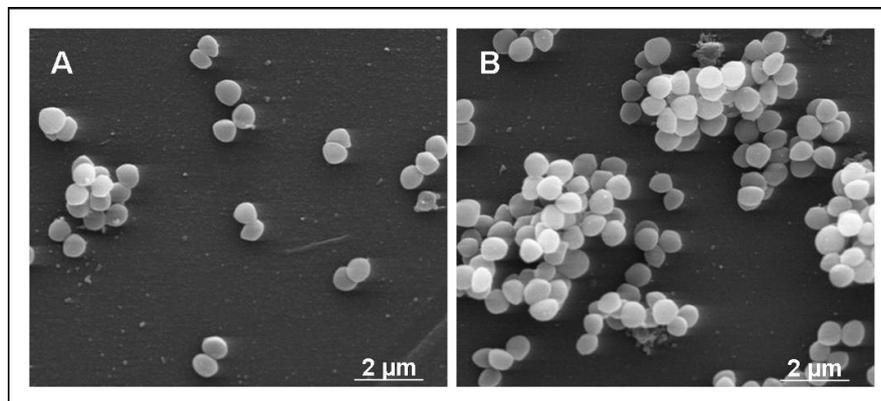
Danach zeigte  $\text{COL}\Delta pknB$  eine 16-fach erniedrigte MHK im Vergleich zum Methicillin-resistenten Wildtyp mit einer MHK von 256  $\mu\text{g/ml}$ . Die  $8325\Delta pknB$ -Mutante wies für beide Antibiotika eine 2-fach erhöhte Empfindlichkeit auf. Gegenüber Tunicamycin zeigte die Deletionsmutante ebenfalls eine deutlich höhere Empfindlichkeit. Während  $8325\Delta pknB$  eine MHK von 1  $\mu\text{g/ml}$  vorwies, lag diese beim Wildtyp bei 64  $\mu\text{g/ml}$ . Im Stamm COL zeigten der Wildtyp eine MHK von 128  $\mu\text{g/ml}$  und die  $\text{COL}\Delta pknB$  eine 4-fach niedrigere. Kein Unterschied in der MHK konnte für die Antibiotika Trimethoprim und Sulfadiazin, Hemmstoffe der Folsäure-Synthese, gemessen werden. Interessanterweise wies  $8325\Delta pknB$  eine 2-fach höhere Resistenz gegenüber Gentamicin auf. Die MHK lag hier bei 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Gentamicin hemmt die Proteinbiosynthese.

### 5.1.16 Untersuchungen zum Einfluss von PknB auf die Zellmorphologie und Zellwandstruktur

Das Fehlen der STPK PknB im Stamm 8325 und COL führte zu einer Erniedrigung der Empfindlichkeit gegenüber dem Zellwand-aktiven Antibiotikum Methicillin (Tab. 20). Beltramini *et al.*, (2009) konnte des Weiteren zeigen, dass sich beim Fehlen von *pknB* die MHK für verschiedene  $\beta$ -Lactamantibiotika deutlich erniedrigt. Interessanterweise konnte außerdem ein Unterschied in der Morphologie der Zellwand im Stamm N315 im Vergleich mit den isogenen  $\Delta pknB$ -,  $\Delta yloO$ - und  $\Delta pknB/\Delta yloO$ -Mutanten mittels TEM detektiert werden (Beltramini *et al.*, 2009).

Um eine mögliche Rolle von PknB bei der Zellwandsynthese von *S. aureus* zu untersuchen, wurden die *pknB*-Deletionsmutante und ihr isogener Wildtyp mittels TEM und REM untersucht. Außerdem wurde die Lokalisation von PknB mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

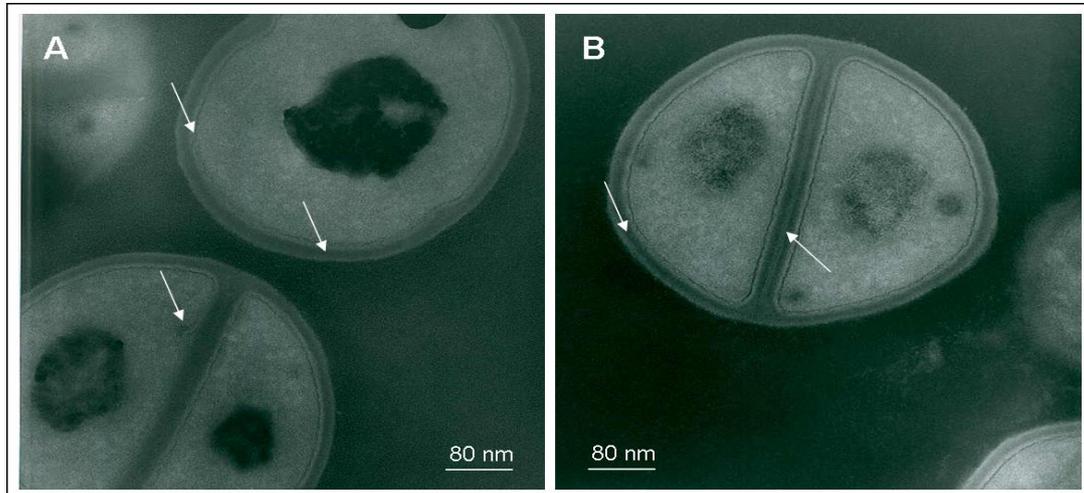
Wie man anhand der REM-Bilder in Abbildung 32 erkennen kann, bildet  $8325\Delta pknB$  größere „Zellcluster“ im Vergleich mit dem isogenen Wildtypstamm.



**Abbildung 32:** Rasterelektronenmikroskopie der stationären *S. aureus* Stämme 8325WT (A) und  $8325\Delta pknB$  (B).

Um mögliche Unterschiede in der Zellwandmorphologie zwischen  $8325\Delta pknB$  und Wildtyp zu detektieren, wurden Bakterienkulturen beider Stämme bis zur stationären Phase inkubiert und anschließend mittels Transselektroskopie (TEM) untersucht. Die Ergebnisse zeigten (Abb. 33), dass die Zellwand- und Membranregionen der *pknB*-Mutante insgesamt eher elektronenschwach und welliger erscheinen. Außerdem kann man öfter Unterbrechungen sowie eine

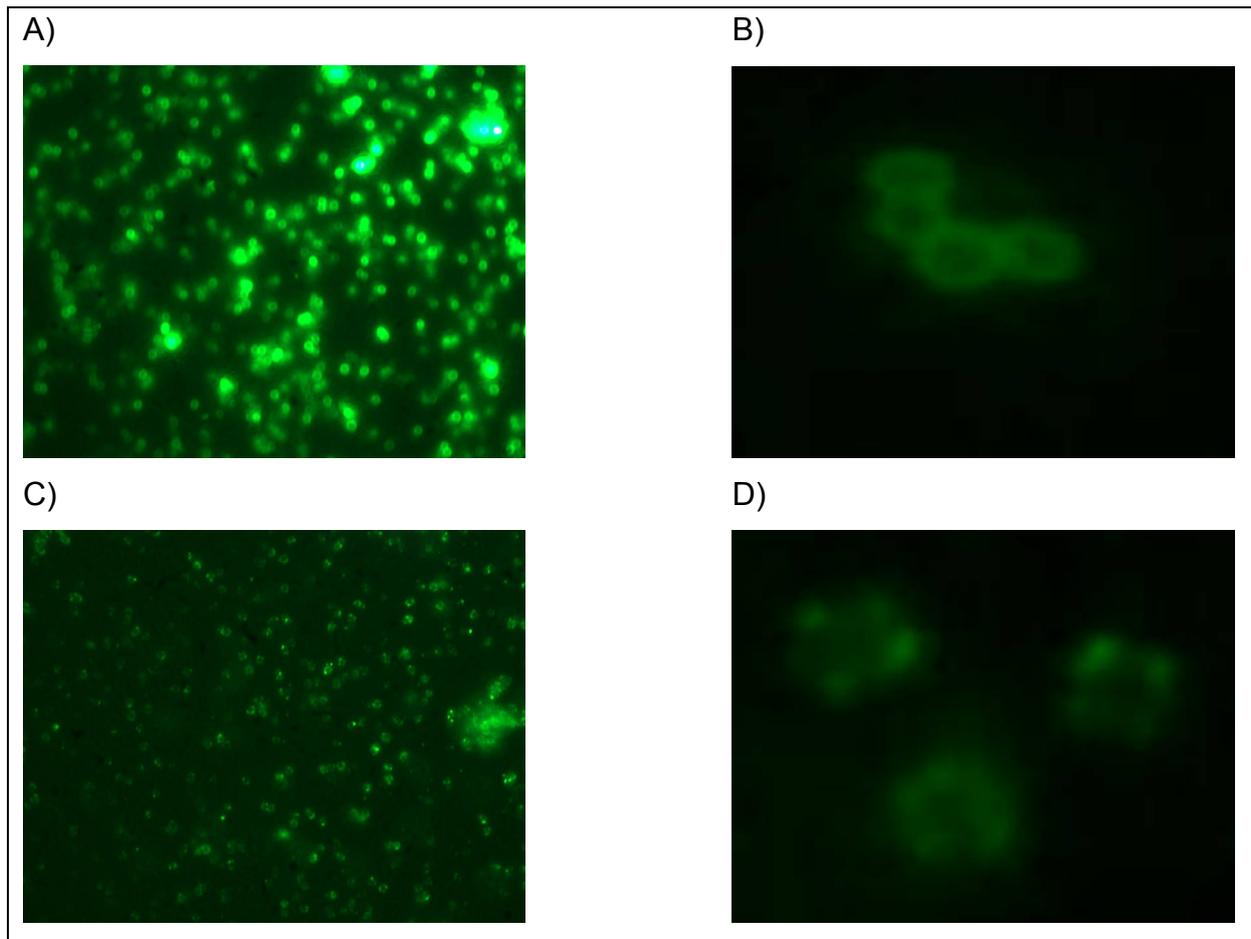
insgesamt eher fragile Erscheinung erkennen (Abb. 33, Pfeile). Dagegen erscheinen diese Regionen im Wildtyp dicker, d.h. deutlicher gefärbt und erkennbar sowie ohne Unterbrechungen.



**Abbildung 33:** Transelektronenmikroskopie der stationären *S. aureus* Stämme 8325 $\Delta$ *pknB* (A) und 8325WT (B). Die Pfeile markieren Unterschiede in der Struktur der Zellwand- und Membranregionen, wie eine deutlichere Färbung und keine Unterbrechungen innerhalb dieser Regionen im WT.

Weiterhin wurde die Lokalisation von PknB mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurde der *S. aureus* Stamm SA113 sowie die SA113 $\Delta$ *spa*-Mutante verwendet. Das Gen *spa* codiert für das Protein A, das unspezifisch Antikörper am Fc-Teil bindet und falsch-positive Fluoreszenzsignale verursacht. Daher wurde mit einer Protein A-Deletionsmutante gearbeitet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers.

Die Abbildungen 34A und 34B zeigen den SA113 Wildtyp. Deutlich kann man die ringförmige Färbung des Proteins A erkennen. Betrachtet man dagegen die Abbildungen 34C und 34D, erkennt man keine unspezifische Protein A-Färbung. Dagegen kann man die punktuelle Färbung von PknB auf der Zelle erkennen. Diese Färbung erscheint in mehreren Bereichen stärker. Die Experimente lassen eine Lokalisation von PknB in der Nähe des Septums oder an den Polen vermuten. Weitere mikroskopische Untersuchungen z.B. mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie sind jedoch notwendig, um die Lokalisation von PknB abzusichern.



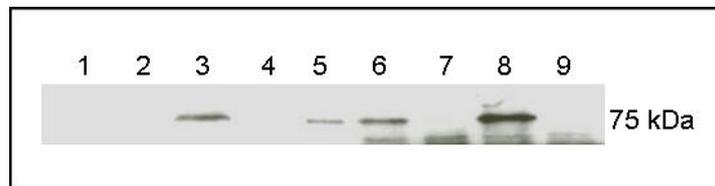
**Abbildung 34:** Immunofluoreszenzmikroskopie *S. aureus* SA113WT (A und B) und SA113 $\Delta$ *spa* (C und D). Die Bakterien wurden über 18 h in TSB-Medium angezogen und anschließend mit anti-PknB<sub>1-274</sub> und sekundärem FITC-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper behandelt.

### 5.1.17 Detektion von extrazellulärem PknB

Yersinien injizieren ihre STPK YpkA mittels Typ-III-Sekretionssystem in den Wirtsorganismus. Es konnte gezeigt werden, dass Yersinien dadurch nicht phagozytiert werden können, außerdem wiesen sie eine veränderte Virulenz im Tiermodell auf (Laskowski-Arce & Orth, 2007).

Staphylokokken besitzen als grampositive Bakterien kein Typ-III-Sekretionssystem. Dennoch ist es denkbar, dass PknB auch extrazellulär gefunden werden kann. Deshalb wurden zytoplasmatische und extrazelluläre Proteinextrakte der Stämme 8325 Wildtyp und 8325 $\Delta$ *pknB* im Western Blot mit anti-PknB<sub>1-274</sub> Antikörpern untersucht. Dazu wurden Proben bei einer OD<sub>600</sub> von 1,8 und 2,0 genommen. PknB

lässt sich im Wildtyp zu jedem gemessenen Zeitpunkt zytoplasmatisch detektieren. Interessanterweise wurde bei einer  $OD_{600}$  von 2,0 PknB auch extrazellulär (Abb. 35, Spalte 8) gefunden. Im Unterschied dazu konnte PknB in der  $\Delta pknB$ -Mutante wie erwartet nicht nachgewiesen werden (Negativkontrolle).



**Abbildung 35:** Nachweis von zytoplasmatischem und extrazellulärem PknB. Western Blot-Analyse mit anti-PknB<sub>1-274</sub> Antikörper. Spalte 1-4 zeigt zytoplasmatische Zellextrakte. Spalte 5-9 extrazelluläre Zellextrakte. 1 und 6: 8325WT/ $OD_{600}$  1,8; 2 und 7: 8325 $\Delta pknB$ / $OD_{600}$  1,8; 3 und 8: 8325WT/ $OD_{600}$  2,0; 4 und 9: 8325 $\Delta pknB$ / $OD_{600}$  2,0; 5: 8325WT/ $OD_{600}$  0,8.

### 5.1.18 Zusammenfassung II:

- Mittels Analyse des intrazellulären Metaboloms konnte eine veränderte Nukleotidsynthese in 8325 $\Delta$ *pknB* gezeigt werden. Somit konnten die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse auf Ebene der Metabolite bestätigt werden.
- Mittels Analyse des intrazellulären Metaboloms konnte außerdem eine veränderte Nukleotidsynthese in 8325 $\Delta$ *yloO* gezeigt werden.
- Wachstumsversuche in CDM belegen eine Rolle von PknB bei der Purin- und Pyrimidinbiosynthese.
- Die Expression von *pknB* wird unter dem Einfluss verschiedener Stressfaktoren wie Hitze, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EtOH in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen deutlich vermindert.
- Die Deletion von *pknB* führte zu einer Erniedrigung der Resistenz von *S. aureus* 8325 und COL gegen verschiedene Antibiotika:
  - 8325 $\Delta$ *pknB* und COL $\Delta$ *pknB* zeigten eine verringerte MHK gegen die  $\beta$ -Lactamantibiotika Methicillin und Cefepim sowie gegen Tunicamycin und Fosfomycin.
- Die TEM-Analyse zeigte, dass 8325 $\Delta$ *pknB* im Vergleich zum Wildtyp veränderte Zellwandstrukturen aufweist.
- Die REM-Analyse zeigte, dass 8325 $\Delta$ *pknB* größere Zellcluster bildet als 8325WT.
- Die Immunofluoreszenzmikroskopie lässt eine punktuelle Lokalisation von PknB vermuten.
- PknB kann mittels anti-PknB<sub>1-274</sub> in einer Western Blot-Analyse in extrazellulären Zellextrakten des *S. aureus*-Stammes 8325 detektiert werden.

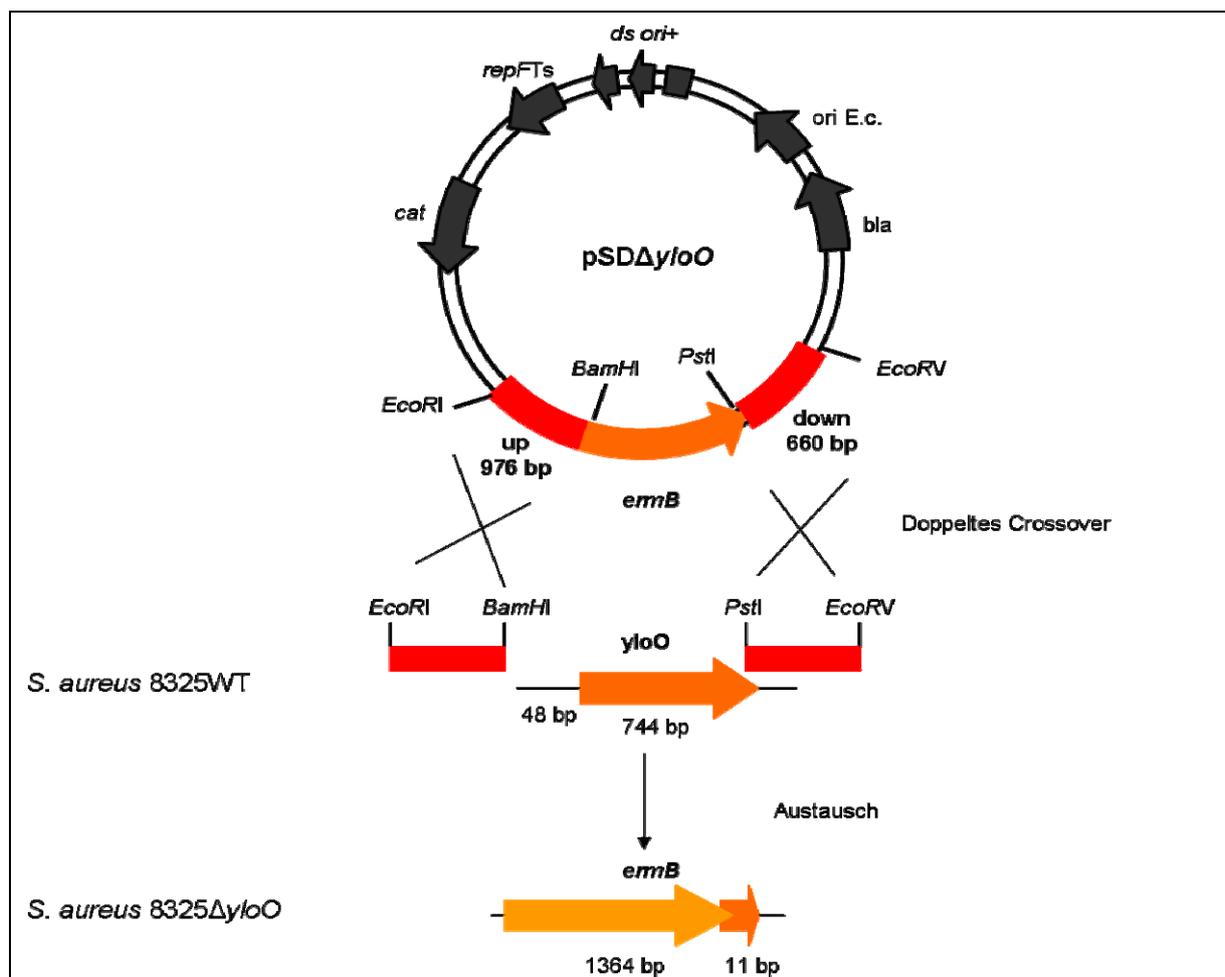
## 5.2 Charakterisierung der Ser/Thr-Proteinphosphatase YloO (SA1062) in *S. aureus*

### 5.2.1 Herstellung einer *yloO*-Deletionsmutante im *S. aureus*-Stamm 8325

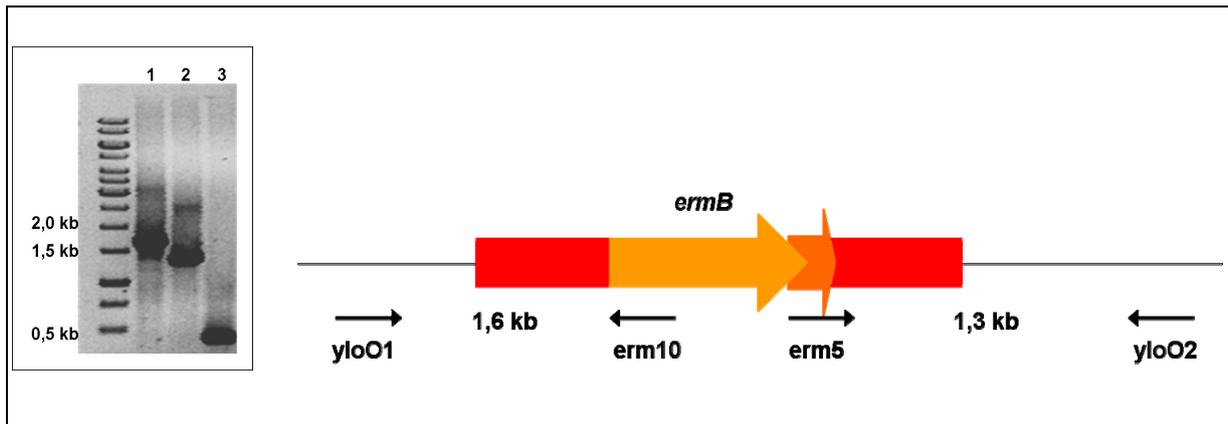
Das Gen *yloO* (SA1062) codiert für eine Ser/Thr-Proteinphosphatase, die kürzlich von Beltramini *et al.* (2009) erstmals in *S. aureus* N315 charakterisiert wurde. Diese bakterielle Phosphatase ähnelt der humanen Proteinphosphatase PP2C, einem Mitglied der PPM Familie. Zu Beginn meiner Arbeit wurde der ORF SA1062 von uns *yloO* genannt, in Anlehnung an die in *B. subtilis* beschriebene Phosphatase YloO (Obuchowski *et al.*, 2000). Später wurde anstelle der Genbezeichnung *yloO* jedoch auch *stp* verwendet.

Zur Herstellung der *yloO*-Deletionsmutante wurde zunächst die codierende Sequenz des ORFs SA1062 (*yloO*, 744 bp) im *S. aureus*-Stamm 8325 deletiert, indem sie gegen die codierende Sequenz der Erythromycin-Kassette (*ermB*, 1346 bp) ausgetauscht wurde (Abb. 36). Wie bereits beschrieben (siehe Methoden 4.4.13) wurde je ein DNA-Fragment stromaufwärts und stromabwärts des Zielgens amplifiziert und flankierend zur *ermB*-Kassette in den Shuttle-Vektor pBT2 kloniert. An die verwendeten Primer wurden die für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen angehängt. Für das „Upstream“-Fragment wurden die Primer *yloO*-up-EcoRI und *yloO*-up-BamHI verwendet. Das Fragment umfasste 976 bp. Das „Downstream“-Fragment wurde mit den Primern *yloO*-down-PstI und *yloO*-down-EcoRV amplifiziert und war 660 bp lang. Die *ermB*-Kassette wurde aus dem Vektor pGEMTermB1 mit den Enzymen BamHI und PstI heraus gespalten. Nachdem das Plasmid pSDΔ*yloO* in den Zielstamm *S. aureus* 8325 transduziert worden war, sollte durch eine homologe Rekombination zwischen den beiden Sequenzen auf dem Plasmid und den entsprechenden homologen Sequenzen auf dem Chromosom des Empfängers das *yloO*-Gen gegen die *ermB*-Kassette ausgetauscht werden. Nach erfolgreichem Austausch der Gensequenzen sind nur noch 11 bp des *yloO*-Gens am 3'-Ende vorhanden. Gleichzeitig wurden zusätzlich zum ORF 48 bp stromaufwärts des *yloO*-ORFs deletiert. Putative Deletionsmutanten konnten anhand ihrer erworbenen Resistenz gegenüber Erythromycin vorselektiert werden. Außerdem sollten die Deletionsmutanten, nach dreimaliger Subkultivierung

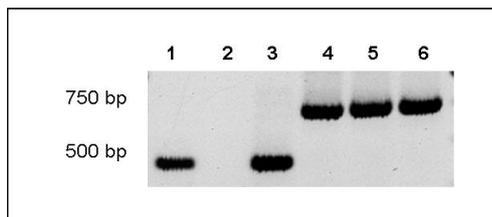
bei 42 °C, den Vektor pSD $\Delta$ *yloO* verloren haben und Chloramphenicol-sensitiv sein. Klone, die dieses Wachstumsverhalten zeigten, wurden mit Hilfe von PCR-Analysen auf die erfolgreiche Deletion von *yloO* und damit die Integration der *ermB*-Kassette überprüft. Zum einen wurde eine Nachweis-PCR mit den Primern *yloO1* und *erm10* sowie *erm5* und *yloO2* (Abb. 37) und chromosomaler DNA als Template durchgeführt. Zum anderen wurde mittels semiquantitativer RT-PCR der Verlust des *yloO*-Transkriptes überprüft. Dazu wurde die RNA aus einer Bakterienkultur bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 isoliert. Dann wurde eine reverse Transkription mit „random“-Hexamer-Primern (Amersham) durchgeführt. Weiterhin wurde das Fehlen eines *yloO*-Transkripts mit Hilfe der Primer *yloO*-RT up und *yloO*-RT down nachgewiesen. Die Primer 16S rRNA up und 16S rRNA down dienen als Kontroll-PCR zum Nachweis gleicher Mengen RNA in dem Ausgangsmaterial (Abb. 38).



**Abbildung 36:** Schematische Darstellung der Strategie zur Deletion von *yloO* (*stp*). „Upstream“- und „Downstream“-Fragmente des Zielgens, mit der Länge 976 bp und 660 bp, flankieren die Erythromycin-Resistenzkassette (*ermB*) auf dem Shuttle-Vektor pSD $\Delta$ *yloO*. Bei homologer Rekombination der identischen Sequenzen auf dem Plasmid und der chromosomalen DNA des Zielstammes kommt es zum Austausch des Zielgens *yloO* durch die Erythromycin-Resistenzkassette *ermB*. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind angegeben.



**Abbildung 37:** PCR-Analyse zum Nachweis des erfolgreichen *yloO*-Austausches mit der *ermB*-Kassette. Es wurden die Primerpaare *yloO1* und *erm10* (Spur 1; 1,6 kb) sowie *erm5* und *yloO2* (Spur 2; 1,3 kb) und chromosomale DNA aus 8325 $\Delta$ *yloO* verwendet. In Spur 3: Kontroll-PCR mit chromosomaler DNA aus 8325WT und *yloO*-RT Primern (399 bp).



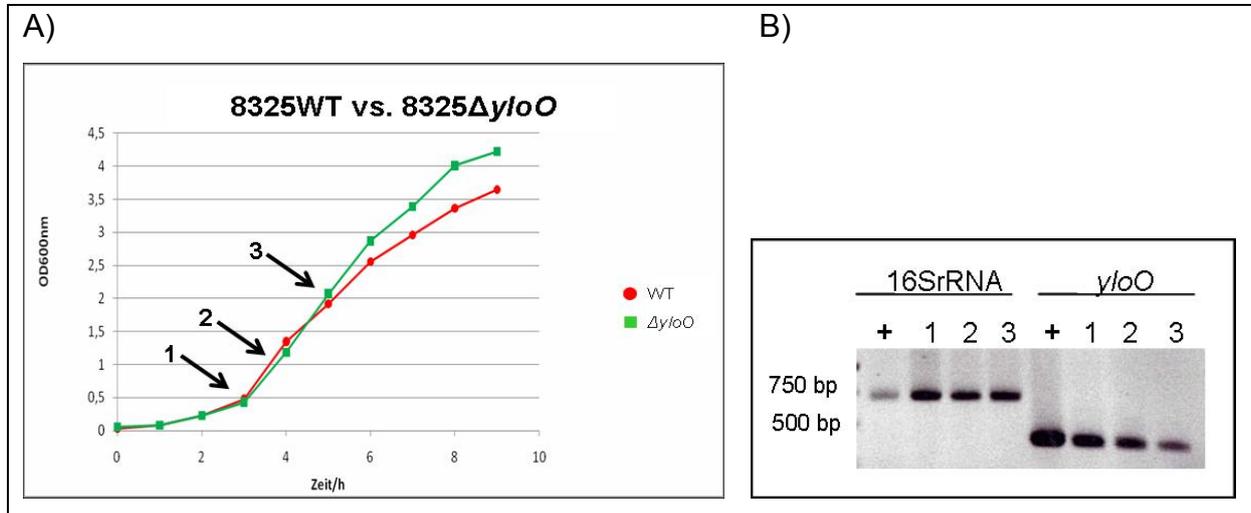
**Abbildung 38:** Semi-quantitative RT-PCR-Analyse zum Nachweis der erfolgreichen *yloO*-Deletion. Je 2  $\mu$ g RNA aus Wildtyp und Mutante wurden mit „random“-Hexamer-Primern umgeschrieben. Die Nachweis-PCR erfolgte mit den Primerpaaren *yloO* RT up und *yloO* RT down (Spur 1-3). Spur 1: cDNA 8325WT; Spur 2: cDNA 8325 $\Delta$ *yloO*, Spur 3: genomische DNA 8325WT. Als Kontrolle dienen 16S rRNA-Primer (Spur 4-6).

### 5.2.2 Untersuchungen zur Expressionskinetik von *yloO* in *S. aureus* 8325

Um Aussagen über die zeitliche Expression des für die Ser/Thr-Phosphatase codierenden Gens *yloO* im Verlauf des Wachstums zu erhalten, wurde dessen Expression mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Dazu wurde eine Übernachtskultur des *S. aureus*-Wildtypstammes 8325 in LB-Medium angezogen. Am nächsten Morgen wurde eine frische 50 ml Kultur mit dieser Übernachtskultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 eingestellt und bei 37 °C weiter kultiviert. Zu verschiedenen Wachstumsphasen wurden Proben für die RNA-Isolierung entnommen und die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Diese Probenentnahme erfolgte bei  $OD_{600}$  von 0,5 1,0 und 2,0.

Das *yloO*-Gen wurde am stärksten am Anfang der exponentiellen Phase bei  $OD_{600}$  von 0,5 exprimiert. Eine geringfügige Abnahme der Expression von *yloO* war

während der Mitte der exponentiellen Phase ( $OD_{600}$  von 1,0) zu erkennen (Abb. 39B). Während der späten exponentiellen Phase ( $OD_{600}$  von 2,0) konnte eine fast 2-fach schwächere *yloO*-Transkriptmenge festgestellt werden.



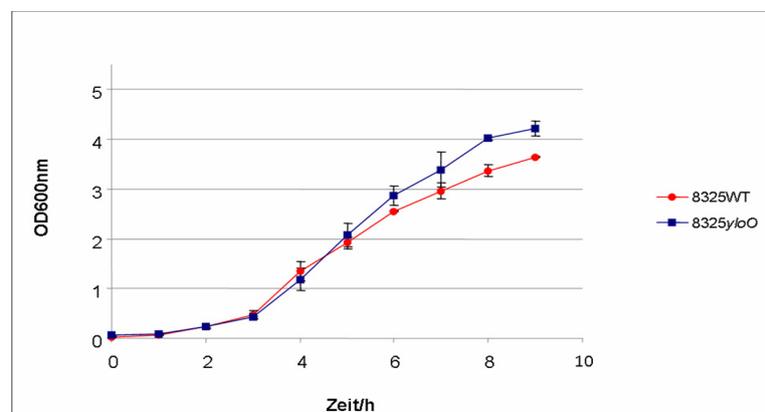
**Abbildung 39:** Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der Expressionskinetik von *yloO* in *S. aureus* 8325. Die Bakterien wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert und zu drei Zeitpunkten bei  $OD_{600}$  von 0,5, 1,0 und 2,0 wurden Proben zur RNA-Isolierung entnommen.

Als Kontrolle dient 16S rRNA-spezifische Fragmente (~ 748 bp). Für den Nachweis des *yloO*-Transkripts wurden die Primer *yloO*-RT up und *yloO*-RT down verwendet (~480 bp):

+:Positivkontrolle (genomische DNA); 1: WT/ $OD$  0,5; 2: WT/ $OD$  1,0; 3: WT/ $OD$  3,0;

### 5.2.3 Phänotypische Charakterisierung von 8325 $\Delta$ yloO

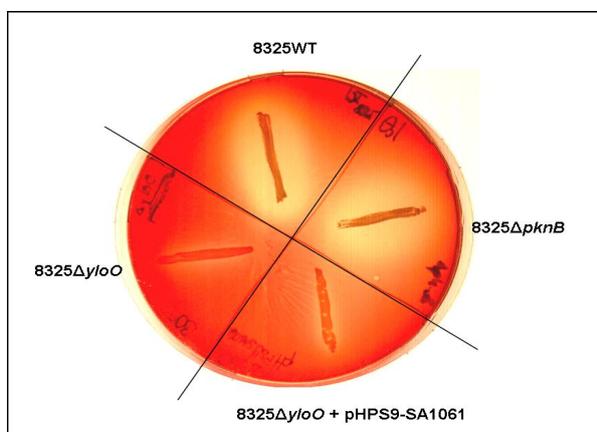
Wachstumsversuche in LB-Medium bei 37 °C zeigten keine Wachstumsverminderung der 8325*yloO*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 40).



**Abbildung 40:** Wachstumskurve von 8325WT und 8325 $\Delta$ yloO in LB-Medium bei 37 °C. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei biologisch unabhängigen Experimenten.

Die STPK PrkC aus *B. subtilis* ist zu 37 % homolog zur Aminosäuresequenz von PknB aus *S. aureus*. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Deletionsmutante  $\Delta prkC$  eine stark verminderte Fähigkeit zur Sporen- und Biofilmbildung aufweist (Madec *et al.*, 2002). Außerdem konnte bereits in meiner Diplomarbeit gezeigt werden, dass die Deletion der STPK PknB in den *S. aureus*-Stämmen 8325 und COL nicht zu einer veränderten Adhärenz an Polystyren und damit nicht zu einer veränderten Fähigkeit zur Biofilmbildung führt (Donat, 2005). Um zu untersuchen, ob die Deletion der Ser/Thr-Phosphatase YloO zu einer veränderten Biofilmbildung führt, wurden der Wildtypstamm 8325 und die isogene  $\Delta yloO$ -Mutante über Nacht in Polystyren-Mikrotiterplatten bei 37 °C und 30 °C in TSB-Medium kultiviert. Mittels Kristallviolett-Färbung wurde schließlich der Biofilm sichtbar gemacht. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Fähigkeit der beiden Stämme unter beiden Wachstumsbedingungen Biofilm an Polystyren zu bilden festgestellt werden.

Um einen ersten Eindruck über die Fähigkeit der  $\Delta yloO$ -Mutante zur Hämolyse zu gewinnen, wurden die Stämme 8325WT sowie die isogenen Deletionsmutanten  $8325\Delta yloO$  und  $8325\Delta pknB$  auf eine 5%ige Kaninchenblutagarplatte ausgestrichen. Wie man in Abbildung 41 sieht, zeigten sowohl die Kinasemutante  $\Delta pknB$  als auch der Wildtypstamm eine deutliche Hämolyse auf 5%igen Kaninchenblutplatten. Die Phosphatasemutante  $\Delta yloO$  dagegen hämolysiert nur sehr schwach die Erythrozyten. Man kann deshalb vermuten, dass  $\Delta yloO$  eine erniedrigte  $\alpha$ -Toxin-Produktion im Vergleich zum Wildtypstamm und  $\Delta pknB$  aufweist.



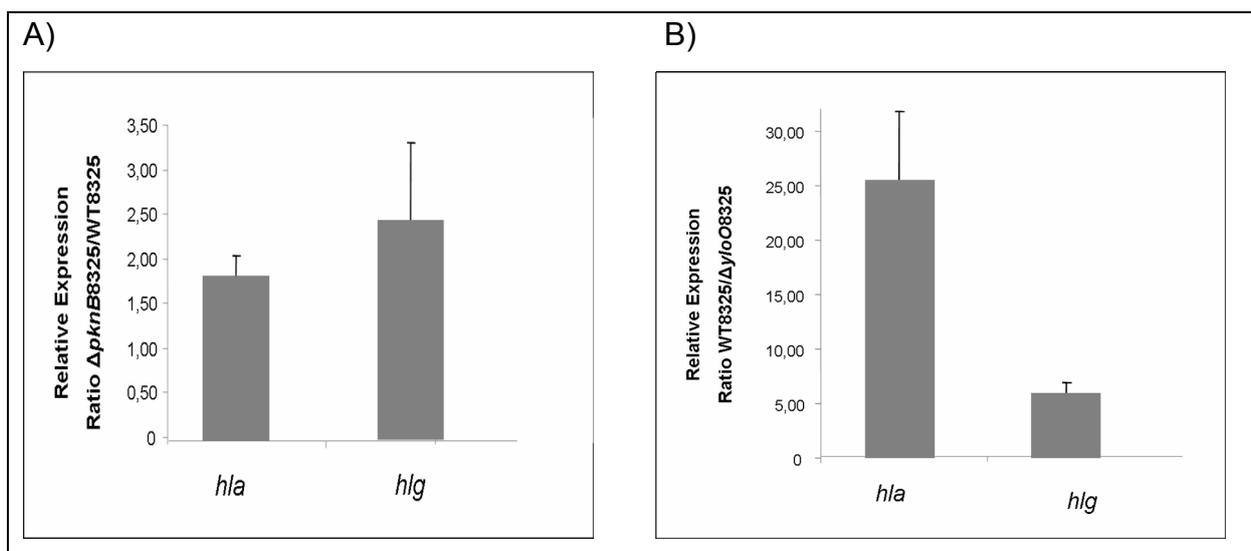
**Abbildung 41:** Ausstrich der Stämme 8325WT,  $8325\Delta pknB$ ,  $8325\Delta yloO$  und  $8325\Delta yloO + pHPS9-SA1061$  auf 5%igen Kaninchenblutagarplatten.  $8325\Delta yloO$  zeigt eine deutlich verringerte Hämolyse.

### 5.2.4 Untersuchung der Hämolysexpression (*hla*, *hlg*) in $8325\Delta pknB$ und $8325\Delta yloO$

Die Microarray-Analyse hat gezeigt, dass in  $8325\Delta pknB$  das Gen für das  $\alpha$ -Hämolyxin *hla* stärker exprimiert wird als im isogenen Wildtyp. Außerdem zeigte  $\Delta pknB$  eine deutlich höhere hämolytische Aktivität bei Wachstum auf Blutagarplatten (Abb. 41) sowie in einem Flüssig-Hämolyxintest (Diplomarbeit, 2005). Im Vergleich dazu konnte für  $\Delta yloO$  eine deutlich niedrigere Hämolyse auf Blutagar identifiziert werden (Abb. 41). Diese phänotypischen Ergebnisse lassen eine verringerte Expression der für die hämolytischen Toxine codierenden Gene *hla* und *hlg* vermuten. Um eine veränderte Expression dieser Gene nachzuweisen, wurde eine quantitative RT-PCR-Analyse durchgeführt. Die Bakterien wurden bis zu  $OD_{600}$  1,0 inkubiert, um anschließend die RNA zu isolieren.

Die  $\Delta pknB$ -Mutante zeigte eine ca. 2-fach stärkere Expression des für das  $\alpha$ -Toxin codierenden Gens *hla* (Abb. 42A). *Hlg*, das für das  $\gamma$ -Toxin codierende Gen, ist ca. 2,5-fach stärker in  $\Delta pknB$  exprimiert. Damit konnte die Ergebnisse der Microarray-Analyse und des phänotypischen Hämolyxintests für  $\Delta pknB$  bestätigt werden.

Die RT-PCR-Analyse der Gene *hla* und *hlg* in  $\Delta yloO$  bestätigten ebenfalls die im Hämolyxintest beobachtete erniedrigte hämolytische Aktivität der  $\Delta yloO$ -Mutante. Auffällig war die ca. 25-fach erniedrigte Expression des  $\alpha$ -Toxin-Gens *hla* im Vergleich zum Wildtyp. Die Expression von *hlg* war ca. 5-fach erniedrigt in  $\Delta yloO$ .



**Abbildung 42:** Quantitative RT-PCR-Analyse zur Bestimmung der Expression der Gene *hla* und *hlg* in  $8325\Delta pknB$  und  $8325\Delta yloO$ . Angegeben ist A) die Ratio  $8325\Delta pknB/8325WT$  und B) die Ratio  $8325WT/8325\Delta yloO$ . Als Referenz/Kontrolle wurden 16S rRNA-Primer verwendet. Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl, 2001.

### 5.2.5 Microarray-basierte vergleichende Transkriptom-Analyse von *S. aureus* 8325 und der 8325 $\Delta$ *yloO*-Mutante

Für die Transkriptom-Analyse der 8325 $\Delta$ *yloO*-Mutante und ihres isogenen Wildtypstammes wurde die Gesamt-RNA beider Stämme isoliert. Dazu wurden die Bakterien wie beschrieben in LB-Medium bei 37 °C angezogen und bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 die Gesamt-RNA isoliert. Nachdem die RNA mittels EtOH gefällt worden war, wurde diese nach Genf an das „Genomic Research Laboratory“ des Genfer Universitätsklinikums (AG Schrenzel) geschickt. Hier erfolgten in Kooperation die Hybridisierung der Arrays und die statistische Auswertung. Der verwendete Microarray wurde durch *in situ*-Synthese von 60-Basen großen Oligonukleotidproben (Agilent, Palo Alto, CA) hergestellt. Damit umfasst er >98 % der ORFs der annotierten *S. aureus*-Stämme N315, Mu50, MW2, COL, NCTC8325, USA300, MRSA252 und MSSA476 (Pohl *et al.*, 2009). Es wurden vier biologisch unabhängige RNA-Isolate je Stamm für vier kompetitive Hybridisierungen verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe der „Feature Extraction Software“ (Version 8; Agilent) extrahiert. Zur Identifizierung statistisch signifikant verändert exprimierter Gene wurde ein ANOVA-Testverfahren verwendet. Es wurden Gene als in der 8325 $\Delta$ *yloO*-Mutante erhöht exprimiert detektiert, die eine x-fache Änderung (fold change) >1 aufwiesen und als vermindert exprimiert mit einer x-fachen Änderung (fold change) <0,5. Weiterhin wurden nur Gene als signifikant gewertet, die einen p-value <0,05 aufwiesen.

Somit konnten 80 Gene als in 8325 $\Delta$ *yloO* vermindert exprimiert identifiziert werden, während 23 Gene stärker exprimiert werden im Vergleich mit dem isogenen Wildtyp 8325.

Interessanterweise wurde in 8325 $\Delta$ *yloO* eine Gruppe von Genen vermindert exprimiert, die auch schon in der  $\Delta$ *pknB*-Mutante ein ähnliches Expressionsmuster zeigten. Es handelt sich dabei um Gene der Purinbiosynthese: *purS*, *purQ*, *purL*, *purF*, *purM*, *purN* und *purD*. Die Expression dieser in einem Operon vorliegenden Gene war in  $\Delta$ *yloO* 2,9- bis 5-fach vermindert. Demnach lässt sich vermuten, dass die Deletion der Proteinphosphatase *yloO* ebenso wie schon das Fehlen der Proteinkinase *pknB* einen Einfluss auf die Purinbiosynthese hat.

Weiterhin zeigten 11 Gene eine 2,3- bis 3,2-fach verminderte Expression in  $\Delta$ *yloO* die für Kapselpolysaccharid-Synthese Enzyme codieren: *capD*, *capE*, *capG*, *capH*,

*capI*, *capJ*, *capK*, *capL*, *capM*, *capN* sowie *capP*. Auch diese sind in einem Operon von SA0144-SA0159 organisiert. Vermindert exprimiert waren auch das für die Formatacetyltransferase codierende Gen *pflB* (6,7-fach) und das für die Pyruvatformatlyase aktivierende Enzym *pflA* (5,6-fach). Die Gene *lacD*, *lacC* und *lacA* des Galactose-Metabolismus waren in  $\Delta yloO$  um das 2,2- bis 2-fache vermindert exprimiert. Interessanterweise wiesen Gene die für Transkriptionsantiterminatoren bzw. Transkriptionsregulatoren codieren wie z.B. SACOL0228, SACOL1997 und SACOL2147 ebenfalls eine geringere Transkription in  $\Delta yloO$  auf (2,2-fach bis 4-fach). Weitere in der  $\Delta yloO$  vermindert exprimierte Gene codieren für Proteine des Kdp-Systems, einer Transport-ATPase mit hoher  $Ka^+$ -Affinität, die unter schwachem Turgordruck exprimiert wird. Dazu zählen: *kdpA*, *kdpB*, *kdpC*, *kdpD* und *kdpE*. Sie wiesen einen 3,4-fach bis 7,1-fach niedrigeren Transkriptionslevel in der Deletionsmutante auf. Einige für ABC-Transporter und Oligotransporter codierenden Gene waren ebenfalls 1,4-fach bis 4-fach vermindert exprimiert im Vergleich zum isogenen Wildtyp, wie z.B.: *oppB*, *oppC*, *opp-2D*, *opuCB*, *opuCC*, *opuCD*, SACOL1994, SAV1933, SAR1393 und SAR1394.

Neben diesen vermindert exprimierten Genen waren auch einige Gene in  $8325\Delta yloO$  verstärkt exprimiert. So wiesen die für ABC-Transporter codierenden Gene *sirA* und *sirC* eine ca. 2-fach stärkere Expression auf. Auch die für weitere Transportproteine codierenden Gene wie *glvC* und *htsA* zeigten eine 1,7- bzw. 2-fach höhere Transkription in der Deletionsmutante.

Interessanterweise konnte eine verstärkte Expression von Pathogenitätsfaktoren festgestellt werden, die an der Eisenaufnahme beteiligt sind. Dazu zählen das Eisen regulierende Häm-Eisen Bindeprotein *isdA* (3,1-fach), das Eisentransport assoziierte Protein *isdC* (2,3-fach) sowie die Häm-degradierende Monooxygenase *isdG* (2,6-fach).

Die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse sind in den Tabellen 21 und 22 zusammengefasst.

**Tabelle 21:** Mittels Microarray-Experimente identifizierte Gene, die in der *S. aureus* 8325 $\Delta$ yoO-Mutante weniger stark exprimiert wurden als im isogenen Wildtyp. Einteilung der ORFs nach KEGG. Aufgeführt sind alle Gene mit einer x-fachen Änderung  $\leq 0,5$  und p-value  $< 0,05$ .

ORF	Gen	Bschreibung	x-fache Änderung
<b>Zellwand und zelluläre Prozesse-Transport/Bindeproteine und Lipoproteine</b>			
SA0531	<i>proP</i>	Prolin-Transporter	0.48
SA0845	<i>oppB</i>	Oligopeptid ABC-Transporter, Permease OppB	0.47
SA0846	<i>oppC</i>	Oligopeptid ABC-Transporter, Permease OppC	0.50
	<i>opp-2D</i>	Peptid ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein Opp-2D	0.50
SA1880	<i>kdpB</i>	~K <sup>+</sup> -transportierende ATPase, Subunit B	0.14
	<i>murQ</i>	N-Acetylmuraminsäure-6-Phosphat-Etherase	0.19
SA1879	<i>kdpC</i>	~K <sup>+</sup> -transportierende ATPase, Subunit C	0.26
SA1881	<i>kdpA</i>	K <sup>+</sup> -transportierende ATPase, Subunit A	0.26
SA1960	<i>mtlF</i>	PTS, Mannitol-spezifische IIBC Komponente	0.24
SA1962	<i>mtlA</i>	PTS, Mannitol-spezifische IIA Komponente	0.44
SA2234	<i>opuCD</i>	Glycin-Betain/Carnitin/Cholin ABC-Transporter OpuCD	0.49
SA2235	<i>opuCC</i>	Glycin-Betain/Carnitin/Cholin ABC-Transporter OpuCC	0.47
SA2236	<i>opuCB</i>	Glycin-Betain/Carnitin/Cholin ABC-Transporter OpuCB	0.39
SA2337	<i>feoB</i>	Eisenionen-Transportprotein B	0.26
SACOL0217		~Nickel-ABC-Transporter, Nickel-Bindeprotein	0.35
SACOL1475		Blt-ähnliches Protein	0.44
SACOL1994		ABC-Transporter, ATP-Bindungsprotein	0.72
SACOL2458		Aminosäuretransporter	0.32
SACOL2676		LPXTG Zellwandoberflächenanker-Protein	0.48
SAV1933		~ABC-Transporter (ATP-Bindungsprotein)	0.25
SAR1393		Oligopeptid-Transporter, ATPase	0.50
SAR1394		Oligopeptid-Transport System-Permeaseprotein	0.35
	<i>abcA</i>	ABC-Transporter, ATP-Bindungsprotein	0.51
<b>RNA-Synthese</b>			
SA0882	<i>comK</i>	ComK Familie-Protein	0.24
SA1844	<i>agrA</i>	„accessory gene regulator A“	0.26
SA1883	<i>kdpE</i>	Response-Regulator KdpE	0.29
SA2108	<i>rpiR</i>	Phosphozucker-bindender Transkriptionsregulator, RpiR Familie	0.29
SACOL0228		~Transkriptionsantiterminator (BglG Familie) Homolog	0.45
SACOL1997		Transkriptionsregulator, GntR Familie	0.25
SACOL2147		Transkriptionsantiterminator, BglG Familie	0.37
SAS1984		Response-Regulator KdpE	0.29
<b>Aminosäuremetabolismus und Metabolismus verwandter Moleküle</b>			
SA1203	<i>trpF</i>	N-(5'Phosphoribosyl)-Anthranilat(PRA)-Isomerase	0.46
SA1229	<i>dapD</i>	2,3,4,5-Tetrahydropyridin-2,6-Dicarboxylat N-Succinyltransferase	0.46
SA1862	<i>leuA</i>	2-Isopropylmalatsynthase	0.33
SACOL0012		Homoserin-O-Acetyltransferase	0.49
SAR1338		Homoserindehydrogenase	0.47
<b>Carbohydratmetabolismus und Metabolismus verwandter Moleküle</b>			
SA0218	<i>pflB</i>	Formatacetyltransferase	0.15
SA0219	<i>pflA</i>	Pyruvatformat-Lyase-aktivierendes Enzym	0.18
SA0239	<i>gutB</i>	Sorbitoldehydrogenase	0.42
SA0562	<i>adh1</i>	Alkoholdehydrogenase	0.35
SA1994	<i>lacD</i>	Tagatose-1,6-Diphosphataldolase	0.46
SA1995	<i>lacC</i>	Tagatose-6-Phosphatkinase	0.49
SA1997	<i>lacA</i>	Galactose-6-Phosphatisomerase Subunit LacA	0.50

## Fortsetzung Tabelle 21

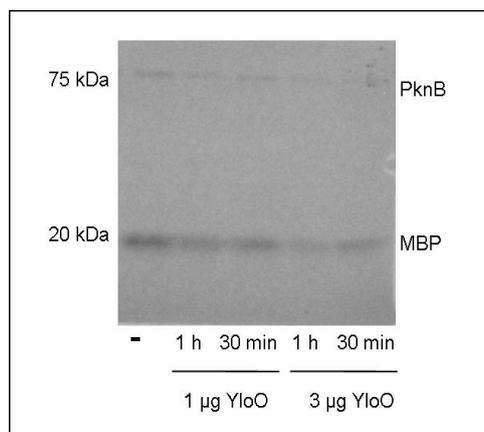
SA2008	<i>alsS</i>	Acetolactatsynthase	0.38
<b>Nukleotidmetabolismus und Metabolismus von Nukleotidsäuren</b>			
SA0919	<i>purS</i>	Phosphoribosylformylglycinamidinsynthase PurS	0.35
SA0920	<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamidinsynthase I	0.29
SA0921	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamidinsynthase II	0.22
SA0922	<i>purF</i>	Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase PurF	0.20
SA0923	<i>purM</i>	Phosphoribosylaminoimidazolsynthetase PurM	0.25
SA0924	<i>purN</i>	Phosphoribosylglycinamidformyltransferase PurN	0.20
SA0926	<i>purD</i>	Phosphoribosylaminylinligase PurD	0.26
<b>Pathogenitätsfaktoren (Toxine und Kolonisationsfaktoren)</b>			
SA0091	<i>plc</i>	1-Phosphatidylinositol-Phosphodiesterase	0.32
SA0309	<i>geh</i>	Lipase	0.07
SA0900	<i>sspB</i>	Cysteinprotease Vorläufer	0.39
SA0901	<i>sspA</i>	Serinprotease; V8 Protease; Glutamylendopeptidase	0.34
SA1627	<i>spIF</i>	Serinprotease SpIF	0.48
SA2003	<i>hysA</i>	Hyaluronatlyase Vorläufer	0.37
SA2208	<i>hlgC</i>	$\gamma$ -Hämolyisin Komponente C	0.45
SAS065	<i>hld</i>	$\delta$ -Hämolyisin	0.02
SACOL1187		Antibakterielles Protein ("phenol soluble modulín")	0.01
<b>Adaption an A-typische Konditionen</b>			
SA0147	<i>capD</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese Enzym CapD	0.35
SA0148	<i>capE</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese Enzym CapE	0.35
SA0150	<i>capG</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese Enzym CapG	0.36
SA0151	<i>capH</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese Enzym CapH	0.31
SA0152	<i>capI</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese Enzym CapI	0.33
SA0153	<i>capJ</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese Enzym CapJ	0.37
SA0154	<i>capK</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese Enzym CapK	0.32
SA0155	<i>capL</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese Enzym CapL	0.35
SA0156	<i>capM</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese Enzym CapM	0.32
SA0157	<i>capN</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese Enzym CapN	0.33
SA0159	<i>capP</i>	Kapselpolysaccharid-Synthese Enzym CapP	0.43
<b>Nitrogenmetabolismus</b>			
SA2183	<i>narJ</i>	Respiratorische Nitratreduktase $\delta$ Kette	0.30
SA2184	<i>narH</i>	Respiratorische Nitratreduktase $\beta$ Kette	0.21
<b>Signaltransduktion</b>			
SA1843	<i>agrC</i>	"accessory gene regulator C"	0.22
SA1882	<i>kdpD</i>	Sensorkinase	0.26
SACOL1231	<i>yloO</i>	PP2C Proteinphosphatase Stp	0.01
<b>Proteinmodifikation</b>			
SA1842	<i>agrB</i>	"accessory gene regulator B"	0.18
<b>Schwefelmetabolismus</b>			
SAV1442		~ Sulfitreduktase [NADPH] Flavoprotein	0.39
<b>Translation</b>			
SACOL1230		Radikales SAM-Enzym, Cfr Familie	0.01
<b>Unbekannte Funktion</b>			
SA0174		4'-Phosphopantetheinyltransferase Protein	0.43

**Tabelle 22:** Mittels Microarray-Experimente identifizierte Gene, die in der *S. aureus* 8325 $\Delta$ yl $\Delta$ o-Mutante stärker exprimiert wurden als im isogenen Wildtyp. Einteilung der ORFs nach KEGG. Aufgeführt sind alle Gene mit einer x-fachen Änderung  $\geq 2,0$  und p-value  $< 0,05$ .

ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung
<b>Zellwand und zelluläre Prozesse-Transport/Bindeproteine und Lipoproteine</b>			
SA0109	<i>sirC</i>	Eisen-Komponente ABC-Transporter, Permease	2,05
SA0111	<i>sirA</i>	Eisen-Komponente ABC-Transporter, Bindeprotein	2,18
SA2141	<i>glvC</i>	PTS, Arbutin-ähnliche IIBC Komponente	1,74
SAR2268		Transportsystem bindendes Lipoprotein	2,84
SACOL0799		Transferrinrezeptor	2,06
	<i>htsA</i>	ABC-Transporter, periplasmatisches Bindeprotein	3,64
<b>RNA-Synthese</b>			
SA0428	<i>gltC</i>	Transkriptionsaktivator des Glutamatsynthase Operon	2,47
SA1947	<i>czrA</i>	Transkriptionsregulator CzrA	2,01
SACOL2587		Transkriptionsregulator, TetR Familie	2,43
<b>Proteinfaltung</b>			
SA1837	<i>groES</i>	Co-Chaperonin GroES	2,08
<b>Aminosäuremetabolismus und Metabolismus verwandter Moleküle</b>			
SACOL0115		Galactosyltransferase	2,20
SACOL0303		5'-Nukleotidase, Lipoprotein e(P4) Familie	2,19
SACOL0821		~ HD-Superfamilie Hydrolase	2,29
SACOL1481		HP	2,18
SACOL2366		Acetyltransferase (GNAT) Familie Protein	2,41
SAS0641		Acetyltransferase (GNAT) Familie Protein	2,50
<b>Pathogenitätsfaktoren (Toxine und Kolonisationsfaktoren)</b>			
SA0977	<i>isdA</i>	Eisen-regulierendes Häm-Eisen Bindeprotein	3,11
SA0978	<i>isdC</i>	Eisentransport assoziiertes Protein	2,32
SA0983	<i>isdG</i>	Häm-degradierende Monooxygenase IsdG	2,62
SA2093	<i>ssaA</i>	"Secretory antigen precursor SsaA"	2,07
SA2431	<i>isaB</i>	Immunodominantes Antigen B	2,15
<b>Adaption an A-typische Konditionen</b>			
SACOL2385		Hitze-Schock Protein, Hsp20 Familie	2,06
SAR2475		Kleines Hitze-Schock Protein	2,07

### 5.2.6 YloO besitzt eine *in vitro*-Phosphataseaktivität

Die Ser/Thr-Proteinphosphatase YloO (Stp) kann die Ser/Thr-Proteinkinase PknB  $Mn^{2+}$ -abhängig dephosphorylieren (Débarbouillé *et al.*, 2009). Des Weiteren bewies Betramini *et al.* (2009) die Dephosphorylierung von phosphoryliertem MBP durch Stp. In der hier vorliegenden Arbeit sollte ebenfalls die Dephosphorylierungsaktivität von YloO (Stp) analysiert werden. Dazu wurde das konventionelle Kinasesubstrat MBP zuerst durch PknB phosphoryliert. Phosphoryliertes MBP wurde dann in einem Phosphatasepuffer mit Stp inkubiert und Aliquots nach 30 min und 1 h entnommen.



**Abbildung 43:** *In vitro* Phosphataseassay. PknB (PknB-His) und MBP wurden mit  $\gamma^{32}$ -ATP in einem HEPES-Kinasepuffer bei 37 °C für 20 min inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 bzw. 3 µg YloO (YloO-His). Die Dephosphorylierung erfolgte bei 37 °C für den angegebenen Zeitraum. Auftrennung mittels 12%igem SDS-PAGE und Visualisierung mittels Autoradiographie. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne YloO.

Die Autoradiographie verdeutlicht, dass YloO eine funktionelle Ser/Thr-Proteinphosphatase ist. YloO dephosphorylierte durch PknB zuvor phosphoryliertes MBP-P zeitabhängig. Nach 30 min Inkubation von MBP-P mit 1 µg YloO lag noch die Hälfte an MBP-P vor. Nach 1 h Inkubationszeit war die Phosphorylierungsstärke um das 4-fache gesunken. Noch deutlicher wurde der Effekt von YloO bei Zugabe von 3 µg YloO. Nach 1 h war nahezu die Gesamtmenge an MBP dephosphoryliert.

### 5.2.7 Zusammenfassung III:

- Die Untersuchung des intrazellulären Metaboloms der 8325 $\Delta$ yloO-Mutante lässt eine veränderte Nukleotidsynthese im Vergleich zum 8325WT erkennen.
- *In silico*-Untersuchungen identifizierten für YloO (Stp) die typische Domänenarchitektur bakterieller Ser/Thr-Proteinphosphatasen:
  - Stp lässt sich aufgrund der Homologie zu humanen PP2C-Phosphatasen der Genfamilie der PPM-Phosphatasen zuordnen.
- Stp ist eine funktionelle Ser/Thr-Proteinphosphatase:
  - Stp dephosphoryliert die autophosphorylierte STPK PknB Mn<sup>2+</sup>-abhängig *in vitro*.
- Die Microarray-Analyse des *S. aureus*-Stammes 8325 $\Delta$ yloO ergab:
  - eine erniedrigte Expression von Genen der *de novo*-Purinbiosynthese.
  - eine erniedrigte Expression von Genen der Kapselpolysaccharid-Synthese.
  - eine erniedrigte Expression von für ABC-Transporter und Oligotransporter codierenden Genen.
  - eine verstärkte Expression von Pathogenitätsfaktoren und Genen die für Proteine die bei der Eisenaufnahme eine Rolle spielen codieren.
- Es konnte kein verändertes Wachstumsverhalten der 8325 $\Delta$ yloO-Mutante in Vollmedium (LB-Medium) im Vergleich zum isogenen Wildtyp beobachtet werden.
- Die Untersuchung der Expressionskinetik zeigte eine stärkere Expression von yloO am Anfang (OD<sub>600</sub> von 0,5) und während der exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> von 1,0) als zum Ende der exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> von 3,0).
- Die 8325 $\Delta$ yloO-Mutante ist weniger hämolytisch auf Blutagarplatten als 8325WT. Mittels quantitativer RT-PCR-Analyse konnte eine verringerte Expression der Gene *hla* und *hlg* ermittelt werden.

## 6. Diskussion

Die Regulation zellulärer Prozesse durch Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten galt lange als ein Mechanismus, der ausschließlich bei Eukaryoten vorkommt. Die in den letzten Jahren immer umfangreicher werdende Genomsequenzanalyse zeigte jedoch, dass in nahezu jedem bakteriellen Genom Serin/Threonin- oder Tyrosin-Proteinkinasen und deren zugehörige Proteinphosphatasen vorhanden sind. Bereits 1981 postulierte Wang *et al.* die Existenz von Proteinkinasen und Phosphatasen im gramnegativen Pathogen *S. typhimurium* (Wang *et al.*, 1981). Der Beschreibung der ersten STPK in *Myxococcus xanthus* 1991 von Munoz-Dorado *et al.* folgte die Identifizierung vieler weiterer Bakterien mit putativen STPKs. Zum Beispiel sind bei *M. tuberculosis* 11 STPKs und drei STPPs beschrieben. Viele andere Bakterienarten, darunter auch viele pathogene Mikroorganismen wie Streptokokken, Yersinien und Staphylokokken besitzen nach heutigem Kenntnisstand nur eine funktionelle STPK und eine STPP.

### 6.1 PknB besitzt die typische Domänenstruktur bakterieller Ser/Thr-Proteinkinasen

Mit Hilfe der BLAST-Analyse konnte eine putative STPK und eine putative STPP im *S. aureus*-Stamm 8325 detektiert werden. Die STPK PknB wurde in dieser Arbeit aufgrund ihrer 37-%igen Homologie zur STPK PknB aus *M. tuberculosis* ebenfalls PknB genannt. Die Domänenstruktur von PknB (SA1063 bzw. SAOUHSC\_01187) entspricht der für STPKs typischen Struktur. Am N-Terminus befindet sich die putative zytoplasmatische katalytische Kinasedomäne, an die sich eine putative Transmembrandomäne anschließt. Die putativ extrazellulären Domänen bilden drei PASTA-Domänen (Penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated domain). Die katalytische Domäne gehört mit einer hohen statistischen Wahrscheinlichkeit (*E* value 7,12e-70) zur Familie der Ser/Thr-Proteinkinasen (STPK) und besitzt alle konservierten Reste, die typisch sind für diese Familie. Am N-terminalen Endpunkt der katalytischen Domäne befindet sich die typische Ansammlung mehrerer Glycinreste neben einem Lysinrest, für den gezeigt werden konnte, dass er eine Rolle in der ATP-Bindung der Kinase einnimmt. Außerdem befindet sich im Zentrum der katalytischen Domäne der für die katalytische Aktivität entscheidende

konservierte Aspartatrest (Hanks & Hunter, 1995; SMART-Analyse). Mit Hilfe der SMART-Datenbank (<http://smart.embl-heidelberg.de>) konnte eine putative Transmembrandomäne (basierend auf der Aminosäuresequenz 350-372) ermittelt werden. Diese Transmembrandomäne lässt eine Lokalisation von PknB in der zytoplasmatischen Membran des Bakteriums vermuten. Für die erste PASTA-Domäne (373-440) konnte ein *E* value von  $6,37e-16$ , für die zweite (441-509) ein *E* value von  $2,38e-15$  und für die dritte (510-575) ein *E* value von  $1,73e-17$  ermittelt werden. Damit gehören diese putativ extrazellulären Domänen mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Familie der PASTA-Domänen, die man sowohl in STPKs als auch in den Penicillin-Bindeproteinen findet. Die PASTA-Domänen können als Rezeptor- oder Sensordomäne extrazelluläre Signale wahrnehmen und somit die katalytische Aktivität der Kinase steuern (Bakal & Davis, 2000). Der Domänenaufbau legt nahe, dass PknB in der bakteriellen Zytoplasmamembran lokalisiert ist und die Sensordomänen (PASTA-Domänen) nach außen gerichtet sind, während die Kinasedomäne auf der zytoplasmatischen Seite aktiv ist. Interessanterweise konnte kürzlich mittels Western Blot-Analyse von zellulären Subfraktionen PknB tatsächlich in der Zytoplasmamembranfraktion von *S. aureus* 8325-4 nachgewiesen werden (Débarbouillé *et al.*, 2009).

## 6.2 Biochemische Charakterisierung von PknB

Um die biologische Funktion und biochemischen Eigenschaften von PknB in *S. aureus* näher zu untersuchen, wurde die Kinase in *E. coli* überexprimiert und die rekombinanten Proteine durch *in vitro*-Kinasereaktionen untersucht. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PknB eine funktionelle Ser/Thr-Proteinkinase ist, die das konventionelle Kinasesubstrat MBP *in vitro* in Anwesenheit von ATP phosphoryliert. Diese Phosphorylierungsaktivität ist zeitabhängig und benötigt Mangan- oder Magnesiumionen. Wie auch bereits für verschiedene andere bakterielle STPKs gezeigt werden konnte, z.B. PknB von *M. tuberculosis* und Stk von *S. agalactiae* (Boitel *et al.*, 2003; Rajagopal *et al.*, 2003), scheint diese Abhängigkeit eine Spezies übergreifende Eigenschaft der bakteriellen STPKs zu sein. Die hier untersuchte STPK PknB von *S. aureus* zeigte eine vorwiegend  $Mn^{2+}$ -abhängige Phosphorylierungsaktivität. Inwiefern diese auch *in vivo* eine Rolle spielt muss noch genauer untersucht werden. In *S. aureus* sind zwei Mangan-Transportsysteme

beschrieben: der Nramp  $H^+$ - $Mn^{2+}$ -Transporter (MntH) und die ABC-Mangan-Permease (MntABCD) (Papp-Wallace *et al.*, 2006; Horsburgh *et al.*, 2002). Des Weiteren ist bekannt, dass das hohe Reduktionspotential von  $Mn^{2+}$  den Bakterien erlaubt, hohe intrazelluläre Mangan-Konzentrationen zu tolerieren. Dies ist aber nur in einer oxidativen Umgebung denkbar. Mangan stellt damit einen idealen Kofaktor bestimmter oxidativer Stressenzyme dar, wie Katalase und Superoxiddismutase (Somerville & Procotor, 2009; Papp-Wallace *et al.*, 2006). Es kann vermutet werden, dass durch die  $Mn^{2+}$ -abhängige Aktivität der STPKs ein Mangel an  $Mn^{2+}$ , hervorgerufen durch eine Mutation der verantwortlichen Transportsysteme, sich auch auf die Phosphorylierung vieler Proteine auswirkt und damit ein Einfluss auf die Virulenz der Bakterien ausgeübt werden kann. Interessanterweise zeigt in *S. aureus* eine *mntH-mntA*-Doppelmutante eine verringerte Virulenz in einem murinen Abzessmodell (Horsburgh *et al.*, 2002). Es ist jedoch auch weiter bekannt, dass zu hohe Konzentrationen an  $Mn^{2+}$  für Zellen schädlich sein können, weshalb man auch eine *in vivo*-Aktivität von PknB mit  $Mg^{2+}$  als Kofaktor vermuten könnte. Bakterien können jedoch  $Mn^{2+}$  in hohen Konzentrationen anreichern. Bei extrazellulären  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen im Mikromolaren Bereich können intrazellulär mehrere hundert Mikromolar  $Mn^{2+}$  erreicht werden. Unter diesen Bedingungen tritt vermehrt MnATP auf, da dieses eine deutlich höhere ATP-Affinität aufweist als  $Mg^{2+}$  (Papp-Wallace *et al.*, 2006). Man kann deshalb von einer tatsächlichen *in vivo*-Aktivität von PknB mit  $Mn^{2+}$  als Kofaktor ausgehen.

Die katalytische Domäne allein ist für die Kinaseaktivität von PknB ausreichend. Diese auf den Aminosäuren 1-274 basierende Domäne (PknB<sub>1-274</sub>) ist bereits fähig MBP *in vitro* zu phosphorylieren und zeigt die gleiche zeit- und  $Mn^{2+}$ -abhängige Aktivität wie das Gesamtprotein. Weiterhin ist auch die katalytische Domäne PknB<sub>1-274</sub> fähig neben der *trans*-Phosphorylierung von MBP auch eine *cis*-Phosphorylierung (Autophosphorylierung) durchzuführen. Dies lässt vermuten, dass andere Proteinregionen wie die Juxtamembranregion nicht für die Stabilisierung der aktiven Konformation und damit der Aktivität von PknB notwendig sind. PknB von *S. aureus* weist somit die bereits für PknB von *M. tuberculosis* beschriebenen Eigenschaften einer bakteriellen STPK auf (Boitel *et al.*, 2003).

Die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von STPKs wie PknB erfolgt typischerweise durch die *cis*-Phosphorylierung. Dabei werden Serin- und Threoninreste im aktiven Zentrum der Kinase phosphoryliert. Die MS-Analyse der katalytischen Domäne ermöglichte die Identifizierung von fünf autophosphorylierten Resten innerhalb des aktiven Zentrums: S159, T161, T164, T166; T172. Die STPKs von *M. tuberculosis* (PknB, PknD, PknE, PknF) zeigen ebenfalls Phosphorylierungsstellen an zwei Threoninresten ihres aktiven Zentrums (Duran *et al.*, 2005). Mittels Homologievergleich lässt sich eine für bakterielle STPKs universelle Konsensussequenz ermitteln (Abb. 44). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Substitution der konservierten Reste T164 und T166 von PknB durch Alanin die Phosphorylierungsaktivität der Kinase deutlich verringert. Das substituierte Protein PknB<sub>T-A</sub> ist nicht mehr fähig MBP zu phosphorylieren. Die Reste T164 und T166 sind damit die für die Autophosphorylierung und damit Aktivierung der Kinase elementaren Aminosäurereste.

Insgesamt lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Aktivität von PknB in *S. aureus* durch den Status der Autophosphorylierung der beschriebenen Threoninreste ihres aktiven Zentrums reguliert werden kann. Der Einfluss dieser Phosphorylierungsstellen auf die Phosphorylierungsaktivität von PknB von *M. tuberculosis* verdeutlicht Boitel *et al.* (2003) anhand der gut charakterisierten STPK PknB. Hier konnte ebenfalls bewiesen werden, dass die Doppelphosphorylierung der konservierten Threoninreste (T171 und T173) für die vollständige Phosphorylierungsaktivität von PknB entscheidend ist. Diese autophosphorylierten Reste sind in allen beschriebenen prokaryotischen wie auch eukaryotischen STPKs konserviert und stellen damit einen gemeinsamen Mechanismus der Regulation der STPKs dar. Weitere Untersuchungen wie die Aufklärung der Struktur von PknB mittels Kristallstrukturanalyse könnten die für die Regulation der Aktivität wichtigen Strukturelemente weiter aufklären helfen.

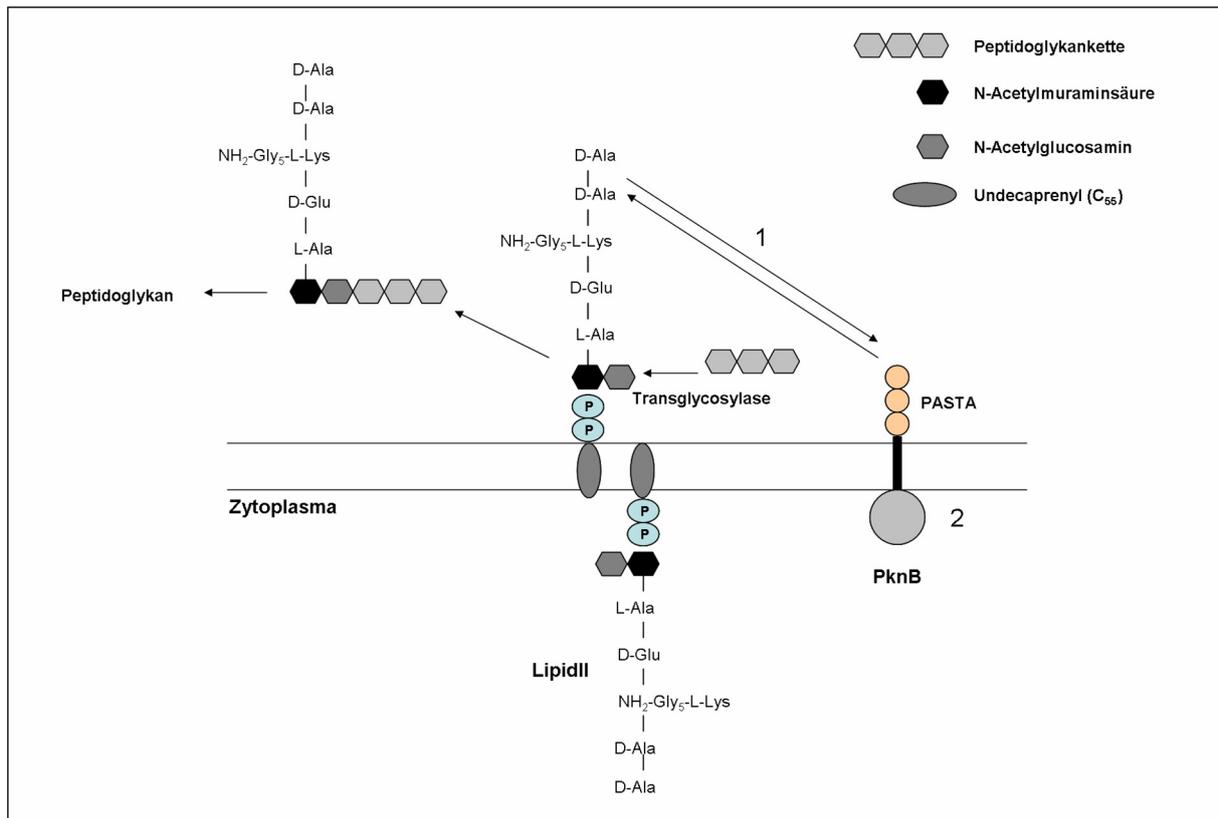
aktives Zentrum	
PknB <i>M. tuberculosis</i>	151 KVMD <b>DFG</b> IARA IADSGNSV <b>TQT</b> AAVIGTAQYLS <b>SPE</b>
Konsensus	K+ <b>DFG</b> IA+A++++ S+ <b>TQT</b> V+GT QY <b>SPE</b>
PknB <i>S. aureus</i>	148 KIF <b>DFG</b> IAKAL <b>SET</b> --SL <b>TQT</b> NHVLG <b>TVQYFSPE</b>

**Abbildung 44:** Homologievergleich von PknB von *M. tuberculosis* und PknB von *S. aureus*. In rot sind die begrenzenden Aminosäuren des aktiven Zentrums der STPKs dargestellt (**DFG** und **SPE**). Weiterhin ist die Konsensussequenz aufgeführt sowie blau die konservierten autophosphorylierten Aminosäurereste.

### 6.3 PknB beeinflusst die Zellwandsynthese von *S. aureus*

Die Signale, die zur Autophosphorylierung an den Threoninresten T164 und T166 im aktiven Zentrum von PknB führen, sind bislang noch unbekannt. Eine Schlüsselrolle könnten jedoch die PASTA-Domänen einnehmen. Bekannt ist, dass PASTA-Domänen an den  $\beta$ -Lactamring von  $\beta$ -Lactamantibiotika binden (Yeats *et al.*, 2002). Die PASTA-Domäne des PBP2X aus *Streptococcus pneumoniae* interagiert mit dem  $\beta$ -Lactamring von Cefuroxim über van der Waal's-Kräfte wie Gordon *et al.* (2000) zeigen konnte. Möglich wäre auch eine Bindung der PASTA-Domänen an  $\beta$ -Lactamring analoge Bestandteile in der Zellwand, wie z. B. die D-Alanyl-D-Alanin-Reste, die die terminalen Aminosäurereste der Muropeptidvorläufermoleküle sind. Somit könnten noch unverknüpfte Peptidoglykanbausteine erkannt werden. STPKs mit PASTA-Domänen könnten bei einer erhöhten Konzentration an unverknüpften Muropeptidmonomeren der Zelle signalisieren, weitere PBPs zur Zellwandsynthese zu synthetisieren. Eine andere Möglichkeit wäre die Lenkung des Biosynthesekomplexes an die Stelle der noch unverknüpften Muropeptidmonomere (Yeats *et al.*, 2002).

Erst kürzlich konnte Shah *et al.* (2008) die Rolle der PASTA-Domänen bei der Aktivierung von Sporen in *B. subtilis* aufklären. *B. subtilis* ist in der Lage sich an ungünstige Umweltbedingungen anzupassen, indem das Bakterium seinen Stoffwechsel drastisch reduziert oder durch Sporenbildung sogar völlig aussetzt. Das Bakterium muss jedoch weiterhin fähig sein, eine Verbesserung dieser ungünstigen Umweltbedingungen festzustellen ohne seinen Ruhezustand zu früh aufzugeben. *B. subtilis* erreicht das durch die Wahrnehmung von Wachstum anderer Bakterien in seiner Umgebung. Diese wachsenden Bakterien geben Muropeptidfragmente der Zellwand in ihre lokale Umgebung ab. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese freigesetzten Muropeptidfragmente von den extrazellulären PASTA-Domänen der STPK PrkC von *B. subtilis* gebunden werden können und damit die Stimulation der Germination über einen intrazellulären Signalweg bewirken. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass PASTA-Domänen der bakteriellen STPKs tatsächlich Peptidoglykanmonomere als externes Signal erkennen und binden.



**Abbildung 45:** Schematische Darstellung der Formation von Lipid II während der Zellwandbiosynthese von *S. aureus*. Die in der Zytoplasmamembran lokalisierte STPK PknB könnte mittels der extrazellulären PASTA-Domänen den freien D-Alanyl-D-Alanin-Rest des Lipid II erkennen (1) und dadurch aktiviert werden (2).

Es kann spekuliert werden, dass die PASTA-Domänen von PknB in *S. aureus* ebenfalls mit Peptidoglykanmonomeren interagieren. Freie Peptidoglykanmonomere liegen bei der Zellwandbiosynthese vor. Hier könnte PknB das Lipid II, das einen freien terminalen D-Alanyl-D-Alanin-Rest aufweist, binden (Abb. 45), und die Zellwandbiosynthese beeinflussen. Um die Interaktion der PASTA-Domänen mit Muropeptidvorläufern wie dem Lipid II für *S. aureus* aufzuklären, wäre es denkbar, PknB in Lipid II dotierten Liposomen zu rekonstituieren, um unter Membranbedingungen eine Bindung zu ermöglichen. Auch wäre eine Aktivierung der Kinase über die Bindung eines potentiellen Liganden an die PASTA-Domänen denkbar. Diese Aktivierung könnte man mit Hilfe einer verstärkten Phosphorylierungsaktivität von PknB in einem *in vitro*-Kinaseassay nachweisen. Um die tatsächliche Lokalisation der extrazellulären PASTA-Domänen und damit von PknB nachzuweisen, wäre eine Fluoreszenzmikroskopie mit geeigneten Antikörpern denkbar.

Hinweise auf eine Rolle von PknB bei der Biosynthese der Zellwand liefert auch die Transkriptom-Analyse von  $\Delta pknB$ . Die Deletion des *pknB*-Gens im *S. aureus*-Stamm 8325 führte zu einer veränderten Expression von Genen, die indirekt die Zellwandsynthese beeinflussen. Zum Beispiel waren die Gene, die für das Zweikomponenten-System *VraSR* codieren in der Deletionsmutante verstärkt exprimiert. Dieses Zweikomponenten-System codiert für einen positiven Regulator von Genen die an der Peptidoglykansynthese beteiligt sind. Vermutlich koordiniert *VraSR* die Mureinvorläufersynthese über die *murZ*-Expression und die Polymerisierung des Peptidoglykans durch Kontrolle der Gene für das Penicillin-Bindeprotein PBP2 und die monofunktionelle Glycosyltransferase *SgtB* (Kuroda *et al.*, 2003). Kuroda *et al.* (2003) konnte eine Induktion der *vraSR*-Expression durch verschiedene, die Zellwandsynthese hemmende Antibiotika, wie Vancomycin, Teicoplanin und  $\beta$ -Lactamantibiotika, beobachten. Außerdem zeigte die Untersuchung von *vraSR*-Deletionsmutanten eine signifikante Erhöhung der Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber einer Reihe von Zellwandsynthese-Inhibitoren (u. a. gegenüber Vancomycin, Teicoplanin, Oxacillin, Bacitracin und D-Cycloserin). Die von Kuroda *et al.* (2003) beschriebenen Microarray-Analysen der *vraSR*-Mutanten ergaben eine verringerte Transkription von *murZ* und *pbp2* in diesen Mutanten. Diese erniedrigte Expression stimmte mit der beobachteten gleichzeitigen erhöhten Empfindlichkeit der *vraSR*-Mutanten gegenüber verschiedenen Zellwandsynthese-Inhibitoren überein. Die Histidin-Kinase *VraS* scheint somit als Sensor für eine anders strukturierte Zellwand zu fungieren oder kann die Hemmung der Zellwandbiosynthese wahrnehmen (Kuroda *et al.*, 2003). Die Induktion von *VraSR* könnte in der  $\Delta pknB$ -Mutante als Reaktion auf eine veränderte Zellwandstruktur erfolgen. Möglicherweise kann PknB die extrazelluläre Konzentration der Muropeptidvorläufer über die PASTA-Domänen messen, indem es dann mit den D-Alanyl-D-Alanin-Resten interagiert. Es ist denkbar, dass PknB bei einer erhöhten Konzentration von unverknüpften Muropeptidfragmenten die Zellwandbiosynthese-Maschinerie aktiviert. Fehlt jedoch PknB, dann könnte die Zelle diese Erhöhung nur noch eingeschränkt wahrnehmen, was eine Ausdünnung der Zellwand zur Folge hätte, da die Muropeptidmonomere nicht mehr effektiv in die Zellwand eingebaut werden. Es liegt nahe, dass als Antwort auf diesen „Zellwand-Stress“ die Expression von *vraSR* in der Deletionsmutante verstärkt wird. Tatsächlich zeigten die Transelektronenmikroskopieaufnahmen der  $\Delta pknB$ -Deletionsmutante im Vergleich mit dem isogenen Wildtypstamm 8325 eine

veränderte Zellwand. Die Zellwand- und Membranregionen der Mutante erscheinen insgesamt eher elektronenschwach und welliger als im Wildtyp. Auch kann man Unterbrechungen erkennen. Dies könnte mit einer ausgedünnten Zellwand als Folge des Fehlens von PknB zusammenhängen. Deutlicher wurde die Rolle von PknB und der korrespondierenden Phosphatase Stp bei Untersuchungen einer Doppelmutante im *S. aureus*-Stamm N315. Beltramini *et al.* (2009) beschreibt Zellteilungsdefekte und eine unvollständige Septumbildung sowie Ausbuchtungen und eine unregelmäßige Zellgröße der Doppelmutante  $\Delta stp/pknB$ . Damit scheint das Paar PknB und Stp einen Einfluss auf die Zellwandsynthese von *S. aureus* auszuüben.

Interessanterweise waren 10 von 13 Genen des VraSR-Regulons (*proP*, *pbp2*, SA2220, *sgtB*, *murZ*, *prsA*, SA1476, SA1702, SA1703 und SA2221), das von Kuroda *et al.* (2003) unter nicht induzierten Bedingungen beschrieben wurde, verstärkt exprimiert in der  $\Delta pknB$ -Mutante im Stamm 8325. Vor allem die verstärkte Expression von *pbp2*, *sgtB*, und *murZ* lassen eine Rolle von PknB bei der Zellwandsynthese vermuten. Utaida *et al.* (2003) spekuliert, dass die Zelle generell auf eine Inhibition der Zellwandsynthese mit einer veränderten Expression von Genen reagiert, die ein Zellwand-Stimulon bilden. Zu diesen Genen zählen u. a. *vraS*, *pbpB*, *murZ* und *fmtA*. Die ebenfalls veränderte Expression dieser Gene in  $\Delta pknB$  könnte zur beobachteten Zellwandschädigung in der Mutante beitragen. In *M. tuberculosis* reguliert PknB die Zellwandsynthese durch die Modulation der Acetyltransferase-Aktivität von GlmU (N-Acetylglucosamin-1-Phosphaturidyl-transferase) (Parikh *et al.*, 2009). Stk von *S. pneumoniae* phosphoryliert die Phosphoglucosaminmutase GlmM, die die Bildung von UDP-N-Acetylglucosamin katalysiert. Stk reguliert damit durch die Kontrolle der Aktivität von GlmM direkt die Zellwandbiosynthese in *S. pneumoniae* (Nováková *et al.*, 2005). Eine *stk*-Mutante zeigt u. a. eine vorzeitige Lyse, was auf eine veränderte Zellwandstruktur und Zusammensetzung hindeutet (Nováková *et al.*, 2005). Ob der Einfluss von PknB auf die Zellwandbiosynthese von *S. aureus* direkt oder indirekt erfolgt muss noch aufgeklärt werden. Dabei könnte die Identifizierung weiterer Substrate von PknB, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind, wie z. B. GlmM und GlmU, helfen.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit eine erhöhte Transkription der Gene *IrgA* und *IrgB* des VraSR-Regulons in  $8325\Delta pknB$  ermittelt werden. Rice und Bayles (2003)

vermuten, dass beide Proteine als Antiholone agieren, die die Aktivität der Holine CidA und CidB kontrollieren. Dadurch wird die Peptidoglykanhydrolase-Aktivität verstärkt und die  $\beta$ -Lactamresistenz verringert. Diese Verminderung der  $\beta$ -Lactamresistenz konnte mittels MHK-Bestimmung von  $8325\Delta pknB$  gegenüber bestimmten  $\beta$ -Lactamen in dieser Arbeit bestätigt werden. Weiter kann die erhöhte Transkription von *IrgA* und *IrgB* mit einer gleichzeitigen erniedrigten Transkription des Autolysingens *atl* als Antwort auf eine Schädigung der Zellwand interpretiert werden, die dazu dient Peptidoglykan zu bewahren (Wilkinson *et al.*, 2005). Mittels TritonX-100 induzierter Lyse konnte tatsächlich eine verminderte autolytische Aktivität von  $8325\Delta pknB$  ermittelt werden. Diese geht einher mit einer verringerten Expression von *atl*. Da gleichzeitig die Regulatoren der Autolyse *lytR* und *fnt* in der Deletionsmutante verstärkt exprimiert werden, kann man eine erniedrigte Synthese Zellwandabbauender Enzyme vermuten. Dies könnte zur beobachteten phänotypischen erniedrigten Autolyse der Mutantenzellen führen. Es ist denkbar, dass das Fehlen von PknB direkt oder indirekt zu einer veränderten Zellwandsynthese führt und damit eventuell die Zellwand in ihrem strukturellen Aufbau geschädigt ist. Durch eine verstärkte Expression der Regulatoren der Autolyse und einer erniedrigten Expression des *atl*, könnte die Zelle versuchen einer weiteren Schädigung der Zellwand entgegen zu wirken.

Dass PknB zusammen mit der Phosphatase Stp eine Rolle bei der Zellwandsynthese spielen könnte, lassen auch die Ergebnisse der MHK-Untersuchungen verschiedener Zellwand-aktiver Antibiotika vermuten. Es wurden die MHKs der Antibiotika Tunicamycin, Methicillin, Fosfomycin, D-Cycloserin, Vancomycin, Cefepim und Ceftriaxon für  $8325\Delta pknB$  und dessen isogenen  $8325WT$  sowie für  $COL\Delta pknB$  und  $COLWT$  bestimmt. Wie bereits in meiner Diplomarbeit (Donat, 2005) beobachtet, wies die  $\Delta pknB$ -Mutante eine deutlich niedrigere Resistenz gegenüber den  $\beta$ -Lactamantibiotika Methicillin und Cefepim auf. Diese blockieren die späte Phase der Zellwandsynthese. Die  $\Delta pknB$ -Mutante im Stamm COL zeigte eine 16-fach erniedrigte MHK im Vergleich zum Methicillin-resistenten Wildtyp mit einer MHK von 256  $\mu\text{g/ml}$ . Die  $\Delta pknB$ -Mutante im Stamm 8325 wies für beide Antibiotika eine 2-fach erhöhte Empfindlichkeit auf. Gegenüber Tunicamycin zeigte die Deletionsmutante ebenfalls eine deutlich höhere Empfindlichkeit. Während die MHK in der  $\Delta pknB$ -Mutante im Stamm 8325 eine MHK von 1  $\mu\text{g/ml}$  beträgt, liegt diese beim Wildtyp bei

64 µg/ml. Im Stamm COL zeigen der Wildtyp eine MHK von 128 µg/ml und die  $\Delta pknB$ -Mutante eine 4-fach niedrigere. Tunicamycin inhibiert die MraY-Transferase, die die Formation der ersten Lipidzwischenprodukte der Peptidoglykanbiosynthese katalysiert. Interessanterweise konnte mittels Metabolom-Analyse eine veränderte Konzentration einer Komponente des Folsäuremetabolismus in der  $pknB$ -Mutante gemessen werden. Es besteht jedoch kein Unterschied in der MHK für die Antibiotika Trimethoprim und Sulfadiazin, Hemmstoffe der Folsäure-Synthese. Die Bedeutung des Ergebnisses der Metabolomuntersuchungen ist völlig unklar.

Der Effekt der  $pknB$ -Deletion auf die Empfindlichkeit gegenüber Methicillin konnte am deutlichsten im *S. aureus*-Stamm COL beobachtet werden. Zwar zeigt bereits die 8325 $\Delta pknB$ -Mutante eine 2-fach höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum Methicillin, das Fehlen von PknB im Stamm COL führte jedoch zu einer 16-fach erhöhten Empfindlichkeit. Für die Resistenz gegen Methicillin ist vor allem das *mecA*-Gen verantwortlich, das für ein zusätzliches Penicillin-Bindeprotein (PBP2' oder PBP2a) codiert. Dieses PBP zeigt allein nur eine geringe Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika. Die Expression von *mecA* führt zusammen mit weiteren bakteriellen Faktoren (u. a. *aux*-Faktoren, *fem*, *fmt*, *llm* und *sigB*) zu einer hohen Resistenz. Yeats *et al.* (2002) spekuliert, dass PknB in *M. tuberculosis* über die PASTA-Domänen die Konzentration an unverknüpften Peptidoglykanvorläufern der Zelle signalisieren könnte. Daraufhin könnte eine direkte oder indirekte Aktivierung der Zellwandbiosyntheseproteine, einschließlich der PBPs, stattfinden (Yeats *et al.*, 2002). Man könnte vermuten, dass in *S. aureus* PknB hilft, die Anwesenheit des Antibiotikums zu signalisieren und so direkt oder indirekt zu einer Erhöhung der Expression von PBP2', weiteren PBPs oder anderen Faktoren führt. Es wäre denkbar, dass beim Fehlen der Kinase dieser Signalweg ausbleibt und die Zelle sich somit nicht an die Methicillin-Konzentration anpassen könnte, indem sie eventuell die Expression von PBP2' oder z.B. der *fem*-Gene erhöht. Die Transkriptom-Analyse von  $\Delta pknB$  im Stamm COL hat jedoch keine veränderte Expression der *mec*-Gene oder der *aux*-Faktoren gezeigt (Donat, 2005). Dies lässt vermuten, dass die beobachtete Verringerung der Resistenz von der Expression dieser erwähnten Gene und Faktoren unabhängig ist. Um den Einfluss von PknB auf die Antibiotika-Resistenz weiter zu untersuchen, könnte man das Transkriptom von  $\Delta pknB$  unter dem Einfluss von verschiedenen Antibiotika wie z.B. Methicillin erstellen. Dazu wäre es sinnvoll,

*pknB* in verschiedenen MRSA-Stämmen zu deletieren, um die Änderungen der Transkriptome in den unterschiedlichen antibiotikaresistenten Stämmen verfolgen zu können.

#### 6.4 PknB phosphoryliert Enzyme der zentralen Stoffwechselwege

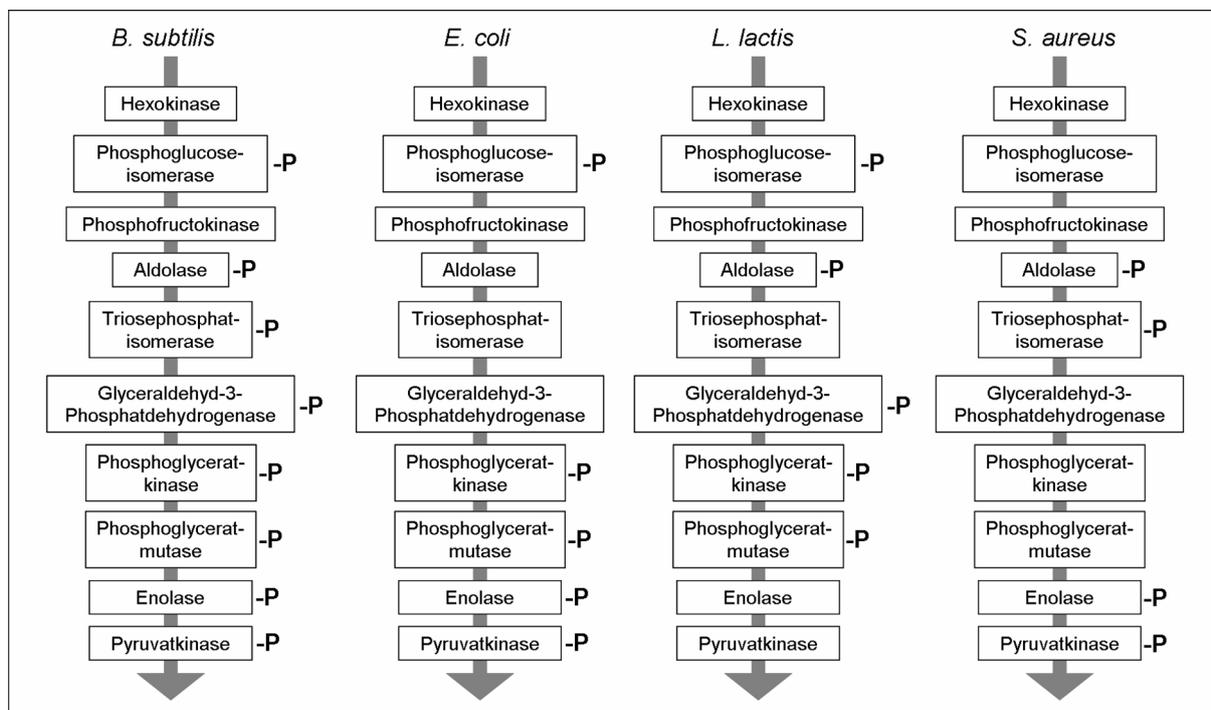
Eines der Hauptziele dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Phosphoproteom-Analysen die Ser/Thr-Proteinkinase PknB in *S. aureus* näher zu charakterisieren. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit der Universität Greifswald (AG Engelmann) eine neue 2DGE-Analyse angewendet. Die *S. aureus*-Stämme 8325, COL und SH1000 und ihre jeweilige  $\Delta pknB$ -Mutante wurden mittels 2DGE aufgetrennt und durch ein Doppelfärbungsverfahren, ProQ-Färbung und SYPRO-Färbung, die phosphorylierten Proteine in den Stämmen identifiziert. ProQ färbt spezifisch phosphorylierte Proteine, wodurch Phosphatgruppen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten detektiert werden können. SYPRO färbt dagegen alle akkumulierten Proteine. Von besonderem Interesse waren dabei die Proteine, die eine verminderte Ratio Mutante/Wildtyp auf ProQ-Ebene zeigten. Daraus konnte auf eine verminderte Phosphorylierung dieser Proteine in der  $\Delta pknB$ -Mutante geschlossen werden.

Im *S. aureus*-Stamm 8325 wurden 19 vermutlich vermindert phosphorylierte Proteine detektiert. Zu diesen zählen Enzyme zentraler Stoffwechselwege wie der Glykolyse sowie Chaperone und Enzyme, die an der Transkription und Translation beteiligt sind. Zum Beispiel zeigten die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase und die Enolase eine verminderte Phosphorylierung. Lomas-Lopez *et al.* (2007) identifizierte ebenfalls diese Enzyme der Glykolyse als *in vivo*-Substrate von PknB von *S. aureus* N315. Auch in anderen Prokaryoten wurden bereits Homologe dieser Enzyme als Substrate von bakteriellen STPKs beschrieben, z.B. die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase in *Streptococcus pneumoniae* (Nováková *et al.*, 2005) und *Corynebacterium glutamicum* (Bendt *et al.*, 2003) und die Enolase in *B. subtilis* (Lévine *et al.*, 2006) und *C. glutamicum*. Auch die Phosphorylierung von Chaperonproteinen durch STPKs ist ein bekanntes Phänomen. So wurden die Chaperone GroEL und DnaK bereits als Phosphoproteine beschrieben (McCarty & Walker, 1994). Die Phosphorylierung des Elongationsfaktors Tu (EF-Tu) findet man neben dem gramnegativen Bakterium *E. coli* (Macek *et al.*, 2008) auch in *B. subtilis* (Levinè *et al.*, 2006; Eymann *et al.*,

2007; Absalon *et al.*, 2009). Allgemein findet die Phosphorylierung von EF-Tu nach der Bindung an die A-Seite des Ribosoms statt und ermöglicht die Freisetzung von EF-Tu vom Ribosom. Sie erfolgt zyklisch, was eine Optimierung der Translationsrate bewirkt. Absalon *et al.* (2009) konnte zeigen, dass die STPK PrkC von *B. subtilis* EF-Tu an dem Threoninrest T384 phosphoryliert und die STPP PrpC die Dephosphorylierung bewirkt. Interessanterweise scheint EF-Tu nicht nur eine Rolle bei der Translation in *B. subtilis* zu spielen. Graumann *et al.* (2009, Präsentation VAAM-Jahrestagung, Bochum) beschreibt den Elongationsfaktor Tu als Teil des bakteriellen Zytoskeletts und beobachtete einen deutlichen Effekt der Erniedrigung des EF-Tu-Levels auf die Zellform und Lokalisation von MreB, einem Aktin-ähnlichen bakteriellen Zytoskelettelement. Damit scheint EF-Tu eine duale Rolle in der Proteinbiosynthese und bei der Aufrechterhaltung der Zellform einzunehmen. Da auch PknB von *S. aureus* EF-Tu *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert (2DGE und *in vitro*-Kinaseassay), wäre die Untersuchung einer ähnlichen dualen Rolle der Regulation der Translation und Zellform in *S. aureus* mittels Phosphorylierung von EF-Tu durch PknB lohnenswert. Denkbar wäre der Nachweis einer Kolo-kalisation von PknB und EF-Tu während der verschiedenen Wachstumsphasen von *S. aureus* mittels Immunofluoreszenzmikroskopie. Interessanterweise zeigte die Immunofluoreszenzmikroskopie mit anti-PknB<sub>1-274</sub> bereits eine mögliche punktuelle Lokalisation von PknB an den Polen der Zelle.

Kürzlich wurden die Phosphoproteome von *B. subtilis*, *L. lactis*, *E. coli* und die Phosphoproteom-Analyse pathogener und nicht-pathogener *Pseudomonas*-Spezies beschrieben (Ravichandran *et al.*, 2009; Macek *et al.*, 2008; Soufi *et al.*, 2008; Macek *et al.*, 2007; Bendt *et al.*, 2003). Der Vergleich der Phosphorylierungsstellen in diesen untersuchten Spezies ergab, dass die Mehrheit der Proteine Spezies-spezifisch phosphoryliert werden und nur wenige Phosphorylierungsstellen in den untersuchten Bakterien *B. subtilis*, *L. lactis* und *E. coli* übereinstimmen (Macek *et al.*, 2007). Man vermutet deshalb, dass die Phosphorylierung durch eukaryotisch-ähnliche STPKs sich koevolutionär entwickelt hat, das heißt als Adaption der Bakterien an ihre spezifischen ökologischen Nischen. Die Lebenszyklen von *B. subtilis*, *L. lactis*, *E. coli* und *S. aureus* sind sehr unterschiedlich. Das Leben im Boden, in Milchprodukten, im menschlichen Darm, oder in der Flora von Schleimhäuten, bedarf einer spezialisierten Anpassung dieser Bakterien an ihren Lebensraum. Diese

unterschiedliche Anpassung spiegelt sich unter anderem auch in den auf Phosphorylierung basierenden Signalkaskaden wider. Dennoch zeigten die Phosphoproteomstudien der vergangenen Jahre, dass die Phosphorylierungsstellen in den unterschiedlichen Bakterien bezogen auf ihr Vorkommen konserviert sind. So stellen Enzyme der „Housekeeping“-Stoffwechselwege und der zentralen Stoffwechselwege, wie Glykolyse (Abb. 46) und Zitratzyklus, die Mehrzahl der Phosphorylierungen in den untersuchten prokaryotischen Proteomen. Vor allem bei dem Vergleich der phosphorylierten Enzyme der Glykolyse in den Prokaryoten *B. subtilis*, *E. coli* und *L. lactis* findet man eine hohe Übereinstimmung (Bendt *et al.*, 2003; Macek *et al.*, 2007; Macek *et al.*, 2008; Soufi *et al.*, 2008). In *S. aureus* 8325 konnte die Phosphorylierung der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, der Triosephosphatisomerase, der Enolase und der Pyruvatkinase nachgewiesen werden (Abb. 46) (Lomas-Lopez *et al.*, 2007; diese Arbeit). Damit scheint auch in *S. aureus* die Phosphorylierung bestimmter glykolytischer Enzyme durch PknB eine wichtige Rolle bei der Regulation des Stoffwechsels einzunehmen. Ob sich die Gesamtheit der phosphorylierten Proteine in *S. aureus* ebenfalls mit den beschriebenen Phosphoproteomstudien vergleichen lässt, muss durch weiterführende Phosphoproteomstudien von *S. aureus* noch genauer untersucht werden.



**Abbildung 46:** Schematische Darstellung der Enzyme der Glykolyse mit Überblick der phosphorylierten Enzyme in *B. subtilis*, *E. coli*, *L. lactis* und *S. aureus*. Eine Übereinstimmung von vier phosphorylierten glykolytischen Enzymen lässt sich am deutlichsten beim Vergleich *S. aureus* mit *B. subtilis* erkennen (modifiziert nach Soufi *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mittels 2DGE identifizierten verringert phosphorylierten Proteine Triggerfaktor Tig, Glutamatdehydrogenase GudB, Translationselongationsfaktor Tu, Transkriptionselongationsfaktor GreA, Pyruvatdehydrogenase Pyk, Isocitratdehydrogenase CitC sowie die Adenylosuccinat-Synthase PurA *in vitro*-Substrate von PknB sind. Auffällig ist jedoch, dass es kaum Übereinstimmungen unter den phosphorylierten Proteinen der untersuchten *S. aureus*-Stämme gibt. Nur die Glutamatdehydrogenase GudB und der Transkriptionselongationsfaktor GreA waren in den beiden *pknB*-Mutantenstämmen 8325 $\Delta$ *pknB* und SH1000 $\Delta$ *pknB* vermindert phosphoryliert. Keine Übereinstimmung konnte dagegen unter den verändert phosphorylierten Proteinen für alle drei untersuchten Stämme festgestellt werden.

Eine mögliche Erklärung könnte das Fehlen der extrazellulären Domänen von PknB des *S. aureus* Stamms COL liefern. In diesem Stamm findet man an Position 721 bp der *pknB*-Sequenz das Stopcodon TGA, wodurch die PASTA-Domänen nicht translatiert werden. Das verkürzte PknB-Protein konnte in Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. PknB im Stamm COL besitzt somit keine Sensordomäne und ist vermutlich dadurch nicht in der Lage extrazelluläre Signale direkt zu erkennen. Die Auswirkungen dieses Defekts auf die Funktion der katalytischen Aktivität und das Substratmuster sind allerdings noch weitestgehend unverstanden. Des Weiteren unterscheiden sich die untersuchten *S. aureus*-Stämme genetisch voneinander. So ist der Stamm 8325 aufgrund einer 11 bp-Deletion im *rsbU*-Gen ein Sigma-B defizienter Stamm, während der Stamm SH1000 Sigma-B positiv ist. Der alternative Sigmafaktor B spielt eine Rolle bei der Stressantwort von *S. aureus*. Das SigB-Regulon ist an der Expression von Genen beteiligt, die zur Resistenz gegen Säure, Hitze und oxidativen Stress benötigt werden. *SigB*-Deletionsmutanten in *S. aureus* waren gegenüber dieser Art von Stress empfindlicher als der isogene Wildtyp (Gertz *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 1998). Der Stamm COL zählt zu den MRSA-Stämmen und unterscheidet sich dadurch von den MSSA-Stämmen 8325 und SH1000. Des Weiteren findet man im Gegensatz zum Stamm COL im Genom der Stämme 8325 und SH1000 drei Bakteriophagen ( $\Phi$ 11,  $\Phi$ 12,  $\Phi$ 13). Der Stamm COL codiert dagegen die *S. aureus*-Pathogenitätsinsel 1 (SaPI 1), die zusätzliche Faktoren wie *seb*, *ear*, *seq* und *sek* trägt. Trotz dieser unterschiedlichen variablen genetischen Elemente, unterscheiden sich die Stämme 8325 bzw. SH1000 und COL kaum in

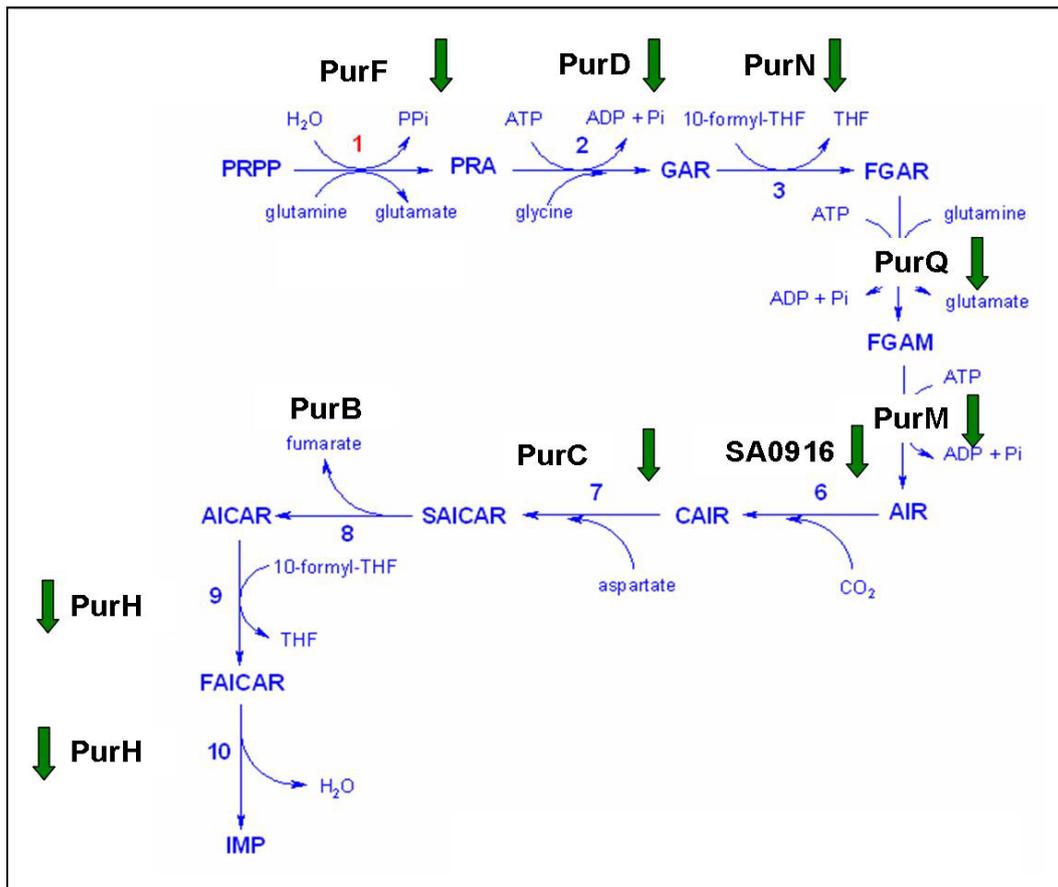
ihrem Kerngenom. Sie gehören eng verwandten MLST-Typen (8325: ST8 und COL: ST250) an (Lindsay *et al.*, 2004).

Interessanterweise konnten jedoch ebenfalls gehäuft Proteine der zentralen Stoffwechselwege durch die Phosphorproteomanalysen im Stamm COL identifiziert werden. Welche Rolle die Phosphorylierung der in dieser Arbeit erkannten Substrate in *S. aureus* spielt, muss zukünftig noch weiter untersucht werden. Einen Beitrag zur Aufklärung könnte die Identifizierung des bzw. der extrazellulären Signale von PknB leisten. So könnte man die Reaktion der Zelle auf ein bestimmtes externes Signal, wie z.B. Umweltstressoren wie Nährstoffmangel oder Zellwandstress über die PknB vermittelte Phosphorylierung der identifizierten Substrate mittels geeigneter Analyseverfahren verfolgen.

## 6.5 PknB reguliert die *de novo*-Purinbiosynthese

In meiner Diplomarbeit (Donat, 2005) wurde bereits eine Transkriptom-Analyse des *S. aureus*-Stammes 8325 und dessen isogener  $\Delta pknB$ -Mutante mittels kompetitiver Microarray-Analyse durchgeführt. Diese Daten wurden in der hier vorliegenden Arbeit erneut statistisch ausgewertet. Dazu wurde die SAM-Software („significance analysis of microarrays“) der Universität Stanford verwendet (Tusher *et al.*, 2001). Dieses multiple Testverfahren ermöglicht die Ermittlung einer „false discovery rate“ und damit den leichten Ausschluss von falsch-positiven Expressionsergebnissen. Durch Anwendung dieses stringenteren statistischen Testverfahrens konnten signifikante Änderungen der Genexpression in  $\Delta pknB$  ermittelt werden.

Die Analyse des Transkriptoms der  $\Delta pknB$ -Deletionsmutante mittels Microarray-Analyse zeigte eine verringerte Expression der Gene der Purin- und Pyrimidinbiosynthese. Die Gene der ersten Schritte der *de novo*-Purinbiosynthese *purK*, *purQ*, *purL*, *purF*, *purM*, *purN*, *purH* und *purD* waren niedriger exprimiert im Vergleich zum isogenen Wildtyp 8325. Diese Gene codieren für Enzyme, die die Synthese von IMP (Inosin-5-Phosphat) aus PRPP (5-Phospho- $\alpha$ -Ribose-1-Pyrophosphat) katalysieren, das gemeinsame Vorläufermolekül aller Purinribonukleotide (Abb. 47).

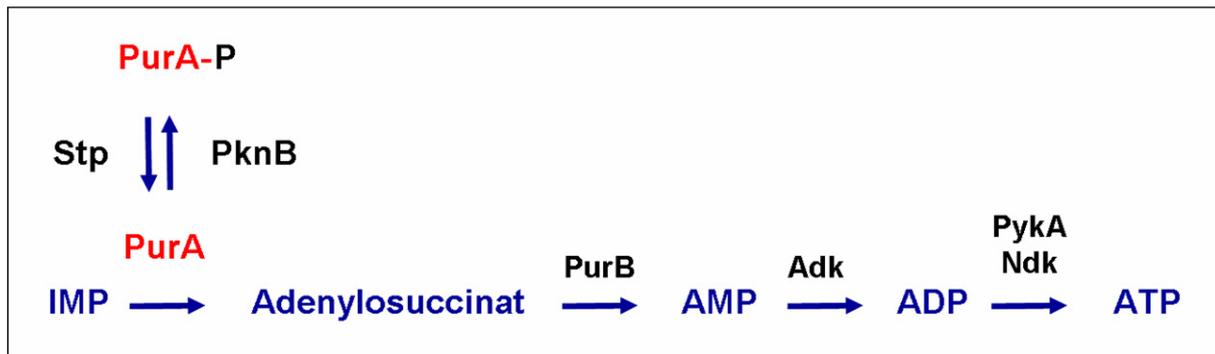


**Abbildung 47:** Schematische Darstellung der Reaktionsschritte der *de novo*-Purinbiosynthese. Dargestellt sind die ersten Schritte der Synthese von IMP aus PRPP. Die grünen Pfeile markieren die in der  $\Delta pknB$ -Mutante verringert exprimierte Gene. PRPP: Phosphoribosylpyrophosphat; PRA: 5-Phosphoribosylamin; GAR: 5-Phosphoribosylglycinamid; FGAR: 5-Phosphoribosyl-N-Formylglycinamid; FGAM: 5-Phosphoribosyl-N-Formylglycinamidin; AIR: 5-Phosphoribosylaminoimidazol; CAIR: 1-(5-Phosphoribosyl)-5-Amino-4-Carboximidazol; SAICAR: 1-(5-Phosphoribosyl)-4-(N-Succinocarboxamid)-5-Aminoimidazol; AICAR: 1-(5-Phosphoribosyl)-5-Amino-4-Imidazolcarboxamid; FAICAR: 1-(5-Phosphoribosyl)-5-Formamido-4-Imidazolcarboxamid; IMP: Inosin-5-Phosphat.

Auch die Gene der Enzyme des Pyrimidinbiosyntheseweges, die die Bildung von UMP aus L-Glutamin katalysieren, *pyrP*, *pyrR*, *pyrB*, *pyrC*, *pyrAA*, *pyrAB*, *pyrF* und *pyrE*, wurden in der Deletionsmutante verringert exprimiert. Die unter anderem über diese Stoffwechselwege synthetisierten energiereichen Triphosphat-Verbindungen wie ATP und UTP werden für eine Vielzahl von zellulären Prozessen benötigt, so auch für die Zellwandsynthese (Mongodin *et al.*, 2003). Vorstellbar wäre, dass beim Fehlen der STPK PknB aufgrund der verminderten Expression der Gene der Pyrimidinbiosynthese UMP nicht in der benötigten Menge synthetisiert werden kann, wodurch dann in der Zelle die Aktivierung von N-Acetyl-D-Glucosaminphosphat und damit die nachfolgende Peptidoglykansynthese negativ beeinflusst sein könnte. Die Untersuchung des intrazellulären Metaboloms der *pknB*-Mutante im Vergleich zum

isogenen Wildtyp mittels IP-LC-MS („ion-pair liquid-chromatography mass-spectrometry“) zeigte jedoch keine verminderte UMP-, UDP- oder UTP-Konzentration nach Wachstum der Bakterien in LB-Medium. Es konnte vielmehr eine höhere Konzentration dieser U-Nukleotide in  $\Delta pknB$  festgestellt werden. Man kann deshalb vermuten, dass die *de novo*-Synthese in Vollmedien wie LB-Medium keine Rolle spielt, sondern dass die Bakterien vielmehr den Abbauweg („salvage pathway“) zur Synthese ihrer Nukleotide verwenden. Dafür spricht auch, dass nach Wachstum in CDM ohne adäquate Purin- oder Pyrimidinquelle die UMP-Konzentration in der  $\Delta pknB$ -Mutante deutlich geringer war als im Wildtyp.

Interessanterweise konnte für die A-Nukleotid-Konzentration ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Obwohl man aufgrund der verringerten Expression der Gene der *de novo*-Purinbiosynthese eine verringerte Konzentration an IMP und damit ATP in der Deletionsmutante erwarten würde, zeigte die Analyse mit Hilfe der Metabolombestimmung eine erhöhte Konzentration an A-Nukleotiden bei Wachstum in LB-Medium. Die Synthese von AMP aus IMP und damit letztlich zu ATP wird von der Adenylosuccinat-Synthase PurA katalysiert. Dieses Schlüsselenzym der Purinbiosynthese wurde mit Hilfe der angewendeten kombinierten 2DGE/Phosphoproteom-Analyse als putatives *in vivo*-Substrat von PknB in *S. aureus* identifiziert. Nachdem PurA in *E. coli* überexprimiert worden war, konnte mittels *in vitro*-Kinaseassays die Phosphorylierung von PurA durch PknB bewiesen werden. Außerdem konnte in Enzymaktivitätsbestimmungen gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch PknB die enzymatische Aktivität von PurA inhibiert (1,8-fach verringerte enzymatische Aktivität). Damit könnte PknB die Umwandlung von IMP zu AMP am Knotenpunkt der Purinbiosynthese regulieren. Es ist bekannt, dass die STPK Stk1 von *Streptococcus agalactiae* (Rajagopal *et al.*, 2005) ebenfalls PurA phosphoryliert, wodurch die Aktivität von PurA negativ beeinflusst wird. Wir vermuten, dass ähnlich wie Stk1, PknB PurA phosphoryliert, wenn der intrazelluläre A-Nukleotidspiegel ansteigt. Diese Inhibierung von PurA führt dann zur Suppression der weiteren AMP- und ATP-Produktion. Gleichzeitig steigt der IMP-Spiegel in der Zelle an, wie in dieser Arbeit ermittelt werden konnte. (Abb. 48)



**Abbildung 48:** Regulation der Synthese von AMP aus IMP durch den Phosphorylierungsstatus der Adenylosuccinat-Synthase PurA.

In Abwesenheit von PknB kann die Zelle nicht mehr die Synthese der A-Nukleotide über den Phosphorylierungsstatus von PurA regulieren. Da die dephosphorylierte Adenylosuccinat-Synthase PurA enzymatisch aktiver ist als die phosphorylierte Form, wird vermehrt AMP aus IMP gebildet, wodurch die A-Nukleotidkonzentration in der Zelle ansteigt. Wahrscheinlich trägt im Vollmedium der Purinabbau ebenfalls zu einer erhöhten AMP- und ATP-Konzentration bei. In LB-Medium sind ausreichende Mengen an Adenin und anderen Purinen vorhanden, so dass die Enzyme der *de novo*-Purinbiosynthese bei Wachstum im Vollmedium von den bakteriellen Zellen nicht benötigt werden. Die beobachtete erniedrigte Expression der ersten Gene der *de novo*-Purinbiosynthese beruht wahrscheinlich auf einer Endprodukthemmung durch AMP und ATP. Die ansteigende Konzentration der Endprodukte AMP und ATP hemmt dabei die Expression der Gene der *de novo*-Purinbiosynthese. Diese Vermutung wird gestärkt durch die Beobachtung, dass die  $\Delta pknB$ -Mutante in CDM ohne Purin- oder Pyrimidinquelle ein vermindertes Wachstum im Vergleich zum isogenen Wildtyp aufweist. Zusätzlich zeigte die Metabolom-Analyse eine erniedrigte AMP- bzw. ATP-Konzentration in  $\Delta pknB$  in CDM. Nach Zugabe von Adenin und Guanin wurde der Wachstumsdefekt der  $\Delta pknB$ -Mutante jedoch aufgehoben. Auch die Zugabe von Xanthin führt zu einer Aufhebung des Wachstumsdefekts. Xanthin stellt dabei die bevorzugte Purinquelle dar, wie bereits für andere Prokaryoten gezeigt wurde (Rajagopal *et al.*, 2005).

## 6.6 PknB beeinflusst den Zitratzyklus und die Glutamat-Synthese

Interessanterweise zeigt die Analyse des Transkriptoms, dass Gene die eine Rolle in den zentralen Stoffwechselwegen spielen, überrepräsentiert in der Gruppe der deregulierten Gene in der 8325*pknB*-Mutante sind. So sind nahezu alle Gene des Zitratzykluses (TCA) in der  $\Delta pknB$ -Mutante stärker exprimiert: *citB*, *citC*, *odhB*, *sucD*, *sucC*, *odhA*, *sdhB*, *citG* und *pckA*. Diese katalysieren über verschiedene Synthesewegzwischenprodukte letztlich die Synthese von Oxalacetat aus Zitrat. Es konnte bereits für *Corynebacterium glutamicum* gezeigt werden, dass dessen STPK PknG das Enzym OdhI phosphoryliert (Niebisch *et al.*, 2006). Phosphoryliertes OdhI bildet keinen Komplex mehr mit dem 2-Oxoglutaratdehydrogenase-Komplex (ODHC), wodurch dessen Aktivität nicht inhibiert werden kann. Dadurch wird Succinyl-CoA gebildet, was zu einer Erhöhung der Konzentration an 2-Oxoglutarat führt (Bott, 2007). 2-Oxoglutarat wird dann durch die Glutamatdehydrogenase GudB zu Glutamat umgesetzt oder kann wieder durch CitZ-Oxidation in den Zitratzyklus gelangen.

Wie die 2DGE-Phosphoproteom-Analyse in dieser Arbeit für die Stämme 8325 und SH1000 gezeigt hat, weist GudB in der jeweiligen *pknB*-Mutante einen verminderten Phosphorylierungsstatus auf und wird tatsächlich *in vitro* durch PknB phosphoryliert. Es ist denkbar, dass durch das Fehlen von PknB im Stamm 8325 eine erhöhte Glutamat-Konzentration vorliegt, die auf die verstärkte Expression der beschriebenen Gene des TCA und der damit erhöhten Konzentration an 2-Oxoglutarat zurückzuführen ist. Gleichzeitig könnte die verstärkte Expression von *gudB* in  $\Delta pknB$  ebenfalls eine Folge der Erhöhung des Glutamatspiegels sein. Es konnten zwei Enzyme des TCA als *in vitro*-Substrate von PknB identifiziert werden. PknB phosphoryliert die Glutamatdehydrogenase GudB und die Isocitratdehydrogenase CitC. Cozzone *et al.* (2005) beschrieb die Inaktivierung von CitC durch reversible Phosphorylierung in *E. coli*. Es ist denkbar, dass auch GudB mittels Phosphorylierung negativ reguliert werden kann. Man kann deshalb spekulieren, dass beim Fehlen von PknB in *S. aureus* die Regulation dieser wichtigen Enzyme des TCA und des Glutamatstoffwechsels eingeschränkt ist. Dadurch dauert im TCA neben der Erhöhung der Expression der Gene des TCA und *gudB* in  $\Delta pknB$  auch die Aktivität der Enzyme CitC und GudB weiter an. Dies führt zu einer höheren Syntheserate von 2-Oxoglutarat im TCA und damit auch zu einer höheren

Glutamatkonzentration durch Umsetzung des 2-Oxoglutamats durch GudB. In der  $\Delta pknG$ -Mutante von *M. tuberculosis* konnte ebenfalls eine erhöhte Glutamat/Glutamin-Konzentration beobachtet werden (Cowley *et al.*, 2004). Es konnte bewiesen werden, dass die Deletionsmutante Glutamat und Glutamin akkumuliert und, dass gleichzeitig die intrazelluläre Konzentration von aus Glutamat gebildeten Zuckern, wie GlcN-Ins (1-D-myo-Inosityl-2-Amino-2-Desoxy- $\alpha$ -D-Glucopyranosid) und MSH (Mycothioliol), in der Deletionsmutante erhöht sind. Cowley *et al.* (2004) spekuliert, dass PknG in *M. tuberculosis*, die zu 25 % mit der Aminosäuresequenz von PknB in *S. aureus* übereinstimmt, als Sensor für Nährstoffstress dient und dadurch in der Zelle eine Adaption des Stoffwechsels hervorruft. Erst kürzlich veröffentlichte O`Hare *et al.* (2008) die Phosphorylierung von GarA durch PknG und PknB. Es konnte gezeigt werden, dass unphosphoryliertes GarA, wie OdhI von *C. glutamicum*, die 2-Oxoglutamat-Dehydrogenase im TCA inhibiert.

Einen weiteren Hinweis für eine veränderte Glutamat-Konzentration in der *pknB*-Mutante 8325 liefert auch die verstärkte Expression verschiedener Gene des Aminosäuremetabolismus. Die Gene *arg*, *rocA* und *rocD*, die für eine Arginase, 1-Pyrrolin-5-Carboxylatdehydrogenase und eine Ornithinaminotransferase codieren, sind unter anderem für den Abbau von Arginin über Ornithin zu Glutamat im Arginin- und Prolinstoffwechsel verantwortlich (Lengler *et al.*, 1999). Weiterhin sind die Gene des Histidinmetabolismus *hutH* (Histidinammonialyase) und *hutU* (Urocanathydratase) erhöht exprimiert. Diese sind für den Abbau von Histidin über Urocanat zu 4-Imidazol-5-Propionat und damit zu Formamid und Glutamat verantwortlich. Die veränderte Expression dieser Gene könnte in der Deletionsmutante ebenfalls zu einer höheren Produktion von Glutamat führen. Weiterhin sind die Gene des Pyruvatmetabolismus in  $\Delta pknB$  erhöht exprimiert wie z.B: *ald* (Aldehyddehydrogenase-Homolog), *pta* (Phosphotransacetylase) und *pckA* (Phosphoenolpyruvatcarboxykinase). Aufgrund der erhöhten Glutamatkonzentration könnte es in der Mutante zu einer erhöhten Bildung von zentralen Zwischenprodukten des Stoffwechsels wie 2-Oxoglutamat, Oxaloacetat und Pyruvat kommen. Dies könnte dann zur erhöhten Transkription der genannten Enzyme des Pyruvatmetabolismus führen. Um festzustellen, ob PknB eine ähnliche Rolle im Glutamatmetabolismus, wie PknG von *M. tuberculosis* und *C. glutamicum* spielen

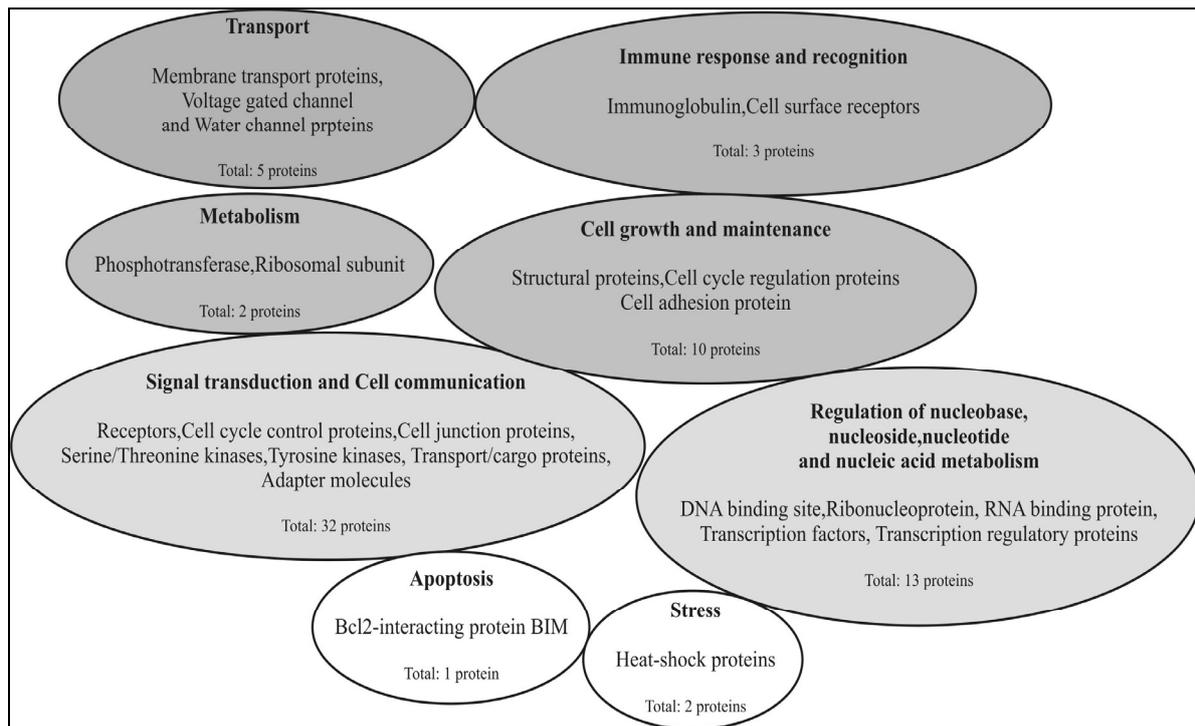
könnte, müsste man auch hier die tatsächliche Glutamat-Konzentration in der Deletionsmutante ermitteln oder die Konzentration der sich aus Glutamat oder Glutamin ableitenden Substrate.

## 6.7 Der Einfluss von Stressfaktoren auf die *pknB*-Transkription

Bei der Kultivierung der *S. aureus*-Stämme 8325, COL, SH1000 und 8325-4 konnte ein Einfluss unterschiedlicher Stressfaktoren auf die Transkription von *pknB* festgestellt werden. In Anwesenheit von 7 % EtOH, 33 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (oxidativer Stress) und bei Hitzeschock (49 °C) verringerte sich die *pknB*-Transkriptmenge. Diese Ergebnisse scheinen keine Folge einer Wahrnehmung der Umweltveränderungen durch PknB zu sein. Die erniedrigte Expression von *pknB* ist vermutlich viel mehr eine Antwort der Zelle auf die verschiedenen Stressfaktoren. Neben dieser verringerten Expression reagiert die Zelle auf unterschiedliche Umweltbedingungen auch durch eine veränderte Zellwandsynthese und eine Veränderung der zentralen Stoffwechselwege wie Glykolyse und Zitratzyklus. In *M. tuberculosis* konnte eine veränderte Expression von *pknH* als Antwort auf verschiedene Stressfaktoren ermittelt werden. So führten pH- und Hitze-Stress zu einer geringeren Transkriptmenge, während Hypoxie, oxidativer Stress und Nährstoffentzug keine Auswirkungen hatten (Sharma *et al.*, 2004). PknF scheint in *M. tuberculosis* dagegen für die Aufrechterhaltung der Zellmorphologie verantwortlich zu sein. Außerdem agiert sie als ein negativer Regulator des Glucosetransportes. Die Inaktivierung von PknF durch eine Antisense-RNA führte zu einer 16-fach höheren Glucoseaufnahme in den mutierten Zellen (Deol *et al.*, 2005).

## 6.8 PknB phosphoryliert eukaryotische Peptide

Es konnte mittels Western Blot-Analyse gezeigt werden, dass PknB in das externe Milieu von *S. aureus* gelangen kann. Es ist deshalb denkbar, dass PknB auch Proteine des Wirtes phosphorylieren kann. In der Tat konnte unter Verwendung eines neuen Peptid-Microarrays (PepChip) die Phosphorylierung eukaryotischer Peptide nachgewiesen werden. Der Peptid-Microarray besteht aus 960 Sequenzen bekannter Kinasesubstrate die bei Zellstress, Zellwachstum und Zelldifferenzierung humaner Zellen eine Rolle spielen (Miller *et al.*, 2009).



**Abbildung 49:** Zelluläre Prozesse auf die PknB von *S. aureus* Einfluss nehmen könnte. Dargestellt sind die humanen Proteine die möglicherweise von PknB phosphoryliert werden könnten und mittels PepChip identifiziert wurden. Die Einteilung erfolgte nach ihrer biologischen Funktion (nach Miller *et al.*, 2009).

68 putative Targets der Phosphorylierung durch PknB die u. a. bei der Apoptose, Immunantwort, Transport, Metabolismus und Signaltransduktion beteiligt sind, wurden auf diesem Weg identifiziert (Abb. 49). Der Vergleich dieser Targetsequenzen lässt eine Prolin-gerichtete Serin/Threonin/Tyrosin-Kinaseaktivität von PknB vermuten. PknB lässt sich damit der Familie der hoch konservierten Familie der Prolin-gerichteten Kinasen zuordnen. Zu dieser gehören u. a. die Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDKs), die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP Kinasen) und die Glykogensynthetasekinase-3 (GSK-3). Damit könnte *S. aureus* wie Yersinien und Mycobacterien (Galyov *et al.*, 1993; Wiley *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2007) auf die Signaltransduktion des Wirtes direkt Einfluss nehmen, indem die freigesetzte bakterielle Kinase PknB die Funktion bestimmter Wirtsproteine durch Phosphorylierung moduliert. Wie die Freisetzung von PknB letztlich erfolgt, muss noch genauer untersucht werden. Denkbar ist, dass durch die Lyse der *S. aureus*-Zellen in der späten stationären Phase PknB in das externe Milieu gelangt. Ob die Aufnahme in die Wirtszellen dann aktiv oder passiv erfolgt, bleibt noch zu klären. Denkbar ist jedoch, dass PknB z.B. wie für PknG von *M. tuberculosis* bewiesen wurde (Walburger *et al.*, 2004), bei der Phagozytose in die Makrophagen gelangt und

hier mit dem Signaltransduktionssystem des Wirtes interagiert. Dadurch könnte die Phosphorylierung bestimmter Wirtsproteine das Wachstum der folgenden *S. aureus*-Zellen im Wirt ermöglichen. Diesen möglichen Einfluss von PknB auf Wirtszellen könnte man im Weiteren *in vivo* durch Invasionsstudien und Überlebensstudien der  $\Delta pknB$ -Mutante im Vergleich zum WT in der Zellkultur untersuchen. Erste Hinweise auf mögliche Interaktionen mit Proteinen des Wirtes lieferte die PepChip-Analyse. Dass PknB tatsächlich eine Rolle in der Pathogenität von *S. aureus* spielt, zeigt die attenuierte Virulenz der *stk1*-Deletionsmutante (= *pknB*) SH1000 (Débarbouillé *et al.*, 2009). Ob diese sich u. a. auf den fehlenden Einfluss von PknB auf die Signaltransduktion der Wirtszellen zurückführen lässt, bedarf noch genauerer Untersuchungen.

## 6.9 Stp (SA1062) ist eine Ser/Thr-Proteinphosphatase aus der PPM-Familie

Die Ser/Thr-Kinasen bilden häufig mit ihren korrespondierenden Ser/Thr-Phosphatasen ein funktionelles Paar. So konnte mittels BLAST-Analyse eine STPP in *S. aureus* 8325 identifiziert werden. Der ORF SA1062 wurde aufgrund seiner Homologie zum entsprechenden ORF in *B. subtilis* YloO, später auch Stp (Beltramini *et al.*, 2009), genannt. Die Aminosäuresequenz der STPPs ist in Bakterien hoch konserviert. Es konnte eine Sequenzidentität zwischen 25-54 % ermittelt werden (Madec *et al.*, 2002). Die SMART-Analyse zeigte ferner, dass Stp eine 238 aa große katalytische Phosphatasedomäne mit einem *E* value von  $3,13e-24$  besitzt. Diese lässt damit eine Einteilung von Stp zur Familie der PPM-Phosphatasen zu, die aufgrund ihrer Domänenstruktur den humanen PP2C-Phosphatasen ähneln. Des Weiteren konnten alle Motive die für die Phosphataseaktivität nötig sind, in Stp identifiziert werden. Vor allem die für die Metallionen-Bindung verantwortlichen Aspartatreste sind konserviert zwischen Stp und der humanen PP2C (Das *et al.*, 1996). Stp konnte mittels Western Blot-Analyse in der Zytoplasmafraktion des *S. aureus*-Stammes 8325-4 detektiert werden (Débarbouillé *et al.*, 2009), dort sind PPM-Phosphatasen typischerweise aktiv. Das Proteinpaar PknB und Stp konnte in mehreren Bakterien nachgewiesen werden, wie z.B: *Bacillus halodurans*, *B. subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Streptomyces coelicolor* sowie in vielen pathogenen Keimen wie *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*,

*S. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und in allen annotierten *S. aureus*-Stämmen.

Typischerweise werden die für die STPK und STPP codierenden Gene in einem Operon transkribiert, wie auch für *stp* und *pknB* von *S. aureus* in der Arbeit von Streker (2005) gezeigt werden konnte. Vermutlich gehören noch weitere Gene „upstream“ von *stp* und *pknB* zu diesem Operon. In dieser Arbeit konnten PCR-Produkte der ORFs SA1058 bis SA1063 amplifiziert werden. Die ORFs SA1058 bis SA1063 sind somit in einem Operon organisiert. SA1058 codiert für ein hypothetisches Protein mit Polypeptid-Deformylase-Homologie, während SA1059 für eine Methionyl-tRNA-Formyltransferase codiert. Der ORF SA1060 codiert für ein weiteres hypothetisches Protein, einem zum RNA-Bindeprotein Sun homologen Protein. SA1061 codiert für ein konserviertes hypothetisches Protein. Außerdem zeigte die RT-PCR Analyse, dass die „downstream“ gelegenen ORFs SA1064 bis SA1066 ebenso ein putatives Operon bilden. Die ORFs SA1064 und SA1066 codieren beide für konservierte hypothetische Proteine, während SA1065 für das Ribulose-5-phosphat-3-Epimerase-Homolog codiert. Um eine mögliche Operonorganisation zu bestätigen und vor allem die jeweiligen Transkriptions-startpunkte dieser beiden putativen Operons zu ermitteln, müsste eine „Primer Extension“-Analyse durchgeführt werden. Da in *S. aureus* 8325 wie auch in den *S. aureus*-Stämmen 8352-4 und N315 die Phosphatase Stp und die Kinase PknB gemeinsam transkribiert werden, kann man von einem regulatorischen Zusammenspiel beider Partner unter bestimmten Stoffwechselsituationen ausgehen (Beltramini *et al.*, 2009; Débarbouillé *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stp eine funktionelle Phosphatase ist, die das konventionelle Substrat MBP sowie die autophosphorylierte Kinase PknB dephosphoryliert. Die Aktivität von Stp ist  $Mn^{2+}$ -abhängig und wurde als putativ zytoplasmatisches Protein mittels Western Blot-Analyse in der Zytoplasmafraktion von *S. aureus* nachgewiesen (Débarbouillé *et al.*, 2009). Dass das funktionelle Paar PknB und Stp eine mögliche Rolle bei der Zellwandsynthese von *S. aureus* einnimmt, lassen die Ergebnisse von Beltramini *et al.* (2009) vermuten. Neben dem Effekt der Doppelmutation von *pknB* und *stp* auf die Zellwandmorphologie wie oben bereits beschrieben wurde, zeigte die Phosphatasedeletionsmutante eine dickere Zellwand

sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber Zellwand-aktiven Antibiotika wie Cephalosporinen und Carbapenemen. Dies stärkt die Annahme, dass die reversible Phosphorylierung von bislang noch nicht identifizierten Strukturen der Zellwand-synthese-Maschinerie durch PknB und Stp wesentlich für den Aufbau einer intakten Zellwandstruktur ist und damit auch für die Empfindlichkeit von *S. aureus* gegen antimikrobielle Substanzen.

Weitere Hinweise zur Funktion von Stp (YloO) in *S. aureus* konnten durch vergleichende Transkriptom-Analysen erhalten werden. Besonders auffällig war die verringerte Expression der Gene der Purinbiosynthese *purS*, *purQ*, *purL*, *purF*, *purM*, *purN* und *purD* in der  $\Delta$ *stp*-Deletionsmutante. Die Expression dieser Gene des Purinstoffwechsels konnte bereits in der  $\Delta$ *pknB*-Mutante beobachtet werden. Wie oben beschrieben, wird die Adenylosuccinat-Synthase PurA durch PknB über Phosphorylierung in ihrer Aktivität reguliert. (Abb. 48). In Abwesenheit von Stp müsste PurA im phosphorylierten Zustand verharren. Phosphoryliertes PurA ist jedoch weniger aktiv als seine unphosphorylierte Form, weshalb es zu einer geringen Umwandlungsrate von IMP zu AMP und letztlich ATP kommen würde. Tatsächlich konnte eine geringere Konzentration an AMP in der  $\Delta$ *stp*-Mutante mittels Metabolom-Analyse detektiert werden. Die Erniedrigung der Transkription der an der Purinbiosynthese beteiligten Enzyme in  $\Delta$ *stp* ist dann eher eine Folge der Regulation dieses Syntheseweges als Antwort auf die unbalancierte Synthese der A-Nukleotide. Die IMP-Konzentration der  $\Delta$ *stp*-Mutante in LB-Medium entspricht der des Wildtyps, was für einen normalen Umsatz von IMP zu AMP spricht. Damit scheint der „salvage pathway“ der Purinbiosynthese für  $\Delta$ *stp* weniger wichtig zu sein im Vergleich zu  $\Delta$ *pknB*. Die erhöhte intrazelluläre IMP-Konzentration der Kinasemutante beruht dagegen vermutlich auf der verstärkten Umsetzung von im LB-Medium vorhandenen Purinquellen mittels des „salvage pathways“. Es ist wahrscheinlich, dass die Regulation der Aktivität von PurA durch die reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch PknB und Stp nicht die einzige Möglichkeit der Zelle ist, sich auf Änderungen in der Nukleotidsynthese einzustellen. Sie ist jedoch eine Möglichkeit der Feinkontrolle dieses Syntheseweges.

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Stp regulatorisch in die Produktion der Kapsel von *S. aureus* eingreift. In der Microarray-Analyse waren die Gene von

Kapselpolysaccharid-Syntheseezymen (*capD*, *capE*, *capG*, *capH*, *capI*, *capJ*, *capK*, *capL*, *capM*, *capN*, *capP*) in der *stp*-Deletionsmutante weniger stark exprimiert als im Wildtyp. Luong & Lee (2006) konnten zeigen, dass in *S. aureus* die Kapselproduktion positiv durch die globalen Regulatoren MgrA und *agr* reguliert wird. Der Regulator MgrA ist ein SarA- und MarA-Homolog und ist an der Regulation von Virulenzfaktoren wie  $\alpha$ -Hämolysin, Protein A, Lipase, Protease und Koagulase sowie der Autolysine und Kapselpolysaccharide beteiligt. Truong-Bolduc *et al.* (2008) beschrieb kürzlich die Regulation der Aktivität von MgrA durch PknB. Der phosphorylierte Regulator MgrA war nicht mehr in der Lage an den *norA*-Promotor zu binden. NorA ist eine Multidrug-Effluxpumpe die u. a. verschiedene Fluoroquinolone als Substrate benutzt. Neben PknB könnte auch Stp die Aktivität von MgrA regulieren. In einem *stp*-defizienten Stamm würde hauptsächlich phosphoryliertes MgrA vorliegen, das ähnlich wie für den *norA*-Promotor beschrieben, nicht mehr die Transkription der Gene für die Kapselpolysaccharide initiieren könnte. Dadurch würde die Expression dieser Gene verringert werden und die Kapsel müsste eine veränderte Struktur im Vergleich zu wildtypischen Zellen aufweisen. Die Struktur der Kapsel wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Weiterhin müsste die Bindung von MgrA und phosphoryliertem MgrA an die entsprechenden regulatorischen Promotorregionen der Kapselsynthesegene gezeigt werden. RT-PCR-Analysen ergaben eine erniedrigte Expression von *mgrA* in  $\Delta$ *stp*. Zusätzlich konnte eine erniedrigte Transkription von *agrA*, *agrC* und *agrB* in  $\Delta$ *stp* zu der beobachteten verringerten Expression der Kapselpolysaccharid-Synthesegene beitragen. Das *agr*-System reguliert positiv die Expression der Kapselsynthesegene (Luong & Lee 2006).

Interessanterweise zeigt die  $\Delta$ *stp*-Mutante eine deutlich verringerte hämolytische Aktivität auf Blutagarplatten. RT-PCR-Analysen konnten eine erniedrigte *hla*- und *hlg*-Transkription nachweisen. Da MgrA und *agr* positiv die  $\alpha$ -Toxin-Expression regulieren, könnte die verringerte hämolytische Aktivität des  $\Delta$ *stp*-Stammes auf die verringerte Expression dieser globalen Regulatoren zurückzuführen sein.

Potenzielle Substrate der bakteriellen STPPs wurden meist im Zuge der Identifizierung der Substrate der verwandten bakteriellen STPKs beschrieben. Es wurde meist die Dephosphorylierung der von STPKs phosphorylierten Substrate gezeigt. Diese antagonistische Wirkungsweise unterstreicht die gemeinsame

regulatorische Funktion der STPKs und STPPs. Interessanterweise beschreibt Singh *et al.* (2007) eine mögliche zusätzliche Funktion bakterieller STPPs. Demnach spielt die STPP PrpC in *B. subtilis* eine Rolle beim Zuckertransport durch das Phosphotransferasesystem (PTS). Das PTS wurde als Zuckertransportsystem entdeckt, das den Transport eines Substrates an seine gleichzeitige Phosphorylierung koppelt (Postma *et al.*, 1993). Die Phosphatgruppe stammt dabei vom Phosphoenolpyruvat und wird mittels zweier generell Energie-gekoppelter Proteine, Enzym I und HPr, sowie den A- und B-Domänen der Zuckerpermease (IIA und IIB) auf den zu transportierenden Zucker übertragen. In *E. coli* kontrolliert dabei der Phosphorylierungsstatus der Glucose-spezifischen IIA-Domäne die Synthese des Signalmoleküls cAMP und die Aktivität einer Reihe von Zuckertransportern (Postma *et al.*, 1993).

In vielen anderen Bakterien ist HPr für die Signaltransduktion entscheidend. Dabei wird in grampositiven Bakterien wie *B. subtilis* und *S. aureus* HPr nicht nur durch das Enzym I des PTS an einem Histidinrest an Position 15 (His-15) phosphoryliert, sondern auch durch eine metabolisch kontrollierte Kinase, die HPr-Kinase/Phosphorylase (HPr-K/P), an Ser-46 (Boël *et al.*, 2003; Poncet *et al.*, 2004). In *B. subtilis* ist HPr (His-P) anwesend, wenn die Zellen in Abwesenheit einer bevorzugten Kohlenstoffquelle wie Glucose wachsen (Ludwig *et al.*, 2002). Diese Form von HPr spielt eine Rolle beim PTS-vermittelten Zuckertransport und transferiert sein Phosphat auf die Glycerolkinase und zu weiteren Transkriptionsregulatoren (Stülke *et al.*, 1998). In Anwesenheit von Glucose ist HPr-K/P durch die hohe intrazelluläre ATP- und Fructose-1,6-Bisphosphat-Konzentration aktiviert. Ein großer Anteil von HPr liegt dabei an dem Serinrest phosphoryliert als HPr (Ser-P) vor (Hanson *et al.*, 2002). HPr (Ser-P) bildet einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor CcpA und dieser Komplex bindet dann an die „Targetsites“ der Promotorregionen der Gene, die die Katabolitregulation bewirken (Blencke *et al.*, 2003). Wenn die Konzentration der bevorzugten Kohlenstoffquelle sinkt, ändert sich die Aktivität der HPr-K/P und das Protein dephosphoryliert nun als Phosphorylase HPr (Ser-P) (Kravanja *et al.*, 1999; Mijakovic *et al.*, 2002). Dies führt zur Dissoziation des CcpA-HPr (Ser-P)-Komplexes und damit zur Auflösung der Katabolitrepression. HPr (Ser-P) kann in *B. subtilis* jedoch auch durch die STPP PrpC dephosphoryliert werden. Dadurch trägt PrpC zur Aufrechterhaltung eines

niedrigen zellulären HPr (Ser-P)-Spiegels in Glucose-freien Medium bei, wodurch sichergestellt wird, dass kein HPr (Ser-P) zur CcpA-abhängigen Genregulation in Abwesenheit von Glucose vorhanden ist (Singh *et al.*, 2007).

Der zweite Effekt der Phosphorylierung von HPr an dem Ser-46 ist, dass HPr (Ser-P) nur ein sehr schwaches Substrat für das Enzym I des PTS ist und damit nicht für den Zuckertransport erreichbar ist (Deutscher *et al.*, 1984). Dies resultiert in einem beeinträchtigten PTS-vermittelten Zuckertransport, wenn der Großteil von HPr an Ser-46 phosphoryliert vorliegt (Ludwig *et al.*, 2002). Es wäre deshalb denkbar, dass eine komplette Dephosphorylierung von HPr, die gemeinsam durch die Aktivität von HPr-K/P und PrpC erreicht werden kann, die Verfügbarkeit von freiem HPr für den PTS-Phosphattransfer zu allen Zuckerpermeasen sicherstellt und damit eine Voraussetzung für die schnelle Adaption an ein sich verbesserndes Nährstoffangebot bildet (Singh *et al.*, 2007). Auch in *S. aureus* ist diese Szenario vorstellbar, bedarf jedoch detaillierter Untersuchungen. Auffällig ist jedoch, dass die Microarray-Analyse der  $\Delta yloO$ -Mutante eine deutlich niedrigere Expression von für Transportproteine codierender Gene zeigt. So sind die Gene *mtIF* und *mtIA*, die für Komponenten eines PTS codieren, erniedrigt exprimiert, ebenso die Permease-Gene *oppB*, *oppC* und *opp-2D*. Man kann spekulieren, dass beim Fehlen der Phosphatase in *S. aureus* die ausbleibende vollständige Dephosphorylierung von HPr zu einem veränderten Zuckertransport führt, den die Zellen durch eine Veränderung der Genexpression verschiedener Transportprotein zu regulieren versucht.

## 6.10 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass PknB und Stp funktionelle Enzyme *in vitro* und *in vivo* sind. Es konnten die für die Aktivierung von PknB verantwortlichen Aminosäurereste sowie die enzymatischen Bedingungen von PknB *in vitro* aufgeklärt werden. Damit weist PknB die für bakterielle STPKs typische postulierte Wirkungsweise auf. Des Weiteren ermöglichte die Identifizierung von *in vivo*-Substraten die Rolle von PknB im Stoffwechsel von *S. aureus* zu verstehen. Durch die Phosphorylierung der Adenylosuccinat-Synthase PurA ist es dem Bakterium möglich regulierend auf die Nukleotidsynthese einzuwirken. Damit findet eine Feinregulation dieses wichtigen Stoffwechselweges statt. Die Komplexität der Signaltransduktion durch PknB wird jedoch mit der Betrachtung der weiteren Substrate deutlich. Die Phosphorylierung verschiedener Enzyme zentraler Stoffwechselwege, wie z. B. Glykolyse, Nukleotidsynthese und Zellwandsynthese, unterstreicht die Bedeutung der Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten durch PknB als einen wichtigen regulatorischen Mechanismus in *S. aureus*. Man kann dabei jedoch einen „On-Off“-Mechanismus der Regulation durch PknB ausschließen und vielmehr eine globale Funktion der Kinase in *S. aureus* vermuten.

Darüber hinaus sind bislang keine extrazellulären Signale bekannt, die STPKs wie PknB aktivieren. Die Aufklärung der Aufnahme der Signale, deren Weiterleitung und Verarbeitung innerhalb einer Signalkaskade sollte deshalb eines der zukünftigen Ziele der Charakterisierung von PknB sein. Hinweise auf mögliche externe Signale liefert die Betrachtung der Domänenstruktur von PknB. Die C-terminalen PASTA-Domänen wurden erst kürzlich als Peptidoglykan-bindende Strukturen bei *B. subtilis* beschrieben (Shah *et al.*, 2008). Man nimmt deshalb eine Rolle der Kinase bei der Zellwandsynthese an. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten ebenfalls auf einen Einfluss von PknB bei der Synthese der Zellwand hin. Dieser muss jedoch im Detail weiter aufgeklärt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

**Absalon C., et al.** (2009). CpgA, EF-Tu and the stressosome protein YezB are substrates of the Ser/Thr kinase/phosphatase couple, PrkC/PrpC, in *Bacillus subtilis*. Microbiology, **155** (Pt 3):932-43.

**Adler E, Donella-Deana A, Arigoni F, et al.** (1997). Structural relationship between a bacterial developmental protein and eukaryotic PP2C protein phosphatases. Mol Microbiol, **23** (1):57-62.

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

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

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

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

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

**Barford D.** (1996). Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. Trends Biochem Sci, **21** (11):407-12. *Review*.

**Beltramini A. M., Mukhopadhyay C. D., Pancholi V.** (2009). Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase. Infect Immun, **77**(4):1406-16.

**Bendt A. K. et al.** (2003). Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum*. Proteomics, **3**, 1637–1646.

**Blencke H. M., et al.** (2003). Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. Metab Eng, **5** (2):133-49.

**Bobek J, Halada P, Angelis J, Vohradský J, Mikulík K.** (2004). Activation and expression of proteins during synchronous germination of aerial spores of *Streptomyces granaticolor*. Proteomics, **4** (12):3864-80.

**Boël G, et al.** (2003). Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in Gram-negative bacteria. J Mol Microbiol Biotechnol, **5** (4):206-15. *Review*

**Bohach G. A.; Fast D. J., Nelson R. D. and Schlievert P. M.** (1990). Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. Crit Rev Microbiol, **17**: 251-72.

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

**Bott M.** (2007). Offering surprises: TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*. Trends Microbiol, **15** (9):417-25. *Review*.

- Brückner R.** (1997). Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. FEMS Microbiol Lett. 151:1-8.
- Chaba R., Raje M. & Chakraborti P. K.** (2002). Evidence that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* regulates morphological changes associated with cell division. Eur. J. Biochem., **269**: 1078-1085.
- Chan P.F., Foster S.J., Ingham E., et al.** (1998). The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor  $\sigma^B$  controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. J. Bacteriol., 180 (23): 6082-6089.
- Cha R., Brown W. J. & Rybak M. J.** (2003). Bactericidal activities of daptomycin, quinupristin-dalfopristin, and linezolid against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. Antimicrob. Agents Chemother., **47** (12): 3960-3963.
- Cheung A. L., Bayer A. S., Zhang G., et al.** (2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., **40**: 1-9
- Chopra I., Hodgson J., Metcalf B., et al.** (1997). The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. Antimicrobial Agents Chemother., **41** (3): 497-503.
- Cohen P.** (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. Annu Rev Biochem., **58**: 453-508. *Review.*
- Cowley S., Ko M., Pick N. et al.** (2004). The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth *in vivo*. Mol Micro. **52**: (6) 1691-1702.
- Cozzone AJ.** (2005). Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. J Mol Microbiol Biotechnol, **9** (3-4):198-213. *Review.*
- Cozzone A. J., Grangeasse C., Doublet P., Duclos B.** (2004). Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. Arch Microbiol, **181** (3):171-81. *Review.*
- Das A. K., Helps N. R., Cohen P. T., Barford D.** (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. EMBO J, **15** (24):6798-809.
- Débarbouillé M., et al.** (2009). Characterization of a Serine/Threonine Kinase Involved in Virulence of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **191** (13):4070-81.
- De Lencastre H., Wu S.W., Pinho M.G., et al.** (1999). Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin. Microbiol Drug Resistance, **5** (3): 163-175.
- Deol P., Vohra R., Saini A. K., et al.** (2005). Role of *Mycobacterium tuberculosis* ser/thr kinase PknF: Implications in glucose transport and cell division. J. Bacteriol., **187** (10): 3415-3420
- Deutscher J., Kessler U., Alpert C. A., Hengstenberg W.** (1984) Bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: P-ser-HPr and its possible regulatory function. Biochemistry, **23**: 4455–4460.
- Deutscher J., Saier MH Jr.** (2005). Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in bacteria - for long time neglected, now well established. J Mol Microbiol Biotechnol, **9** (3-4):125-31.
- Deurenberg R. H, Stobberingh E. E.** (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. **8** (6):747-63. *Review.*

- Diep B. A, Otto M** (2008). The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. Trends Microbiol **16**:361–369.
- Diep BA, et al.** (2006). Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet **367**:731–739.
- Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M.** (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev.; **13**(1):16-34, table of contents. Review.
- Donat S., et al.** (2009). Transcriptome and functional analysis of the eukaryotic-type ser/thr kinase PknB in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **191** (13):4056-69.
- Donat S.** (2005). Molekulare Charakterisierung der Ser/Thr Proteinkinase PknB von *Staphylococcus aureus*. Diplomarbeit.
- Duràn R., et al.** (2005). Conserved autophosphorylation pattern in activation loops and juxtamembrane regions of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr protein kinases. Biochem Biophys Res Comm, **333**:858–867.
- EARSS Annual Report 2008.** Jahresreport des European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), funded by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) of the European Commission, the Dutch Ministry of Health, Welfare and Sports, and the Dutch National Institute for Public Health and the Environment.
- Ellington M.J., et al.** (2008). Distribution of the ACME-*arcA* gene among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from England and Wales. J Antimicrob Chemother. **61**(1):73-7.
- Eymann C, et al.** (2007). Dynamics of protein phosphorylation on Ser/Thr/Tyr in *Bacillus subtilis*. Proteomics, **7** (19):3509-26.
- Fournier B. & Hooper D. C.** (2000). A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **182**: 3955-3964.
- Fournier B., Klier A., Rapoport G.** (2001). The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **41**: 247-261.
- Foussard M., Cabantous S., Pedelacq J. D., et al.** (2001). The molecular puzzle of two-component signalling cascades. Microbes and Infection, **3**: 417-424.
- Gaidenko T.A., Kim T.J., Price C. W.** (2002). The PrpC serine-threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase *Bacillus subtilis* cells. J Bacteriol. **184** (22):6109-14.
- Galyov E. E., Hakansson S., et al.** (1993). A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. Nature. **361**: 730-732.
- GERMAP-2008, Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch.** Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland.
- Gertz S., Engelmann S., Schmid R., et al.** (2000). Characterization of the  $\sigma^B$ -regulon in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., **182** (24): 6983-6991.
- Gillet Y., Issartel B., Vanhems P., et al.** (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet, **359**: 753-759.
- Giraud A.T., Cheung A. L., & Nagel R.** (1997). The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. Arch Microbiol. **168**: 53-58.

- Good M.C., Greenstein A.E., et al.** (2004). Sensor domain of the *Mycobacterium tuberculosis* receptor Ser/Thr protein kinase, PknD, forms a highly symmetric b propeller. J. Mol. Biol. **339** 459–469.
- Gordon E.** (2000). The crystal structure of the penicillin-binding protein 2X from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. J. Mol. Biol., **299**: 477-485.
- Graumann P. et al.** (2009). Translation elongation factor EF-Tu is part of the bacterial cytoskeleton. Präsentation KI 02 auf VAAM-Jahrestagung 2009 in Bochum.
- Greenstein A. E., Grundner C., et al.** (2005). Structure/function studies of Ser/Thr and Tyr protein phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. J Mol Microbiol Biotechnol, **9** (3-4):167-81.
- Grundner C., Gay L. M. & Alber T.** (2005). *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknB, PknD, PknE and PknF phosphorylate multiple FHA domains. Protein Science, **14**: 1918-1921.
- Hanks S. K. & Hunter T.** (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J., **9** (8):576-96.
- Hanks S. K., Quinn A. M. & Hunter T.** (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science, **241**: 42-52.
- Hanlon W. A., Inouye M. & Inouye S.** (1997). Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. Mol. Microbiol., **23** (3): 459-471.
- Hanson K. G., et al.** (2002). HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene and effects of mutations on enzyme activity, growth and carbon catabolite repression. Microbiology, **148** (Pt 6):1805-11.
- Haslinger-Löffler B, Brück M, Grundmeier M, Peters G, Sinha B.** (2007). Staphylococcal infections impair the mesothelial fibrinolytic system: the role of cell death and cytokine release. Thromb Haemost.,98(4):813-22. Erratum in: Thromb Haemost. 2008 Feb;99(2):455.
- Hershberger E, Donabedian S, et al.** (2004). Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. Clin Infect Dis, **38** (1):92-8.
- Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., et al.** (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother., **40**: 135-136.
- Holden M. T. G., Feil E. J., Lindsay J. A., et al.** (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. PNAS, **101** (26): 9786-9791.
- Horsburgh M.J., et al.** (2002). MntR modulates expression of the PerR regulon and superoxide resistance in *Staphylococcus aureus* through control of manganese uptake. Mol. Microbiol. **44**:1269–86
- Hunter T.** (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. Cell, **80**: 225-236.
- Ingebritsen T. S. & Cohen P.** (1983). The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. Eur J Biochem, **132** (2): 255-61.
- Iordanov M.S., Magun B.E.** (1999). Different mechanisms of c-Jun NH(2)-terminal kinase-1 (JNK1) activation by ultraviolet-B radiation and by oxidative stressors. J. Biol. Chem., **274**: 25801-25806.

- Ito T., Ma X. X., Takeuchi F., et al.** (2004). Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrobial Agents Chemother.: 2637-2651.
- Ito T., Okuma K., Ma X. X., et al.** (2003). Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug. Resist. Update, **6**: 41-52.
- Jevons M. P.** (1961). Celbenin-resistant staphylococci. BMJ, **1**: 124-125.
- Johnsson D., Mölling P., Stralin K., et al.** (2004). Detection of Panton-Valentine Leukocidin gene in *Staphylococcus aureus* by LightCycler PCR: clinical and epidemiological aspects. CMI, **10**: 884-889.
- Juang R. H., McCue K. F., Ow D.W.** (1993). Two purine biosynthetic enzymes that are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe* utilize cysteine sulfinate in vitro. Arch Biochem Biophys, **304** (2):392-401.
- Kang C. M., Abbott D.W., Park S.T., et al.** (2005). The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. Genes and Development, **19**: 1692-1704.
- Kang C.M., Brody M.S., Akbar S., Yang X., Price C.W.** (1996). Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcriptionfactor  $\sigma^B$  in response to environmental stress. J. Bacteriol., **178**: 3846-3853.
- Kravanja M., et al.** (1999). The hprK gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. Mol Microbiol, **31** (1):59-66.
- Kennelly P. J.** (2002). Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. FEMS Microbiol Lett, **206**: 1-8.
- Kennelly P. J.** (2003). Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry. Biochem J, **370**(Pt 2):373-89. *Review*.
- Kennelly P. J. , & Potts M.** (1999). Life among the primitives: protein O-phosphatases in prokaryotes. Front Biosci, **4** :D372-85. *Review*.
- Kloos, W. E. & Bannerman, T. L.** (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev, **7**: 117-140.
- Kloos, W. E. & Lambe, D. W., Jr.** (1991). *Staphylococcus*. In Manual of Clinical Microbiology, 5th edn, pp. 222-237. Edited by A. Barlows, W. J. Hausler, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg & H. J. Shadomy. Washington DC: ASM Press.
- Koul A., Herget T., Klebl B., Ullrich A.** (2004). Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. Nat Rev Microbiol, **2** (3):189-202. *Review*.
- Kresken M., Hafner D., Schmitz FJ., et al.** (2001). PEG-Resistenzstudie. Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.
- Kumar P, Kumar D, Parikh A, et al.** (2009). The *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase K modulates activation of transcription from the promoter of mycobacterial monooxygenase operon through phosphorylation of the transcriptional regulator VirS. J Biol Chem, **284** (17):11090-9.
- Kuroda M., Kuroda H., Oshima T., et al.** (2003). Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol., **49** (3): 807-821.

- Kuroda M., Kuwahara-Arai K. & Hiramatsu K.** (2000). Identification of the up- and downregulated genes in Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. Biochem. Biophys. Res. Communications, **269**: 485-490.
- Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., et al.** (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet, **357**: 1225-1240.
- LaPlante KL. and Rybak MJ.** (2004). Daptomycin- a novel antibiotic against Gram-positive pathogens. Expert Opin. Pharmacother., **5** (11): 2321-2331.
- Laskowski-Arce MA & Orth K.** (2007). The elusive activity of the Yersinia protein kinase A kinase domain is revealed. Trends Microbiol, **15** (10):437-40.
- LeLoir Y., Baron and M. Gautier** (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Gen. Mol. Res., **2**: 63-76.
- Lengler J. W., Drews G. and Schlegel H. G.** (1999). Biology of the prokaryotes. Thieme Verlag Stuttgart. 1. Auflage
- Lévine A, Vannier F, et al.** (2006). Analysis of the dynamic *Bacillus subtilis* Ser/Thr/Tyr phosphoproteome implicated in a wide variety of cellular processes. Proteomics, **6** (7):2157-73.
- Li M. et al.** (2009). Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PNAS **106** (14) 5883–5888.
- Lindsay J.A. and Foster S.J.** (1999). Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. Mol. Gen. Genet. **262**: 323-331.
- Lomas-Lopez R, Paracuellos P, Riberty M, Cozzone AJ, Duclos B.** (2007). Several enzymes of the central metabolism are phosphorylated in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett, **272** (1):35-42.
- Ludwig H, Rebhan N, Blencke HM, Merzbacher M, Stülke J.** (2002). Control of the glycolytic gapA operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation. Mol Microbiol, **45** (2):543-53.
- Lundstrom T. S. & Sobel J. D.** (2004). Antibiotics for gram-positive bacterial infections: vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and daptomycin. Infect. Dis. Clin. North Am., **18** (3): 651-668.
- Luong T. T., Lee C. Y.** (2006). The arl locus positively regulates *Staphylococcus aureus* type 5 capsule via an *mgrA*-dependent pathway. Microbiology, **152** (Pt 10):3123-31.
- Macek B., et al.** (2007). The Serine/Threonine/Tyrosine Phosphoproteome of the Model Bacterium *Bacillus subtilis*. Mol Cell Proteomics, **6**: 697–707.
- Macek B., et al.** (2008). Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. Mol Cell Proteomics, **7** (2):299-307.
- Madec E., Laszkiewicz A., Iwanicki A., et al.** (2002). Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. Mol. Microbiol., **2**: 571-586.
- Manning G, Plowman G. D, Hunter T, Sudarsanam S.** (2002). Evolution of protein kinase signalling from yeast to man. Trends Biochem Sci, **27** (10):514-20. *Review*.

- Martins A. & Cunha Mde L.** (2007). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. Microbiol Immunol, **51**(9):787-95.
- McCarty J. S., Walker G.C.** (1994). DnaK mutants defective in ATPase activity are defective in negative regulation of the heat shock response: expression of mutant DnaK proteins results in filamentation. J Bacteriol, **176** (3):764-80.
- McDougal L. K., Steward C. D., et al.** (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol, **41**(11):5113-20.
- Mijakovic I., et al.** (2002). Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: a relic of early life? Proc Natl Acad Sci U S A **99** (21) :13442-7.
- Miller D., Urdaneta V., Weltman A., et al.** (2002a). Public health dispatch: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania, 2002. Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report, **51**: 902.
- Miller M., Donat S., Rakette S., et al.,** (2009). Identification of staphylococcal PknB as a first prokaryotic representative of the proline-directed kinases. *In Vorbereitung*.
- Molle V., Kremer L., Girard-Blanc C. et al.** (2003). An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. Biochem, **42**: 15300-15309.
- Mongodin E., Finan J., Climo M.W., et al.** (2003). Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to Vancomycin. J. Bacteriol., **185** (15): 4638-4643.
- Morgan A, Cofer C, Stevens D. L.** (2009). Iclaprim: a novel dihydrofolate reductase inhibitor for skin and soft tissue infections. Future Microbiol, **4** (2):131-44.
- Munoz-Dorado J., Inouye S. and Inouye M.** (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. Cell, **67** (5): 995-1006.
- Navarro L, Koller A, et al.** (2007). Identification of a molecular target for the Yersinia protein kinase A. Mol Cell, **26** (4):465-77.
- Niebisch A., Kabus A., Schultz C., Weil B., Bott M.** (2006). Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. J Biol Chem, **281** (18):12300-7.
- Norris V, Baldwin TJ, et al.** (1991). A protein kinase C-like activity in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, **5** (12):2977-81.
- Nováková L., Saskova L., Pallova P. et al.** (2005). Charakterization of eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein Phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. FEBS J, **272**: 1243-1254.
- Novick R.** (2003a). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol. Micro, **48**: 1429-1449.
- Novick R. & Muir T. W.** (1999). Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other gram-positive bacteria. Curr Opin Microbiol, **2**: 40-45.
- Obuchowski M., Madec E., et al.** (2000). Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a member of the PPM phosphatase family. J Bacteriol, **182** (19):5634-8.

- O'Hare H. M. et al.** (2008). Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. Mol Microbiol, **70** (6):1408-23.
- Otto M.** (2009). Understanding the epidemic of community-associated MRSA and finding a cure: are we asking the right questions? Expert Rev Anti Infect Ther. **7**(2):141-3. *Review.*
- Oudot C, Cortay J. C, Blanchet C, et al.** (2001). The "catalytic" triad of isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase from *E. coli* and its relationship with that found in eukaryotic protein kinases. Biochemistry, **40** (10):3047-55.
- Pallen M., Chaudhuri R. & Khan A.** (2002). Bacterial FHA domains: Neglected players in the phospho-threonine signalling game? Trends Microbiol., **10**: 556-563.
- Papp-Wallace K.M, Maguire M.E.** (2006). Manganese transport and the role of manganese in virulence. Annu Rev Microbiol, **60**:187-209.
- Parikh A., et al.** (2009). PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase, modulates its acetyltransferase activity. J Mol Biol, **386** (2):451-64.
- Pfaffl M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, **900** (29): 2002-2007
- Pohl K, et al.** (2009). CodY in *Staphylococcus aureus*: a regulatory link between metabolism and virulence gene expression. J Bacteriol, **191** (9):2953-63.
- Poncet S., et al.** (2004). HPr kinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. Biochim Biophys Acta, **1697**(1-2):123-35. *Review.*
- Postma P. W., Lengeler J. W., Jacobson G. R.** (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol Rev, **57** (3):543-94. *Review.*
- Projan S. J.** (2000). Antibiotic resistance in the Staphylococci. Gram-positive Pathogens. ASM press, ed. by V. A. Fischetti *et al.*: 463-470.
- Pullen K. E., Ng H. L., Sung P. Y., Good M. C., et al.** (2004). An alternate conformation and a third metal in PstP/Ppp, the *M. tuberculosis* PP2C-Family Ser/Thr protein phosphatase. Structure, **12** (11):1947-54.
- Raggiaschi R, Gotta S, Terstappen G. C.** (2005). Phosphoproteome analysis. Biosci Rep, **25** (1-2):33-44. *Review.*
- Rajagopal L., Clancy A. & Rubens C. E.** (2003). A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylates an inorganic pyrophosphatase and affects growth, cell segregation, and virulence. J. Biol. Chem., **278** (16): 14429-14441.
- Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A, Rubens C. E.** (2005). Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. Mol Microbiol, **56** (5):1329-46.
- Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A, Rubens C. E.** (2006). Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. Mol Microbiol, **62** (4):941-57.
- Ravichandran A, et al.** (2009). Ser/Thr/Tyr phosphoproteome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas* species. Proteomics, **9** (10):2764-2775.
- Rice K. C., & Bayles K. W.** (2003). Death's toolbox: examining the molecular components of bacterial programmed cell death. Mol. Microbiol. **50**:729-738.

- Robinson D. A. and Enright M. C.** (2004). Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Inf. Disease, **10**: 92-97.
- Schneider P, Hawser S, Islam K.** (2003). Iclaprim, a novel diaminopyrimidine with potent activity on trimethoprim sensitive and resistant bacteria. Bioorg Med Chem Lett, **13** (23):4217-21.
- Shah I. M., et al.** (2008). A Eukaryotic-like Ser/Thr Kinase Signals Bacteria to Exit Dormancy in Response to Peptidoglycan Fragments. Cell, **135**, 486–496.
- Sharma K., Chandra H., Gupta P. K., et al.** (2004). PknH, a transmembrane Hank's type serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis* is differentially expressed under stress conditions. FEMS.Microbiol. Letters, **233**: 107-113.
- Shi L., Potts M. & K. P.J.** (1998). The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. FEMS Microbiol. Reviews, **22**: 229-253.
- Singh K. D., Halbedel S., Görke B., Stülke J.** (2007). Control of the phosphorylation state of the HPr protein of the phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*: implication of the protein phosphatase PrpC. J Mol Microbiol Biotechnol, **13**(1-3):165-71.
- Sinha B. & Herrmann M.** (2005). Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. Thromb Haemost. **94**(2):266-77.
- Somerville G.A, Proctor R.A.** (2009). At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. Microbiol Mol Biol Rev. **73**(2):233-48.
- Soufi B, et al.** (2008). The Ser/Thr/Tyr phosphoproteome of *Lactococcus lactis* IL1403 reveals multiply phosphorylated proteins. Proteomics, **8** (17):3486-93.
- Stock J.B., Ninfa A. J. & Stock A.** (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol Rev, **53**: 450-490.
- Streker K** (2005). Charakterisierung neuer Zielstrukturen für die Antibiotikatherapie gegen *Staphylococcus aureus* und Entwicklung eines konditionalen In-vivo-Expressionssystems. Dissertation
- Stülke J., Hillen W.** (1998). Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. Naturwissenschaften, **85** (12):583-92. *Review*.
- Treuner-Lange A, Ward M. J., Zusman D. R.** (2001). Pph1 from *Myxococcus xanthus* is a protein phosphatase involved in vegetative growth and development. Mol Microbiol, **40** (1):126-40.
- Truong-Bolduc Q. C., Ding Y, Hooper D. C.** (2008). Posttranslational modification influences the effects of MgrA on norA expression in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, **190** (22):7375-81.
- Tsiodras S, et al.** (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. Lancet, **358** (9277): 207-8.
- Tusher V. G., Tibshirani R., & Chu G.** (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **98**:5116-5121.
- Udo H., Munoz-Dorado J., Inouye M., et al.** (1995). *Myxococcus xanthus*, a gram-negative bacterium, contains a transmembrane protein serine/threonine kinase that blocks the secretion of beta-lactamase by phosphorylation. Genes Dev, **9** (8): 9972-983.

- Utaida S., et al.** (2003). Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. Micriobiol., **149**: 2719-2732.
- Vandensch F., et al.** (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Paton-Valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. Emerg Infect Dis **9**: 978-984.
- Vijay K, Brody M. S., Fredlund E, Price C. W.** (2000). A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the sigmaB transcription factor of *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. **35** (1):180-8.
- Vincent C., Duclos B., Grangeasse C., et al.** (2000). Relationship between exopolysaccharide production and protein-tyrosine phosphorylation in gram-negative bacteria. J Mol Biol. **304** (3):311-21.
- Walburger A, et al.** (2004). Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. Science. **304** (5678):1800-4.
- Wang J. Y., Koshland D. E. Jr.** (1981). The identification of distinct protein kinases and phosphatases in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. J Biol Chem., **256** (9):4640-8.
- Wardenburg J. B., et al.** (2008). Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. J Infect Dis **198**: 1166-1170.
- Weber J. T.** (2005). Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Infec. Diseases. **41**: 269-272.
- Wera S., Hemmings B. A.** (1995). Serine/threonine protein phosphatases. Biochem J., **311** (Pt 1):17-29.
- Wiley D. J., et al.** (2006). The Ser/Thr kinase activity of the Yersinia protein kinase A (YpkA) is necessary for full virulence in the mouse, mollifying phagocytes, and disrupting the eukaryotic cytoskeleton. Microb Pathog. **40** (5):234-43.
- Wilkinson B. J., Muthaiyan A., & Jayaswal R. K.** (2005). The cell wall stress stimulon of *Staphylococcus aureus* and other gram-positive bacteria. Curr. Med. Chem. Anti-Infect. Agents. **4**:259-276.
- Witte W, Braulke C, Cuny C, Heuck D, Kresken M.** (2001). Changing pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from German hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol; **22**(11): 683-6.
- Yang X, Kang C. M., Brody M. S., Price C. W.** (1996). Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. Genes Dev. **10** (18):2265-75.
- Yarwood J. M., McCormick J. K., Schlievert P. M.** (2001). Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol **183**: 1113-1123.
- Yeats C., Finn R. D. & Bateman A.** (2002). The PASTA domain: a  $\beta$ -lactam-binding domain. TRENDS Biochem. Sciences. **27** (9): 438-440.
- Zhang W., Inouye M. & Inouye S.** (1996). Reciprocal regulation of the differentiation of *Myxococcus xanthus*. Mol. Microbiol. **23**: 459-471.

**Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., et al.** (2005). Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol **43**:5026–33.

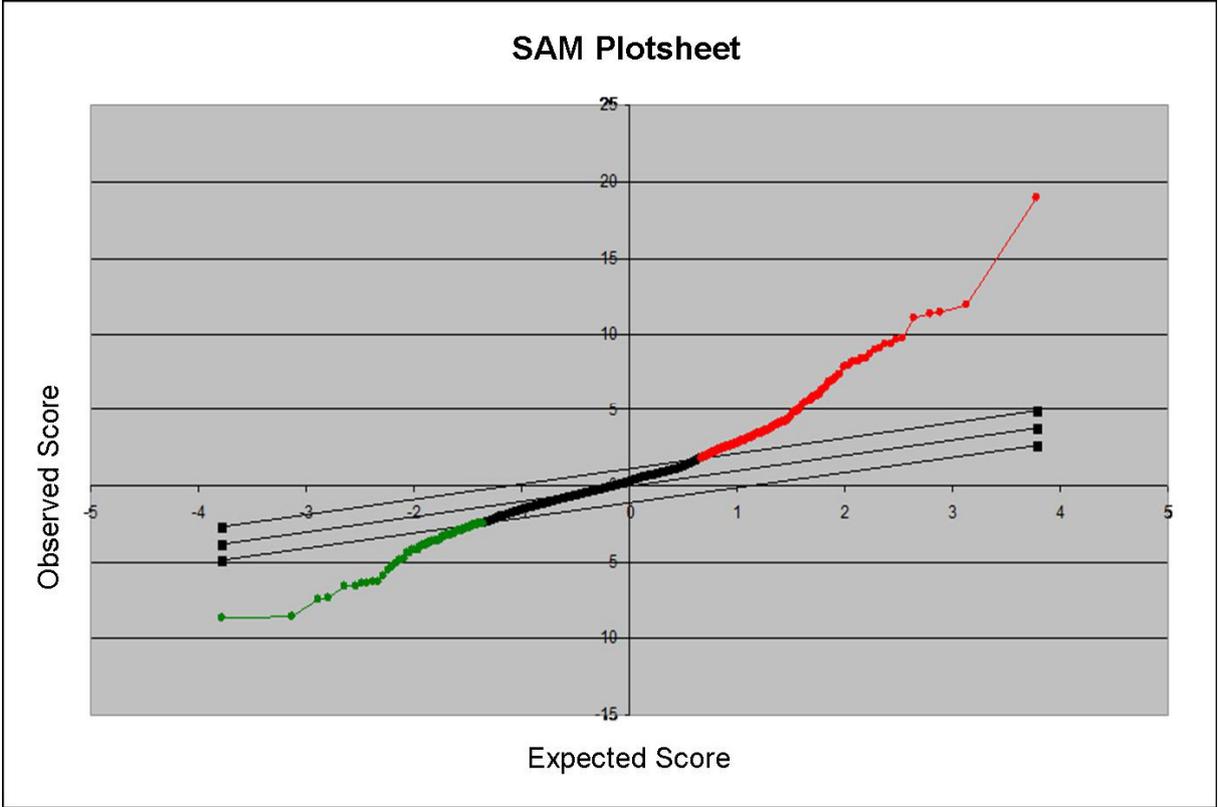
**Zheng J, He C, Singh V. K, Martin N. L, Jia Z.** (2007). Crystal structure of a novel prokaryotic Ser/Thr kinase and its implication in the Cpx stress response pathway. Mol Microbiol, **63** (5):1360-71.

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	ORF	Offener Leserahmen ("open reading frame")
AS	Aminosäuren	PBP	Penicillin-Bindeprotein
ATP	Adenin-5'-triphosphat	PCR	„Polymerase Chain Reaction“
bp	Basenpaare	PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft
BSA	Bovines Serum Albumin	pH	pH-Wert
bzw.	beziehungsweise	PVL	Panton-Valentine Leukocidin
CDM	chemisch definiertes Medium	RNA	Ribonukleinsäure
cDNA	„copy“-DNA	RNase	Ribonuklease
CFU	Koloniebildende Einheit	rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
D-Ala	D-Alanin	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
d.h.	das heißt	RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
DNase	Desoxyribonuklease	s	Sekunde
dsDNA	doppelsträngige DNA	SDS	Natriumdodecylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	s.o.	siehe oben
DTT	Dithiothreitol	sog.	sogenannt
EARSS	„European Antimicrobial Resistance Surveillance System“	ssDNA	einzelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintertraacetat	SSC	Standard Saline Citrate
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)	STPK	Serin/Threonin- Proteinkinase
EtBr	Ethidiumbromid	STPP	Serin/Threonin- Proteinphosphatase
EtOH	Ethanol	t	Zeit
g	Gramm	Tab.	Tabelle
GERMAP	Antibiotika-Resistenzatlas "GERMAP"	TAE	Tris-Acetat-EDTA
h	Stunde	Target	<i>engl.</i> : Ziel, hier Zielgen oder Angriffsziel
kb	Kilobasen	TCA	Zitratzyklus
kDa	Kilodalton	TCS	Zweikomponenten-System
l	Liter	TE	Tris-EDTA
LB	Luria-Bertani	TRIS	Trishydroxymethyl- aminomethan
M	molar	U	Unit
mA	Milliampere	u.a.	unter anderem
mg	Milligramm	ÜN	über Nacht
MHK	minimale Hemmkonzentration	ÜNK	Übernachtkultur
min	Minuten	V	Volt
ml	Milliliter	W	Watt
mM	Millimolar	WT	Wildtyp
mRNA	„messenger“-RNA	z.B.	zum Beispiel
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus	z.T.	zum Teil
nt	Nukleotide		
µg	Mikrogramm		
µl	Mikroliter		
ng	Nanogramm		
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge		

**8.2 SAM-Plot der Transkriptom-Analyse 8325 $\Delta$ *pknB* mittels SAM („sigificance analysis of microarray“)**



## Publikationen

**Donat S., Streker K., Schirmeister T., Rakette S., Stehle T., Liebeke M., Lalk M., & Ohlsen K.** (2009). Transcriptome and functional analysis of the eukaryotic-type ser/thr kinase PknB in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.*, **191**(13): 4056-4069.

**Jelsbak L., Hemmingsen L., Donat S., Knut O., Boye K., Westh H., Ingmer H., & Frees D.** (2009). Growth phase dependent regulation of the global virulence regulator Rot in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *accepted Ms. Ref. No.:* IJMM-D-09-00048R1

**Miller M., Donat S., Rakette S., Stehle T., Diks S., Peppelenbosch M. P., van Dijk J. M. & Ohlsen K.** Identification of staphylococcal PknB as a first prokaryotic representative of the proline-directed kinases. *In Vorbereitung.*

**Donat S. und Ohlsen K.** (2009). The impact of serine and threonine phosphorylation in *Staphylococcus aureus*. Review. *Eingereicht.*

## Tagungsbeiträge

**Donat, S.** (2006). Characterization of a eucaryotic-like regulatory protein kinase of *Staphylococcus aureus*. Kurzvortrag Kloster Banz.

**Donat, S., Ziebuhr W. & Ohlsen K.** (2006). DT4-„Genome-based identification and evaluation of new targets against pathogenic staphylococci“. Kurzvortrag bei Foringen-Treffen an der LMU-München.

**Donat, S.** (2007). Transcriptome and Phosphoproteome studies to investigate the role of a ser/thr kinase of *S. aureus*. Kurzvortrag Wittenberg.

**Donat, S., Ohlsen K.** (2007). Phosphoproteome studies to characterize the serine/threonine protein kinase of *S. aureus*. Kurzvortrag bei Tagung des TRR34-Pathophysiologie von Staphylokokken in der Post-Genom-Ära, Naturschutzakademie der Insel Vilm.

**Donat S., Streker K. & Ohlsen K.** (2006). First characterization of a serine/threonine kinase of *Staphylococcus aureus*. Posterpräsentation der Jahrestagung der DGHM, Würzburg.

**Donat S., Streker K. & Ohlsen K.** (2007). Proteomic identification of *Staphylococcus aureus* kinase substrates. Posterpräsentation der Jahrestagung der DGHM, Göttingen.

**Donat S., Streker K. & Ohlsen K.** (2007). Characterization of ser/thr kinase PknB of *S. aureus*. Posterpräsentation des Young Investigator-Symposium in Würzburg.

**Donat S., Streker K., Fuchs S., Engelmann S. & Ohlsen K.** (2007). Identification of a new signal transduction system of *Staphylococcus aureus*. Posterpräsentation der Gordon Research Conference: Staphylococcal Diseases, Les Diablerets, Schweiz.

**Donat S., Fuchs S., Engelmann S., Becher D. & Ohlsen K.** (2008). The serine/threonine kinase PknB and its cognate phosphatase Stp of *Staphylococcus aureus*. Posterpräsentation der Jahrestagung der DGHM, Dresden.

**Donat S., Fuchs S., Engelmann S., Becher D. & Ohlsen K.** (2008). Insights in the function and role of PknB-a serine/threonine kinase of *Staphylococcus aureus*. Posterpräsentation der Tagung des TRR34-Pathophysiologie von Staphylokokken in der Post-Genom-Ära, Kloster Banz.