

**Studien zum Wirkungsmechanismus neuer antiinfektiver Bisnaphthalimide  
gegen *Staphylococcus aureus* und Transkriptomanalysen zur Auswirkung von  
Antibiotika auf *S. epidermidis***

**Mode-of-action studies of novel antiinfective bisnaphthalimides on  
*Staphylococcus aureus* and transcriptional analysis of the effect of  
antibiotics on *S. epidermidis***



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

vorgelegt von

**Thomas Michael Menzel**

aus

München

**Würzburg im Februar 2011**

Eingereicht am: 24.02.2011

Mitglieder des Promotionskomitees

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: PD Dr. Knut Ohlsen
2. Betreuer: PD Dr. Heike Bruhn
3. Betreuer: PD Dr. Wilma Ziebuhr

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

# Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2007 bis Februar 2011 am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg angefertigt.

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

Weiterhin versichere ich, dass diese Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Außer dem Titel *Diplom Biologe (Univ.)* habe ich bisher keine anderen akademischen Titel erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 24.02.2011



# Danksagung

Viele Personen standen mit zur Zeit meiner Doktorarbeit hilfreich zur Seite. Diesen möchte ich hiermit ganz herzlich danken. Im Speziellen sind dies:

**PD Dr. Knut Ohlsen, PD Dr. Heike Bruhn** und **PD Dr. Wilma Ziebuhr** für die Betreuung, die Übernahme der Gutachten sowie zahlreiche richtungsweisende aber auch manch kritische Diskussionen

**Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe** und **Maximilian Tischer** für die Synthese der neuen hier bearbeiteten Substanzen und für projektbezogene Diskussionen

Unseren Kooperationspartnern **Dr. Patrice François** und **Prof. Dr. Jacques Schrenzel** aus Genf, **Prof. Dr. Hans-Georg Sahl** aus Bonn und **Dr. Joachim Nickel** aus Würzburg für die gute und ergebnisreiche Zusammenarbeit

**Prof. Dr. Sven Hammerschmidt** und **Dr. Claudia Rennemeier** für die Bereitstellung der *Streptococcus*-Stämme

Den **Mitarbeitern** und **Mitarbeiterinnen** des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie und des Zentrums für Infektionsforschung für die angenehme Arbeitsatmosphäre, sowie für die Hilfestellung im Labor bei neuen und alten Fragestellungen

**Freunde** und **Familie**. Mein Dank hierbei geht neben **Würzburg** vor allem nach **Burghausen, Heidelberg, Mannheim, München, Regensburg** und **Urbana-Champaign**



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>5</b>
<b>Summary.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1 Geschichte der Antibiotika-Entwicklung.....	9
1.2 Bakterielle Resistenzmechanismen .....	12
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> als Antibiotika-resistentes Pathogen .....	13
1.4 Derzeitige und zukünftige Strategien zur Behandlung von MRSA-Infektionen .....	16
1.5 Entwicklung von Naphthalimiden .....	18
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit .....	19
<b>2. Material .....</b>	<b>21</b>
2.1 Allgemeines .....	21
2.2 Medien und Agar .....	21
2.3 Reagenzien.....	22
2.4 Enzyme.....	22
2.5 Antibiotika .....	23
2.6 Oligonukleotide .....	24
2.7 Geräte .....	25
2.8 Bakterienstämme.....	26
<b>3. Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1 Gefrierkulturen .....	29
3.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) .....	29
3.3 Untersuchung des bakteriellen Wachstums .....	29
3.3.1 Absterbekinetik .....	29
3.3.2 Autolyse.....	30
3.4 Bildgebende Verfahren .....	30
3.4.1 Lebend-Tot-Färbung.....	30
3.4.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	31
3.4.3 Fluoreszenzmikroskopie .....	31
3.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	32

3.5.1 Isolation von Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Staphylokokken .....	32
3.5.2 Isolation von DNA aus Gram-negativen Bakterien .....	32
3.5.3 Isolation von DNA aus eukaryotischen Zellen .....	33
3.5.4 Isolation, Aufreinigung und Fällung von bakterieller Ribonukleinsäure (RNA) .....	33
3.5.5 Synthese von komplementärer DNA (cDNA) für Transkriptom-Analysen.....	34
3.5.6 Transkriptom-Analyse .....	35
3.5.7 Synthese von komplementärer DNA für semiquantitative RT-PCR.....	36
3.5.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	36
3.5.9 Agarose-Gelelektrophorese .....	37
3.5.10 Sequenzierung.....	37
3.6 Radioaktive Zellmarkierung .....	38
3.7 Bindungsstudien .....	39
3.7.1 Verdrängungsversuche.....	39
3.7.2 Gelretardation .....	39
3.7.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz .....	39
3.8 Zytotoxizitätstest .....	41
3.9 Versuche zur intrazellulären Wirksamkeit von MT02.....	41
3.10 In vivo-Untersuchungen.....	42
3.10.1 Toxizitätsstudien .....	42
3.10.2 Wirksamkeitsstudien .....	42
3.11 Erzeugung MT02-resistenter Stämme .....	43
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
4.1 Studien zu Wirkung und Wirkungsmechanismus von MT02 .....	45
4.1.1 Bestimmung von Minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) .....	45
4.1.2 Killing-Eigenschaften von MT02 .....	49
4.1.3 Einfluss von MT02 auf die Autolyse von <i>S. aureus</i> HG001 .....	52
4.1.4 Transmissionselektronenmikroskopie von <i>S. aureus</i> HG001 nach Behandlung mit MT02 .....	53
4.1.5 Einfluss von MT02 auf die Synthese von DNA, RNA und Proteinen .....	54
4.1.6 Auswirkungen von MT02 auf das Transkriptom von <i>S. aureus</i> HG001 .....	56
4.1.7 Validierung der Transkriptomanalysen von <i>S. aureus</i> HG001 und MT02.....	60
4.1.8 Auswirkungen von MT109 auf das Transkriptom von <i>S. aureus</i> HG001 .....	60
4.1.9 Untersuchungen zur Wechselwirkung von MT02 mit DNA.....	63
4.1.10 Oberflächen Plasmon Resonanz .....	69
4.1.11 Zytotoxizität von MT02 .....	70
4.1.12 Wirkung von MT02 auf intrazelluläre <i>S. aureus</i> .....	70
4.1.13 Studien zur Zellgängigkeit von MT02 mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	72
4.1.14 MT02 im murinen Nierenabszessmodell.....	74
4.2 Charakterisierung einer MT02-resistenten Mutante.....	77
4.2.1 Generierung MT02-resistenter Stämme .....	77
4.2.2 Verifizierung der MT02-resistenten Mutante als <i>S. aureus</i> HG001 <sup>R</sup> .....	78
4.2.3 Kreuzresistenzen von <i>S. aureus</i> HG001 <sup>R</sup> .....	78
4.2.4 Einfluss von MT02 auf die Autolyse von <i>S. aureus</i> HG001 <sup>R</sup> .....	80
4.2.5 Auswirkungen von MT02 auf das Transkriptom von <i>S. aureus</i> HG001 <sup>R</sup> .....	81
4.2.6 Validierung der Transkriptomanalysen von <i>S. aureus</i> HG001 <sup>R</sup> mit MT02 .....	84

4.2.7 Versuche zur Identifizierung des roten Farbstoffs .....	84
4.3 Erstellung von Transkriptomprofilen von <i>S. epidermidis</i> zur Charakterisierung von Wirkungsmechanismen neuer Antibiotika .....	86
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>93</b>
5.1 Wirkungsspektrum von MT02 .....	93
5.2 Studien zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen .....	94
5.3 Primärer Wirkungsmechanismus von MT02.....	95
5.4 Sekundärer Wirkungsmechanismus von MT02 .....	97
5.5 Zytotoxizität und in vivo-Aktivität von MT02 .....	99
5.6 Resistenzmechanismus von <i>S. aureus</i> HG001 <sup>R</sup> .....	101
5.7 Vergleichende Transkriptomstudien mit <i>S. epidermidis</i> .....	106
5.8 Ausblick.....	109
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>119</b>
7.1 Datensätze der Microarray-Analysen .....	119
7.2 Publikation und Tagungsbeiträge .....	183



## Zusammenfassung

Die Therapie von bakteriellen Infektionen beruht heutzutage zum Großteil auf dem Einsatz von Antibiotika. Die schnelle Entwicklung und rasche Verbreitung von resistenten Stämmen mancher Erreger gegen diese Antibiotika stellt ein enormes Problem für das Gesundheitswesen dar. Da momentan zur Antibiotikatherapie keine Alternativen bestehen, kommt der Erforschung neuer potenzieller Wirkstoffe eine sehr große Bedeutung zu.

In einem Screening-Verfahren lagen die minimalen Hemmkonzentrationen einiger bisquartärer Bisnaphthalimide gegen *Staphylococcus aureus* und *S. epidermidis* im Bereich von 0,6 bis 2,5 µg/ml. Die Substanz mit den geringsten minimalen Hemmkonzentrationen war MT02. Daraufhin wurde das Wirkungsspektrum von MT02 gegen Bakterien detaillierter untersucht und gefunden, dass die Substanz vorwiegend gegen Gram-positive Erreger und nicht gegen Gram-negative Bakterien wirksam ist. Zytotoxizitätstests ergaben eine geringe bis nicht nachweisbare Toxizität gegen verschiedene Zelllinien im Bereich von 73 bis mehr als 150 µg/ml. Um die Wirkungsweise von MT02 genauer zu untersuchen wurden zunächst DNA-Microarray-Untersuchungen an *S. aureus* durchgeführt. Deren Ergebnisse ließen einen Einfluss der Substanz auf viele Gene des DNA-Metabolismus erkennen. Inkorporationsstudien mittels radioaktiver Ganzzellmarkierung bestätigten die Auswirkung von MT02 auf den DNA-Stoffwechsel. Durch kompetitive Inkubation wurde festgestellt, dass MT02 in der Lage ist Ethidiumbromid von DNA zu verdrängen bzw. dessen Bindung zu verhindern. Genauere Untersuchungen mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz ergaben, dass MT02 konzentrationsabhängig, reversibel und sequenzspezifisch an DNA bindet. Die thermodynamischen Dissoziationskonstanten lagen im Mittel bei ca.  $4 \times 10^{-8}$  mol/l und beschrieben somit eine relativ starke Bindung von MT02 an DNA. Neben diesem primären Wirkungsmechanismus der DNA-Bindung gaben mehrere Befunde Hinweise auf einen sekundären Wirkmechanismus, der die Zellwand-Struktur bzw. Zellwand-Biosynthese beinhaltet.

Eine MT02-resistente Mutante von *S. aureus* HG001 konnte durch vielfaches Passagieren in MT02-haltigem Medium generiert werden. Diese erzeugte bei Wachstum mit hohen Konzentrationen an MT02 einen roten Phänotyp. Die Natur dieses roten Farbstoffes konnte bislang nicht aufgeklärt werden, jedoch gibt es Hinweise, dass dieser auf Abbauprodukte von MT02 zurückzuführen ist.

In einem weiteren Projekt wurde mittels Transkriptionsstudien die Auswirkung von verschiedenen bekannten Antibiotika sowie von neuen Wirkstoffen auf das Transkriptom von *S. epidermidis* untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien können durch vergleichende Analysen als Grundlage für die Einordnung des Wirkmechanismus neuer Substanzen dienen.



## Summary

The treatment of bacterial infections is nowadays mostly accomplished by the application of antibiotics. However, the rapid development and vast distribution of resistant strains of some pathogens against a variety of antibiotics form an enormous challenge for public health care systems worldwide. As until now there are no applicable alternatives to antibiotic therapy against most pathogens, there is an urgent need for the discovery of new antibacterial substances.

Screening several newly synthesized compounds, the minimal inhibitory concentrations of some bisquaternary bisnaphthalimides ranged from 0.6 to 2.5 µg/ml against *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*. Thereof one substance, designated MT02, revealed the lowest minimal inhibitory concentrations of this compound class. Following these susceptibility tests, the antibacterial spectrum of MT02 was determined and revealed a broad spectrum against Gram-positive bacteria but almost no activity against Gram-negative species. In cytotoxicity tests with several cell lines MT02 exhibited low or undetectable toxicity in concentrations ranging from 73 to more than 150 µg/ml. Microarray studies were conducted to further elucidate the mode of action of MT02 against *S. aureus*. The results suggested that MT02 has an impact on the bacterial DNA-metabolism. To verify this, radioactive whole cell labeling experiments were performed which clearly provided evidence for the inhibition of incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine into bacteria by MT02 and thus for an interference of MT02 with DNA-metabolism. Coincubation and gel retardation studies showed that MT02 is able to directly interact with DNA and to displace ethidiumbromide which has intercalated into the DNA before. Surface plasmon resonance experiments pinpointed the binding of MT02 to doublestranded DNA and revealed binding constants in the range of  $4 \times 10^{-8}$  mol/l describing a strong binding affinity of MT02 to DNA. In addition to this primary mode of action, several results suggested a secondary mode of action comprising the structure and / or the biosynthesis of the bacterial cell wall.

By passaging *S. aureus* HG001 in broth with increasing concentrations of MT02, a MT02-resistant mutant could be obtained. This mutant produced a red phenotype when grown with high concentrations of MT02. Studies to determine the nature of this red dye are still in progress. However, first results indicate that the red color is a degradation product of MT02.

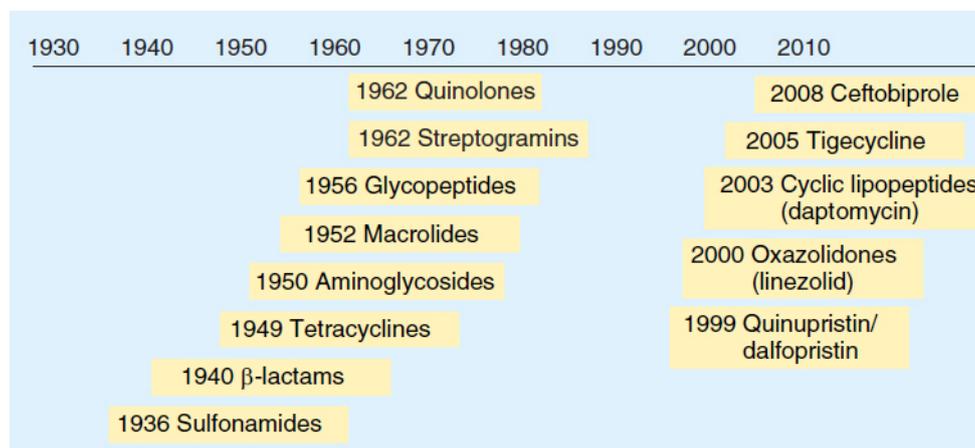
Another project dealt with the comparative analysis of transcriptomes of *S. epidermidis* under the influence of antibiotics with known modes of action as well as new active compounds. The results of these studies can be the basis for the assignment of new antibacterial substances to classes of antibiotics with known modes of action.



# 1. Einleitung

## 1.1 Geschichte der Antibiotika-Entwicklung

Ende des neunzehnten Jahrhunderts isolierte der italienische Arzt Bartolomeo Gosio Mycophenolsäure aus einem Pilz der Gattung *Penicillium* und erkannte das Potenzial dieser Substanz, das Wachstum von *Bacillus anthracis* zu hemmen. Spätere Studien von Florey *et al.* bestätigten die biologische Aktivität von Mycophenolsäure gegen mehrere pathogene Pilze, aber auch gegen *Staphylococcus aureus* (Florey *et al.*, 1946). Die Entdeckung von Gosio kann als die erste ihrer Art angesehen werden und legte somit den Grundstein für die Forschung an antibakteriellen Substanzen. Nach diesen Pionierarbeiten und der Erkenntnis, dass bestimmte Organismen Substanzen produzieren, die das Wachstum anderer Organismen hemmen können, kam es zur Entdeckung bzw. Synthese weiterer Stoffe, die bakterielles Wachstum unterbinden können. Die Arbeiten von Paul Ehrlich an arsenhaltigen Substanzen stellen dabei wohl die ersten systematischen Untersuchungen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen verschiedener Derivate einer bestimmten Ausgangssubstanz dar (Ehrlich, 1913). Die aktivste Substanz dieser Klasse war „Ehrlich 606“, später Salvarsan genannt, welches erfolgreich zur Behandlung von Syphilis eingesetzt wurde und teilweise nach einmaliger Anwendung eine vollständige Genesung der Patienten erzielte (Montgomery, 1911; Morris, 1912). Eine Übersicht der seither eingeführten antibakteriellen Substanzklassen gibt Abbildung 1.1.



**Abbildung 1.1:** Zeitpunkt der Einführung neuer Antibiotikaklassen zur Behandlung von Infektionskrankheiten (Ohlsen, 2009)

Sulfonamide waren die ersten Substanzen mit antibakterieller Wirkung, welche Ende der 1930er Jahre in der Medizin Verwendung fanden. So wurde Sulfapyridin als erstes therapeutisches Sulfonamid ab 1938 erfolgreich gegen Lungenentzündung eingesetzt (Plummer, Ensworth, 1939). Sulfonamide inhibieren die Folsäuresynthese von Bakterien (Brown, 1962). Folsäure ist essentiell für

die Nukleotidsynthese und wird von Bakterien selbst synthetisiert. Menschen nehmen diesen Stoff jedoch über die Nahrung auf, weshalb eine Inhibition von Enzymen der Folsäuresynthese bakterizid wirkt, dem Menschen jedoch nicht schadet. Noch heute werden beispielsweise Sulfamethoxazol und Trimethoprim, welche die Dihydropteroat-Synthase bzw. die Dihydrofolat-Reduktase hemmen, als Kombinationspräparat therapeutisch eingesetzt (Pappas, 2009).

1929 wurde mit der Entdeckung des Penicillins erstmals ein  $\beta$ -Lactam als Antibiotikum beschrieben (Fleming, 1929), welches in die Zellwandsynthese der Bakterien eingreift (Park, Strominger, 1957). Penicillin G war der erste ab den 1940 Jahren kommerziell eingesetzte Vertreter dieser Gruppe und wurde zunächst aus dem Pilz *Penicillium notatum* isoliert (Abraham *et al.*, 1941). Die Wirkung dieser Stoffklasse beruht auf dem namensgebenden  $\beta$ -Lactam-Ring dieser Substanzen. Diese aktive Gruppe bindet durch Ringöffnung das bakterielle Enzym D-Alanin-Transpeptidase und inaktiviert dieses (Izaki *et al.*, 1966). Dadurch können keine Quervernetzungen in der Peptidoglycan-Schicht ausgebildet werden, wodurch sich teilende Bakterien keine intakte Zellwand synthetisieren können und somit absterben. Da die Zellwand von Bakterien einen von der Hülle eukaryotischer Zellen grundsätzlich verschiedenen Aufbau besitzt, wirken diese Substanzen ebenfalls nur gegen Bakterien und nicht gegen den Menschen. Neben dieser ersten Substanz Penicillin wurden im Lauf der Zeit sehr viele aktive  $\beta$ -Lactame gefunden bzw. entwickelt, so dass diese Antibiotikagruppe eine sehr große Diversität aufweist. Als bedeutender Vertreter sind dabei noch Oxacillin und dessen Derivate erwähnenswert, welche heute noch teilweise in der Therapie gegen anderweitig resistente Erreger eingesetzt werden. Eine weitere Gruppe Zellwand-aktiver Antibiotika stellen die Glycopeptide dar, deren bekanntester Vertreter Vancomycin ist. Vancomycin wurde Mitte der 1950er Jahre entdeckt und bei Infektionen durch  $\beta$ -Lactam-resistente Gram-positive Erreger eingesetzt (Davis *et al.*, 1958). Glycopeptide bilden einen Komplex mit D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen der Zellwand. Dadurch können keine Quervernetzungen innerhalb des Peptidoglycangerüsts mehr geknüpft werden, wodurch die Zellwand nicht stabil genug ist, um den osmotischen Druck der Zelle zu beherrschen (Perkins, 1969). Dies führt zur Lyse und somit zum Tod der Bakterien. Zusätzlich erwähnenswert ist die Substanz Fosfomycin, welche seit 1970 in der Therapie eingesetzt wird. Dieses Molekül inhibiert das Enzym MurA, welches den ersten Schritt der Mureinbiosynthese katalysiert (Kahan *et al.*, 1974). Da durch diese Bindung ebenfalls keine intakten Zellwände mehr synthetisiert werden können, wirkt Fosfomycin ebenfalls bakterizid.

Neben den Zellwand-aktiven Substanzen stellt die Klasse der Proteinbiosynthese-Hemmer eine weitere sehr vielfältige Gruppe unter den bislang therapeutisch eingesetzten Antibiotika dar. Die ersten Substanzen waren Tetracycline. Das für diese Gruppen namensgebende Tetracyclin wurde vor allem in den 1950er und 1960er Jahren therapeutisch eingesetzt (Speer *et al.*, 1992). Die Wirkung

von Tetracyclinen beruht hauptsächlich auf der Bindung der 30S Untereinheit der bakteriellen Ribosomen, der Blockierung der dortigen Bindungsstelle für tRNA-Moleküle und somit der Inhibition der Proteinbiosynthese (Goldman *et al.*, 1983). Da die Bakterien dabei nicht getötet werden, sondern lediglich die Synthese neuer Proteine unterbunden wird, besitzen Tetracycline bakteriostatische Wirkung. Weitere Vertreter dieser Klasse sind Doxycyclin und das neuere Tigecyclin. 1950 wurde mit den Aminoglykosiden eine weitere Substanzgruppe gefunden, deren Wirkung auf der Bindung der 30S Untereinheit der Ribosomen beruht. Die primäre Aufnahme dieser Polysaccharide erfolgt sauerstoffabhängig, weshalb Aminoglykoside vorwiegend gegen aerobe Bakterien eingesetzt werden. Nach der Bindung an das bakterielle Ribosom wird die Synthese von Proteinen zwar fortgeführt, jedoch kommt es zu Fehlern während der Synthese, weshalb die produzierten Proteine nicht funktionstüchtig sind (Davis, 1987). Beispiele für Vertreter dieser Substanzklasse sind Gentamicin, Kanamicin und Streptomycin. Weitere zwei Jahre später wurden die Makrolide gefunden. Diese Substanzen binden an die 50S Untereinheit von Ribosomen und inhibieren die Translokation der wachsenden Polypeptidkette, weshalb es zum Abbruch der Proteinsynthese kommt (Davis, 1988). Klinisch relevante Moleküle dieser bakteriostatisch wirkenden Gruppe sind Clarithromycin und Erythromycin. Ab den 1960er Jahren waren zudem Streptogramine für die Behandlung von bakteriellen Infektionen verfügbar, welche vor allem bei Infektionen durch  $\beta$ -Lactam- und Makrolid-resistente Erreger verabreicht wurden. Heute noch relevante Vertreter dieser Gruppe sind Quinupristin und Dalfopristin, welche ab 1999 in der Klinik eingesetzt wurden. Eine weitere Untergruppe der Proteinbiosynthese-Hemmer sind die Oxazolidinone, welche die korrekte Zusammenlagerung von ribosomalen Untereinheiten zum funktionstüchtigen Ribosom unterbinden. Ein Vertreter davon, Cycloserin, wurde ab 1956 für die Behandlung von Tuberkulose eingesetzt (Epstein *et al.*, 1956). Seit 2000 ist zudem das Antibiotikum Linezolid aus dieser Stoffklasse verfügbar (Clemett, Markham, 2000). Linezolid ist eines der wenigen Reserveantibiotika, die für die Behandlung von Infektionen mit Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) eingesetzt werden können. Zudem ist es das einzige gegen MRSA wirksame Antibiotikum, das sowohl intravenös als auch oral verabreicht werden kann.

Eine dritte große Gruppe an Antibiotika mit einheitlichem Wirkungsmechanismus stellt die der DNA-Gyrase-Hemmer dar. Diese Substanzen verhindern durch Bindung an die bakterielle DNA-Gyrase und teilweise zusätzlich an eine oder mehrere Topoisomerasen die für die Replikation essentielle Wirkung dieser Enzyme (Wolfson, Hooper, 1989). Die Replikation der DNA kommt somit zum Erliegen. Neben den Aminocumarinen und Nitroimidazolen sind die meisten Vertreter dieser Klasse den Fluorchinolonen zugehörig. Diese Klasse wird wiederum in mehrere Gruppen unterteilt, deren Wirkstoffe hauptsächlich aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkungsspektren eingeteilt wurden. Die erste Gruppe, wozu Norfloxacin zählt, wurde vorwiegend gegen Harnwegsinfektionen eingesetzt

(Kirby, 1984). Die zweite Gruppe konnte bereits gegen systemische Infektionen angewendet werden, war jedoch wie die erste Gruppe auch vom Wirkungsspektrum vorwiegend auf Gram-negative Bakterien begrenzt. Der bekannteste Vertreter ist Ciprofloxacin, welches ab dem Beginn der 1980er Jahre zur Therapie bakterieller Infektionen eingesetzt wurde (Zeiler, Grohe, 1984). Eine verbesserte Wirksamkeit gegen Gram-positive Erreger wurde mit den Fluorchinolonen der dritten Generation erreicht, darunter Levofloxacin das ab 1993 verfügbar war. Weitere Verbesserungen der generellen Wirksamkeit wurden mit Vertretern der vierten Gruppe erreicht. So bindet Moxifloxacin beispielsweise an zwei Topoisomerasen, was dessen Wirksamkeit deutlich erhöht (Aldridge, Ashcraft, 1997). Zudem konnte das Wirkungsspektrum erweitert werden, da Vertreter der vierten Gruppe gegen weitere Gram-positive sowie zudem gegen einige anaerobe Erreger eingesetzt werden.

Zwei weitere bedeutende Antibiotika, welche aufgrund ihres Wirkungsmechanismus keiner der eben beschriebenen Gruppen zugeordnet werden können, sind Rifampicin und Daptomycin. Rifampicin ist eine bakterizide Substanz, wurde 1957 entdeckt und hemmt die DNA-abhängige RNA-Polymerase (White *et al.*, 1971). Durch diese Inhibition der Transkription können Bakterien keine mRNA und folglich auch keine Proteine mehr produzieren, weshalb sie absterben. Daptomycin ist ein relativ junges Antibiotikum, welches erst seit 2003 eingesetzt wird. Der Wirkungsmechanismus ist noch nicht komplett verstanden, jedoch interkaliert dieses zyklische Lipopeptid nach vorheriger Bindung von Kalziumionen in die Zellmembran. Dies führt zu einem Ausstrom von Kaliumionen und einer Depolarisation der Membran, jedoch nicht zur Zellyse. Im Folgenden werden sowohl die Replikation, die Transkription als auch die Translation der Bakterien beeinflusst, was letztendlich den Tod der Bakterien verursacht (Silverman *et al.*, 2003).

## 1.2 Bakterielle Resistenzmechanismen

Mit der Einführung von Antibiotika als Behandlungsstrategie gegen bakterielle Infektionen ergab sich schnell das Problem des Auftretens von Antibiotika-resistenten Stämmen. Die Ursache hierfür kann bei der unsachgemäßen Anwendung liegen. Dies umfasst die Therapie mit Antibiotika, die nicht gegen die ursächlichen Erreger wirken sowie die unsachgemäße Einnahme oder zu früher Beendigung der Therapie. Aufgrund des auftretenden Selektionsdrucks während einer Behandlung von Patienten mit Antibiotika können sich Resistenzen ausbilden. Dabei gibt es neben einer Vielzahl an speziellen Resistenzmechanismen gegen einzelne Antibiotika drei generelle Prinzipien, nach denen Bakterien gegen Antibiotika resistent werden können. Zum Einen besteht die Möglichkeit, die antibiotische Substanz zu zerstören bzw. deren biologisch aktiven Bestandteil zu modifizieren. Dies ist beispielsweise bei Resistenzen gegen  $\beta$ -Lactame der Fall, welche bereits seit den 1940er Jahren

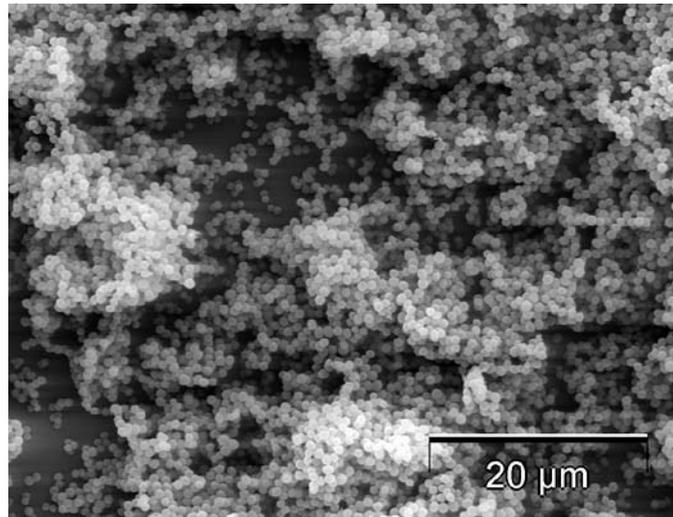
bekannt sind (Bondi, Dietz, 1946). Spezielle Enzyme, die sogenannten  $\beta$ -Lactamasen, greifen den  $\beta$ -Lactam-Ring an und öffnen diesen durch Hydrolyse. Dadurch können  $\beta$ -Lactame nicht mehr an die bakteriellen Transpeptidasen binden und diese inhibieren. Ein zweiter, beispielsweise gegen Vancomycin auftretender Resistenzmechanismus ist die Modifikation der Zielstruktur des Antibiotikums. Wie oben beschrieben bindet Vancomycin an die D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen der Zellwand, wodurch keine Quervernetzungen innerhalb der Mureinschicht mehr geknüpft werden können. Vancomycin-resistente Erreger modifizieren diese Struktur jedoch und bilden D-Alanyl-D-Lactat-Gruppen, wodurch Vancomycin seine hohe Bindungsaffinität und somit seine Aktivität verliert (Bugg *et al.*, 1991). Ein anderes Beispiel dieses Mechanismus ist bei der Resistenz gegen Rifampicin zu beobachten. Dort führen Punktmutationen in dem für  $\beta$ ie -Untereinheit der RNA-Polymerase codierenden Gens *rpoB* dazu, dass Rifampicin nicht mehr an das Enzym binden kann und somit seine Wirksamkeit verliert. Dabei haben verschiedene Mutationen unterschiedliche Aminosäure-Substitutionen in der Polymerase und somit auch einen unterschiedliche Toleranzgrenze von Rifampicin zur Folge (Aubry-Damon *et al.*, 1998). Eine dritte Art von Resistenzmechanismen besteht darin, die antibakteriellen Substanzen daran zu hindern an ihren Wirkungsort zu gelangen. Dabei können beispielsweise intrazellulär wirksame Antibiotika daran gehindert werden, in die Zellen einzudringen, oder durch Transportmechanismen effektiv wieder aus den Bakterien hinaus transportiert werden. So ist beispielsweise das Transportprotein NorA in *S. aureus* für die Resistenz gegen Fluorquinolone verantwortlich, welche wie oben beschrieben die DNA-Gyrase bzw. Topoisomerasen bindet. Die Effluxpumpe NorA transportiert diese Substanzen unter Energieverbrauch über die Zellmembran in den extrazellulären Raum, so dass die intrazellulären Zielproteine nicht mehr gebunden werden können (Kaatz *et al.*, 1993).

Erstaunlicherweise waren Resistenzen oftmals schon bekannt, bevor die Substanzen überhaupt für die Therapie freigegeben wurden. Dies war sowohl bei einem der ersten Antibiotika, Penicillin G, als auch bei einem der jüngsten Wirkstoffe, Linezolid, der Fall (Bush, 2004). Dies belegt, dass es nach Behandlung von Erkrankungen mit Antibiotika meist nur eine Frage der Zeit ist, bis nach der Entdeckung und Einführung von neuen Substanzen resistente Erreger auftreten.

### **1.3 *Staphylococcus aureus* als Antibiotika-resistentes Pathogen**

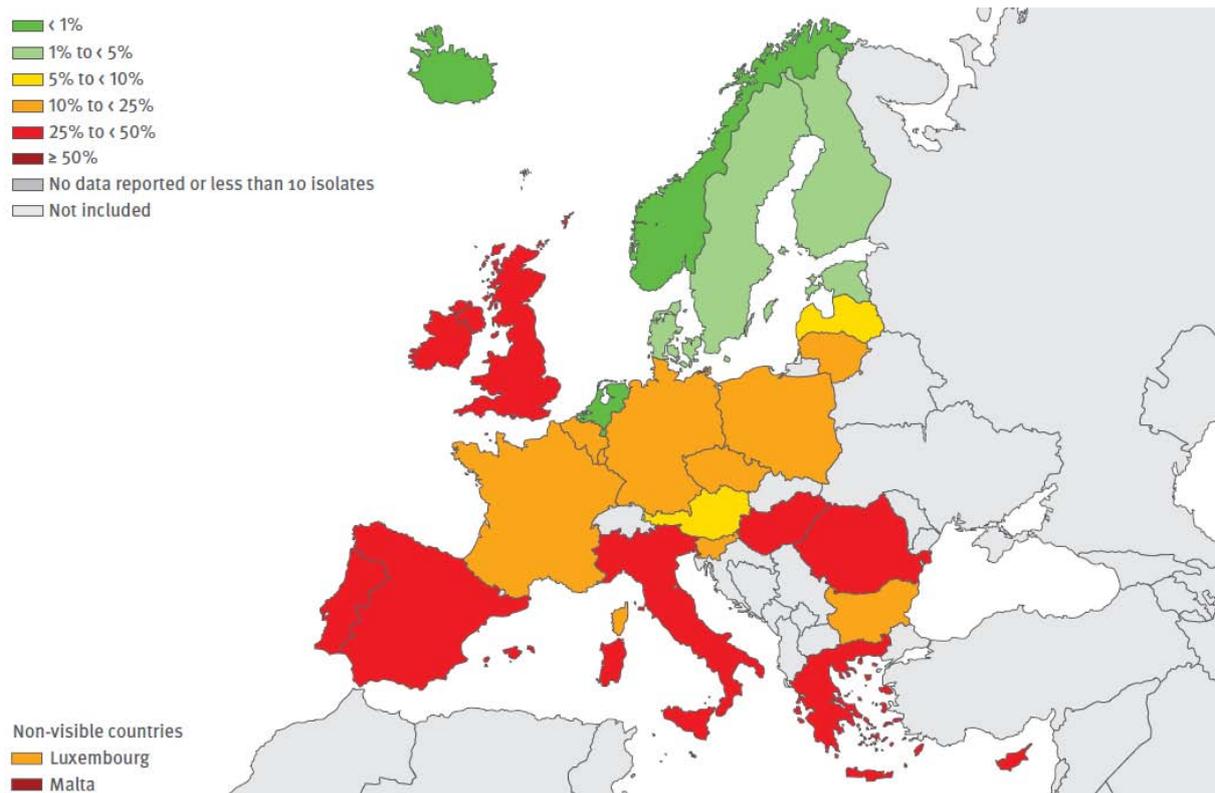
Ein Pathogen, welches im Lauf der Zeit immer mehr Resistenzen gegen die verschiedensten Antibiotika erworben hat und somit zu den multiresistenten Erregern gezählt wird, ist *Staphylococcus aureus* (Abbildung 1.2). Dieses Gram-positive Bakterium wurde zusammen mit einem weiteren Vertreter dieser Gattung, *S. epidermidis*, erstmals von Anton J. Rosenbach Ende des neunzehnten

Jahrhunderts isoliert und beschrieben (Rosenbach, 1884). *S. aureus* zählt zu den opportunistischen Erregern, welche Menschen mit intaktem Immunsystem keinen größeren Schaden zufügen können. Im Falle einer Immunsuppression oder Schwächung des Immunsystems beispielsweise nach operativen Eingriffen kann es jedoch zu schweren und tödlichen Infektionen kommen. Die Breite der verursachten Krankheiten variiert dabei von leichten Haut- und Weichgewebsinfektionen zu schweren Erkrankungen wie Endokarditis, Bakteriämie und Sepsis (Lowy, 1998).



**Abbildung 1.2:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilms von *S. aureus* HG001; Vergrößerung: 1000-fach

Erschwert wird eine erfolgreiche Therapie von *S. aureus*-Infektionen durch das Auftreten und die schnelle Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen. Diese können auf verschiedene Arten erworben werden. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass sich durch lange andauernde Therapie aufgrund des Selektionsdrucks resistente Bakterien im Patienten selbst bilden. Diese entstehen meist durch spontane Mutationen wie es bei Rifampicin-resistenten *S. aureus* der Fall ist (Aubry-Damon *et al.*, 1998). Eine andere Möglichkeit ist die Übertragung von Resistenzgenen zwischen verschiedenen *S. aureus*-Stämmen bzw. auch von anderen Spezies auf *S. aureus* und anschließender Infektion. Ein Beispiel dafür stellt die große Verbreitung des genetischen Elements der Staphylococcal cassette chromosome (*SCC*)*mec*-Kassette. Dieses vermutlich von der bei Tieren vorkommenden Art *S. fleurettii* stammende Element (Tsubakishita *et al.*, 2010) beherbergt das Gen *mecA*, welches für das modifizierte Penicillin-Bindeprotein PBP 2a codiert und somit Resistenz gegen Methicillin vermittelt (Chambers, 1997). Allein von diesem Element sind mittlerweile acht unterschiedliche Varianten beschrieben (Zhang *et al.*, 2009). Eine Übersicht über den Anteil Methicillin-resistenter *S. aureus*-Isolate in Europa ist in Abbildung 1.3 dargestellt.



**Abbildung 1.3:** Anteil Methicillin-resistenter *S. aureus* bezogen auf alle registrierten invasiven Isolate in Europa 2009. Quelle: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)

Die Resistenz von *S. aureus* gegen Vancomycin wurde sehr wahrscheinlich durch die Übertragung genetischen Materials einer *Enterococcus*-Art übernommen (Witte, 2004). Zudem kommt es zur Resistenzverbreitung durch die Übertragung von Resistenz-Plasmiden, wie es zum Beispiel für Penicilline, Aminoglykoside und Tetracycline schon lange bekannt ist (Lacey, 1975). Hinzu kommt, dass die von *S. aureus* häufig auf chirurgischen Implantaten ausgebildeten Biofilme (Abbildung 1.2) die erfolgreiche Behandlung von Infektionen enorm erschweren. Durch eine enge Zusammenlagerung der Bakterien und Synthese einer extrazellulären Matrix können die eingesetzten Antibiotika nicht mehr durch Diffusion alle Zellen erreichen, was eine vollständige Behandlung von *S. aureus*-Biofilmen unterbindet (Lauderdale *et al.*, 2010). Über einen langen Zeitraum war das Auftreten solcher Methicillin- bzw. multi-resistenten Stämme überwiegend auf Krankenhäuser beschränkt und wurden demnach hospital-acquired Methicillin-resistente *S. aureus* (HA-MRSA) genannt. Im Gegensatz dazu stellen seit den 1990er Jahren die sogenannten community-acquired (CA-)MRSA ein großes Problem für die öffentlichen Gesundheitssysteme dar. Diese Stämme, welche überwiegend außerhalb von Krankenhäusern auftreten, infizieren auch Menschen mit intaktem Immunsystem und führten ursprünglich vorwiegend zu mildereren Krankheiten wie Hautinfektionen. In letzter Zeit wurde jedoch auch eine zunehmende Anzahl an schweren, invasiven Infektionen dieser Stämme registriert (David, Daum, 2010). Das Problem der Infektion durch Antibiotika-resistente

Erreger und deren Verbreitung ist also nicht mehr auf die klinische Umgebung begrenzt, sondern hat sich auch auf das öffentliche Leben ausgeweitet.

### **1.4 Derzeitige und zukünftige Strategien zur Behandlung von MRSA-Infektionen**

Aufgrund der raschen Entwicklung und anschließenden Verbreitung von Resistenzmechanismen kommt der Suche nach neuen Antibiotika bzw. nach alternativen Behandlungsmethoden eine immer größer werdende Rolle zu. Zurzeit werden gegen schwerwiegende, systemische MRSA-Infektionen die Antibiotika Vancomycin, Linezolid und Daptomycin eingesetzt. Jedoch traten auch gegen diese Substanzen bereits Resistenzen auf (Witte, 2004; Rossolini *et al.*, 2010). Als Reserveantibiotikum bzw. „last line of defense“ gegen MRSA gilt momentan Linezolid, ein Stoff der in der Regel intravenös appliziert wird, jedoch auch oral verabreicht werden kann. Da wie oben bereits erwähnt auch hier schon resistente Stämme bekannt waren bevor die Substanz in den USA zugelassen wurde, besteht die Notwendigkeit weitere Antibiotika zu entwickeln bzw. dem Problem der bakteriellen Resistenz durch andere Behandlungsstrategien zu begegnen. Ein Ansatz besteht darin, weitere, natürliche antibiotische Substanzen aus Naturstoffen zu gewinnen, deren Struktur aufzuklären und bis zur therapeutischen Nutzung weiterzuentwickeln. Die Quelle dieser Wirkstoffe ist dabei recht vielfältig und reicht von Pflanzen über terrestrische Bakterien bis zu marinen Schwämmen (Bringmann *et al.*, 2008; Waksman *et al.*, 2010; Tabares *et al.*, 2011). Allerdings ist dieser Weg relativ langwierig und birgt nur geringe Erfolgchancen, da allein die Extraktion einzelner Naturstoffe aus einem Gemisch an produzierten Stoffen mitunter sehr zeitraubend sein kann. Diese Methode basiert prinzipiell auf der Isolation von Wirkstoffen aus kultivierbaren Organismen. Ein relativ neuer Ansatz zielt darauf ab, antibakterielle Stoffe auch von nicht-kultivierbaren Spezies identifizieren zu können. Dazu wird genetisches Material aus Umweltproben isoliert und auf das Vorhandensein von Genen untersucht, welche potenziell für Enzyme der Produktion von Antibiotika codieren (Singh, Macdonald, 2010). Diese Enzyme können durch kultivierbare Organismen exprimiert und somit der gewünschte Wirkstoff gewonnen werden. Zusätzlich können diese Enzyme genetisch so verändert werden, dass Analoga der ursprünglichen Substanz erzeugt werden, welche möglicherweise bessere antibakterielle Wirkung besitzen als die Ausgangssubstanz (Spížek *et al.*, 2010). Eine ähnliche Möglichkeit zur Entdeckung besserer Wirkstoffe stellt die synthetische Weiterentwicklung von bereits bekannten Antibiotika dar. Diese Vorgehensweise wurde bislang schon oft angewendet, wie ein Beispiel aus der Gruppe der  $\beta$ -Lactame zeigt. So sind Methicillin und Oxacillin weiterentwickelte Derivate von Penicillin, deren Reste am  $\beta$ -Lactam-Ring dergestalt modifiziert wurden, dass ein Binden von

Penicillinasen sterisch verhindert wird und so die Inaktivierung der Substanzen durch Bakterien unterbunden wird. Ceftobiprol, ein neues Cephalosporin, wurde ebenfalls gezielt entwickelt um dem Angriff von  $\beta$ -Lactamasen zu entgehen (Stein *et al.*, 2009). Dieses Antibiotikum ist mittlerweile in Kanada und der Schweiz zur Behandlung von MRSA-Infektionen zugelassen. Für die Entdeckung neuer Substanzen, die Derivate von bereits eingesetzten Wirkstoffen darstellen, aber auch aus komplett neuen Substanzklassen stammen können, ist auch das standardisierte Screening von Substanz-Sammlungen eine vielversprechende Strategie. Auf diese Weise können bereits bekannte aber noch nicht auf ihr antibakterielles Potenzial hin untersuchte Substanzen entdeckt werden. Zudem wurden in letzter Zeit Versuche unternommen, die biologisch aktiven Gruppen verschiedener Antibiotikaklassen miteinander zu kombinieren (Robertson *et al.*, 2008). Durch einen solchen synthetischen Stoff können zwei Ziele der Bakterienzelle gleichzeitig angegriffen werden, was die Möglichkeit einer besseren Wirkung bei geringerer Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Resistenzen birgt. Andere Bemühungen gehen in die Richtung bereits etablierte Antibiotikatherapien durch gewisse zusätzliche Verfahren effizienter zu gestalten. Beispielsweise führt die Behandlung von Biofilmen mit leichten Strömen in Kombination mit alleine nicht wirksamen Dosen von Antibiotika zu einer messbaren Verringerung der Bakterienpopulation im Biofilm (del Pozo *et al.*, 2009a). Zudem führt die Langzeitanwendung von leichten Strömen ohne Antibiotika ebenfalls zu einer Populationsabnahme in bakteriellen Biofilmen (del Pozo *et al.*, 2009b). Dieses Verfahren dürfte sich jedoch nur schwierig – wenn überhaupt – in der Praxis anwenden lassen. Zudem wird versucht, die Wirkung bekannter Antibiotika durch die Kombination mit weiteren Substanzen zu erhöhen bzw. gezielt Resistenzmechanismen zu umgehen. Dies wurde beispielsweise bei einer Kombination von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zusammen mit  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren realisiert, welche bei Haut- und Weichgewebsinfektionen von *S. aureus* mit anderen Erregern angewendet wird (Dryden, 2010). Neuere Ansätze erörtern beispielsweise die Möglichkeit die Effektivität von Inhibitoren der Folsäurebiosynthese durch Zugabe von Nukleosid-Analoga zu steigern (Zander *et al.*, 2010). Ein anderer, nicht Antibiotika-basierter Ansatz zielt darauf ab, die lebenden Bakterien mittels Antikörper zu opsonisieren und so für den Angriff durch phagozytierende Zellen des menschlichen Immunsystems zu markieren. Die hierfür ausgewählten Antigene sind sinnvollerweise Proteine, welche von allen *S. aureus*-Stämmen exprimiert und auf der Zelloberfläche exponiert werden und somit eine spezifische Erkennung der Bakterien zulassen. Erste Erkenntnisse über die Selektivität eines solchen Verfahrens und zur Therapie im Tiermodell ergaben gute Behandlungserfolge (Lorenz *et al.*, 2011).

Das Problem das sich bei der Entwicklung neuer therapeutischer Antibiotika stellt ist der lange Zeitraum von ca. zwölf Jahren, den die Studien bis zur Freigabe eines Medikaments in Anspruch nehmen (Projan, Bradford, 2007). So müssen neue Substanzen mit Wirksamkeit in vitro mehrere

klinische Studien bestehen, welche unter anderem zur Bestimmung einer therapeutisch relevanten Dosis benötigt werden und zudem Aufschlüsse zur Wirksamkeit *in vivo* und über mögliche Nebenwirkungen einer Therapie geben müssen. Da dieser Prozess mehrere Jahre in Anspruch nimmt zeigen sich immer weniger Pharmaunternehmen bereit, die finanzielle Bürde dieser Untersuchungen ohne die Garantie eines Erfolgs zu tragen (DiMasi *et al.*, 2003; Projan, Shlaes, 2004). Jedoch sind neue antibakterielle Substanzen dringend notwendig, um der immer größer werdenden Zahl an multi-resistenten Erregern begegnen zu können (Silver, 2011).

### 1.5 Entwicklung von Naphthalimiden

Naphthalimide kommen nicht natürlich vor und wurden ursprünglich in der anti-Tumor Forschung entwickelt (Waring *et al.*, 1979). Dort wurden erstmals  $\beta$ -Nitronaphthalene, deren anti-Tumor-Wirkung bekannt war, mit einem Glutarimid-Ring und positiv geladenen Seitenketten mit tertiären Stickstoffen gekoppelt. Ein erstes Molekül dieser Forschung war Mitonafid, welches auch in klinische Studien aufgenommen wurde, diese jedoch aufgrund von starken, toxischen Nebenwirkungen auf das zentrale Nervensystem nicht bestand (Díaz-Rubio *et al.*, 1994).

Durch die Verbindung zweier Naphthalimide über eine Linker-Region aus Methylgruppen wurden später Bisnaphthalimide synthetisiert. Ein Beispiel aus dieser Substanzklasse ist die Substanz LU 79553 oder Elinafid, welche ebenfalls in der Anti-Krebs-Forschung entwickelt wurde (Bousquet *et al.*, 1995). Der Wirkungsmechanismus in eukaryotischen Zellen beruht bei dieser Substanz auf der Bindung an und Interkalation in die DNA (Bailly *et al.*, 1996). Kürzlich wurde die Sequenzspezifität dieser Bindung detailliert aufgeklärt und ergab eine bevorzugte Interkalation in die Basensequenz 5'-TGCA-3' (González-Bulnes, Gallego, 2009). Allerdings führte auch die Behandlung von Patienten in klinischen Studien mit Elinafid zu toxischen Nebenwirkungen (Villalona-Calero *et al.*, 2001). Den limitierenden Faktor für die maximale tolerable Dosis stellte in diesem Fall vorwiegend eine auftretende neuromuskuläre Toxizität dar (Awada *et al.*, 2003). Sowohl das Mononaphthalimid Mitonafid als auch das Bisnaphthalimid Elinafid besitzen tertiäre Amine in der Molekül-Seitenkette bzw. in der Linkerregion. Im Gegensatz dazu haben die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen überwiegend quartäre Amine in den Seitenketten bzw. bei den Bisnaphthalimiden in den Linkerregionen zwischen den beiden Naphthalimid-Einheiten. Diese strukturelle Modifikation wurde vorgenommen, um Substanzen mit gleicher Aktivität aber geringerer Zytotoxizität zu erhalten. Die Amine der Seitenketten wurden dabei mit Methylgruppen quarternisiert. Die daraus resultierenden Substanzen waren folglich kationisch. Diese Modifikation führte auch zu einer wesentlich geringeren

Zytotoxizität in in-vitro-Untersuchungen (Muth *et al.*, 2007), wodurch diese Substanzklasse der bisquartären Bisnaphthalimide als potentielle neue Antibiotika in die Forschung integriert wurden.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

In einem Screening von neu synthetisierten Substanzen wurde das bisquartäre Bisnaphthalimid MT02 gefunden, welches sehr gute Wirksamkeit gegen *S. aureus* und *S. epidermidis* zeigte. Zunächst wurde hiervon das Wirkungsspektrum genauer untersucht. Zudem sollten strukturverwandte Derivate von MT02 auf ihre antibakterielle Wirkung getestet werden, um mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser Substanzklasse zu erkennen. Des Weiteren sollte der Wirkungsmechanismus von MT02 gegen *S. aureus* bestimmt werden. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde eine MT02-resistente Mutante von *S. aureus* HG001 generiert, welche mit *S. aureus* HG001<sup>R</sup> bezeichnet wurde. Durch Studien an dieser Mutante sollte der Resistenzmechanismus von *S. aureus* gegen MT02 aufgedeckt werden.

Ein zweites Projekt beschäftigte sich mit der vergleichenden Analyse der Auswirkung verschiedener Antibiotika auf das Transkriptom von *S. epidermidis*. Durch das Erstellen von Transkriptionsprofilen unter dem Einfluss von Antibiotika mit bekanntem Wirkungsmechanismus sollte eine Möglichkeit erarbeitet werden, neue wachstumshemmende Substanzen anhand ihres Einflusses auf das Transkriptom in die Gruppen bereits bekannter Wirkstoffe einzuordnen.



## 2. Material

### 2.1 Allgemeines

Alle selbst hergestellten Lösungen und Medien, wie sie bei den einzelnen Methoden beschrieben sind, wurden mit entmineralisiertem Wasser angesetzt und vor Gebrauch 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Soweit nicht anders angegeben, wurden bei Enzymen und Kits die von den Herstellern mitgelieferten Puffer und Inkubationslösungen eingesetzt.

Verwendete Antibiotika, Chemikalien und Medienzusätze wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), BD (Heidelberg), Merck (Darmstadt), MP Biomedicals (Heidelberg), PAA (Cölbe), peqlab (Erlangen), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Verbrauchsmaterialien waren Produkte von Brand (Grafrath), Greiner bio-one (Frickenhausen), ASID BONZ (Herrenberg), Sarstedt (Nümbrecht) und VWR (Ismaning).

### 2.2 Medien und Agar

Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf einen Liter. Zur Herstellung von Agar wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugesetzt.

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung der verwendeten Medien.

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Müller-Hinton (MH)	23 g	Fluka, Taufkirchen Roth, Karlsruhe
	21 g	
Luria Bertani (LB)	Pepton 10 g	
	NaCl 10 g	
	Hefeextrakt 5 g	
B-Medium	Pepton 10 g	
	NaCl 10 g	
	Hefeextrakt 5 g	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g	
MKP-Medium	Pepton 10 g	
	Fleischextrakt 1 g	
	NaCl 75 g	
	Mannit 10 g	
	Phenolrot 0,025 g	
RPMI 1640	mit NaHCO <sub>3</sub> , 10 mM HEPES, pH 7,2, 2 mM L-Glutamin, ohne Phenolrot	GIBCO®, Invitrogen, Karlsruhe

## Fortsetzung Tabelle 2.1

DMEM	mit Glukose (4,5 g/l) und L-Glutamin	GIBCO®, Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kalbsserum		GIBCO®, Invitrogen, Karlsruhe

## 2.3 Reagenzien

**Tabelle 2.2:** Verwendete Reagenzien und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Reinstwasser: Rotisolv®-Wasser	Roth, Karlsruhe
Nukleotidtriphosphate (100 mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarosegelelektrophorese:	
6 x DNA Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Lebend-Tot-Färbung: LIFE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit	Invitrogen, Darmstadt
Hoechst 33342	Invitrogen, Darmstadt
API® Staph	Biomérieux, Nürtingen
RNA protect® Bacteria Reagent	Qiagen, Hilden
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 u/μl)	Invitrogen, Darmstadt
Random Primers (3 μg/μl)	Invitrogen, Darmstadt
Fluoreszenzmarkierte Cytosin-Triphosphate: Cy™3-dCTP / Cy™5-dCTP	GE Healthcare, München
Szintillationsflüssigkeit: Rotiszint® Eco Plus	Roth, Karlsruhe
Trizol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

## 2.4 Enzyme

**Tabelle 2.3:** Verwendete Enzyme

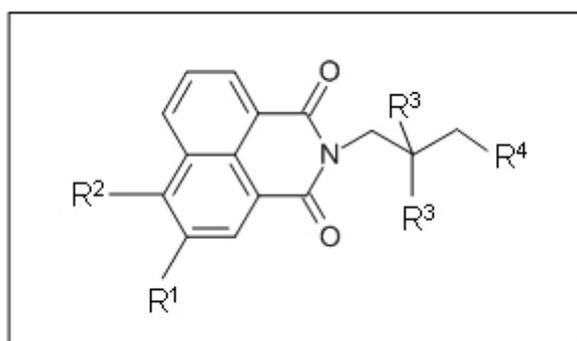
Bezeichnung	Hersteller
DNase I recombinant, RNase free	Roche, Mannheim
Lysostaphin	Bharat Biotech, Hyderabad, Indien
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GoTaq® Flexi Polymerase System	Promega, Mannheim
Qiagen Taq DNA Polymerase (5 u/μl)	Qiagen, Hilden
SuperScript™ III Reverse Transcriptase (200 u/μl)	Invitrogen, Darmstadt
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB, High Wycombe, UK
T7 Exonuclease	NEB, Frankfurt
ABI Prism® BigDye® Terminator v1.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt

## 2.5 Antibiotika

**Tabelle 2.4:** Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung (Lösungsmittel)	Hersteller
Gentamicin-Sulfat	6 mg/ml (H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oxacillin	100 mg/ml (H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ciprofloxacin	20 mg/ml (H <sub>2</sub> O)	Fluka, Taufkirchen
Levofloxacin	10 mg/ml (H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rifampicin	15 mg/ml (100 % DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vancomycin	6 mg/ml (H <sub>2</sub> O)	MP Biomedicals, Heidelberg

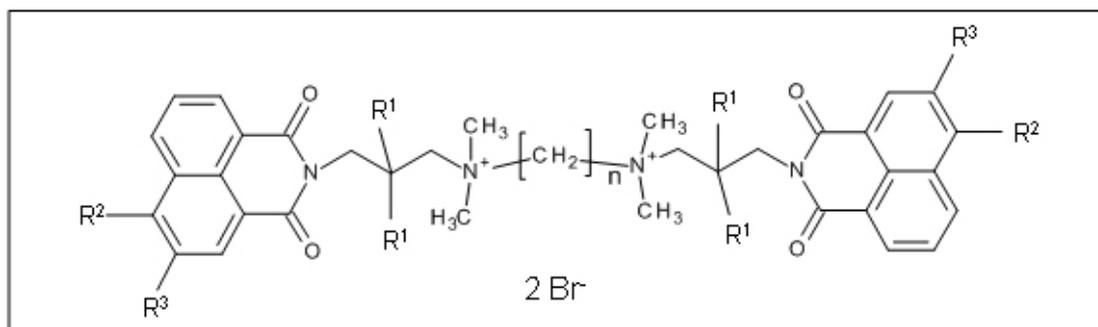
Die folgenden Substanzen wurden von Maximilian Tischer am Lehrstuhl für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg synthetisiert (Tischer *et al.*, 2010). Die Stammlösungen wurden in 100 % DMSO hergestellt und hatten die Konzentration 20 mg/ml bis auf die Substanz MTFP03, deren Stammlösung die Konzentration 10 mg/ml betrug. Um die Substanzen lösen zu können, mussten sie teilweise auf bis zu 95°C erhitzt werden. Die chemischen Grundstrukturen der bearbeiteten Mononaphthalimide bzw. bisquartären Bisnaphthalimide zeigen Abbildungen 2.1 bzw. 2.2. Die Bezeichnung der jeweiligen Substanzen, deren Substituenten und die Kettenlänge ihrer Linkerregion sind in den Tabellen 2.5 und 2.6 dargestellt.



**Abbildung 2.1:** Grundstruktur der untersuchten Mononaphthalimide

**Tabelle 2.5:** Bezeichnung und Substituenten der untersuchten Mononaphthalimide

Name	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
MT01	NO <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
MT03	H	NO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
MT51	NO <sub>2</sub>	H	H	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> I <sup>-</sup>
MT58	H	NO <sub>2</sub>	H	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> I <sup>-</sup>



**Abbildung 2.2:** Grundstruktur der untersuchten bisquartären Bisnaphthalimide

**Tabelle 2.6:** Bezeichnung, Substituenten und Kettenlängen der Linkerregion der untersuchten Bisnaphthalimide

Name	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
MT02	6	CH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>
MT04	6	CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	H
MTFP03	3	H	H	H
MTFP04	4	H	H	H
MTFP05	5	H	H	H
MT109	6	H	H	H
MTFP07	7	H	H	H
MTFP08	8	H	H	H
MTFP09	9	H	H	H
MTFP10	10	H	H	H
MTFP11	11	H	H	H
MTFP12	12	H	H	H

## 2.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWGOperon (Ebersberg) bezogen.

**Tabelle 2.7:** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Annealing-Temperatur
dltAfor	CATATGGTCCAACCTGAAGCTACG	60°C
dltArev	CAAACCTTCGCTTTATCACCAGTG	60°C
lexAfor	AGTTCAACTGTTTCATGGTCA	60°C
lexArev	GAATATGTCGCTATTATGTGTCGA	60°C
pbpAfor	AGAGAAGCAGCCTAAACGTG	60°C
pbpArev	ATGTTGATCCAGGCTCGTATG	60°C

## Fortsetzung Tabelle 2.7

gyrAfor	AAGCAATGGTACGTATGGCTC	60°C
gyrArev	CTAACAAGTTAGGGAATCGAGCAG	60°C
vraFfor	CCTTCTGAATTGTCTGGTGGACAA	60°C
vraFrev	GCATCACTACTCGATTGGCA	60°C
nuc for	GCGATTGATGGTGATACGGTT	55°C
nuc rev	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	55°C
ftsLfor	GCAACAACCACAAACTAAGCCCGA	60°C
ftsLrev	TCGTTCTCAAGGCTCATCCCCTG	60°C
opuCAfor	AGCACTTGC GGCCGAACAAGA	60°C
opuCArev	TGGCGTATCAAATTGCACCACCT	60°C
uvrBfor	TTGCGACCACTGGGTTTCGAC	60°C
uvrBrev	CGTATGGTCCAGGCGTTGCAGA	60°C
sbcDfor	ACACATCAACAGGGAATTACGCGCT	60°C
sbcDrev	CCCTTTAGCTTGACCCGCTTCCG	60°C
rDNAfor	ACACCAGTGGCGAAGGCGAC	60°C
rDNArev	CTCCACCGCTTGTGCGGGTC	60°C
16S rDNA 24for	GAGTTTGATCCTGGCTCA	57°C
16S rDNA 1492rev	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	57°C
Bio-TGCA	Biotin-ATATATGCATATATTTTTATATATGCATATAT	
Bio-Kontrolle	Biotin-ATATAGACTTATATTTTTATATAAGTCTATAT	

## 2.7 Geräte

**Tabelle 2.8:** In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Photometer	BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg
	Ultrospec 3100 pro	Amersham, Freiburg
Spektrophotometer	Nano-drop ND-1000	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	pH720	inoLab, Weilheim
Heizblöcke	Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
	Labtherm®	Liebisch, Bielefeld
Vortex	Bio Vortex V1	Lab4You, Berlin
Brutschränke	Tv40b	Memmert, Schwabach
	BB16	Heraeus, Hanau
Rotationsinkubator	Mini 10	Hybaid, Heidelberg
Schüttelinkubatoren	SM-30	Edmund Bühler, Hechingen
	Innova 4300	New Brunswick Scientific, Hamburg
Wasserbad	1002	GFL, Burgwedel
Schüttelwasserbad	1092	GFL, Burgwedel

## Fortsetzung Tabelle 2.8

Tischzentrifugen	Pico 17	Heraeus, Hanau
	Biofuge 13R	Heraeus, Hanau
Zentrifugen	Rotanta/TR	Hettich, Kirchleugern
	Multifuge 1L-R	Heraeus, Hanau
	Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
	Multifuge X3R	Heraeus, Hanau
Vakuumzentrifuge	Speed Vac® SC110	Savant, Frederick, USA
PCR-Maschine	T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Gelelektrophoresesystem	DNA Sub Cell	Bio-Rad, Champaign, USA
Spannungsquelle	Power Pac 300	Bio-Rad, Champaign, USA
Geldokumentationsanlage	Gel ix Imager	INTAS, Göttingen
Zellaufschlussgerät	Fast-Prep®-24	MP Biomedicals, Heidelberg
RNA-Elektrophorese-System	Bioanalyzer 2100	Agilent, Böblingen
Microarray-Scanner	GenePix 4000B	Axon, Sunnyvale, USA
Szintillationszähler	Tri-Carb® 2100TR	Packard, Meriden, USA
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader	Multiskan	Thermo Electron, Dreieich
Biosensorik Messgerät	Biacore®2000 system	GE Healthcare, Freiburg
Organhomogenisator	Dispomix®	BioLabProducts, Gödenstorf
Lichtmikroskop	Telaval 31	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop	Axiolab	Zeiss, Oberkochen
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	LSM 510	Zeiss, Oberkochen
Transmissionselektronenmikroskop	EM10	Zeiss, Oberkochen

## 2.8 Bakterienstämme

**Tabelle 2.9:** In dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaft / Herkunft / Referenz
<i>S. aureus</i> NCTC8325	National Collection of Type Cultures, United Kingdom
<i>S. aureus</i> 113	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>S. aureus</i> 325	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>S. aureus</i> COL	MRSA-Stamm, Tübingen
<i>S. aureus</i> HG001	Herbert <i>et al.</i> , 2010
<i>S. aureus</i> MA12	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>S. aureus</i> Newman	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>S. aureus</i> RKI 05-01702	Ciprofloxacin-Resistenz, Robert-Koch-Institut, Wernigerode
<i>S. aureus</i> RKI 05-02040	Ciprofloxacin-Resistenz, Robert-Koch-Institut, Wernigerode
<i>S. aureus</i> RKI 07-03310	Ciprofloxacin-Resistenz, Robert-Koch-Institut, Wernigerode
<i>S. aureus</i> RKI 08-00470	Ciprofloxacin-Resistenz, Robert-Koch-Institut, Wernigerode
<i>S. aureus</i> RKI 08-00010	Fosfomycin-Resistenz, Robert-Koch-Institut, Wernigerode
<i>S. aureus</i> RKI 08-00248	Fosfomycin-Resistenz, Robert-Koch-Institut, Wernigerode
<i>S. aureus</i> RKI 08-00465-1	Fosfomycin-Resistenz, Robert-Koch-Institut, Wernigerode

## Fortsetzung Tabelle 2.9

<i>S. aureus</i> RKI 08-00966	Fosfomycin-Resistenz, Robert-Koch-Institut, Wernigerode
<i>S. aureus</i> SH1000	8325-4 Derivat, <i>rsbU</i> <sup>+</sup> , Horsburgh <i>et al.</i> , 2002
<i>S. aureus</i> klonale Linie USA300	klinisches Isolat, Tübingen
<i>S. aureus</i> Xen29	Caliper Life Sciences, Mainz
<i>S. aureus</i> HG001 <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. aureus</i> RN1 <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. aureus</i> MA12 <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. aureus</i> Xen29 <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> RP62A	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>S. epidermidis</i> 567	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	American Type Culture Collection, USA
<i>Bacillus subtilis</i> 168	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Listeria monocytogenes</i>	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Streptococcus agalacticae</i> S44	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Streptococcus agalacticae</i> S45	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Streptococcus canis</i> S23	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Streptococcus equi</i> S31	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Streptococcus pyogenes</i> S36	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Streptococcus suis</i> S2	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Streptococcus pneumoniae</i> #wt37	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 107	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 111	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 165	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 261	Stammsammlung S. Hammerschmidt, Greifswald
<i>Escherichia coli</i> ETEC-1	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Escherichia coli</i> EAEC	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Escherichia coli</i> EHEC	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Escherichia coli</i> ETEC-2	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Escherichia coli</i> MENEC	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Escherichia coli</i> UPEC	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Citrobacter coseri</i>	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Klebsiella pneumonia</i>	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Proteus mirabilis</i>	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Salmonella typhimurium</i>	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Serratia marcescens</i>	IMIB Stammsammlung, Würzburg
<i>Shigella dysenteria</i>	IMIB Stammsammlung, Würzburg



## 3. Methoden

### 3.1 Gefrierkulturen

Um zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen Gefrierkulturen anzufertigen, wurden zunächst 4 ml einer 18 h Kultur für 10 min bei 13000 U/min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Präzipitat wurde anschließend in 500 µl des jeweiligen Mediums resuspendiert und 600 µl steriles 99,5 %iges Glycerin zugegeben. Nach gutem Durchmischen des Ansatzes wurde dieser bei -80°C gelagert.

### 3.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration einer Substanz gegen Bakterien ist eine anerkannte Methode, um die antibakterielle Wirkung neuer Substanzen einordnen und mit bekannten Substanzen vergleichen zu können. Die MHK gegen ein Bakterium ist definiert als die niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der kein bakterielles Wachstum mehr stattfindet. Um diese Konzentration zu bestimmen wurde eine geometrische Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Substanz in jeweils 500 µl MH-Medium in Glasröhrchen hergestellt. Diese wurden mit 500 µl einer Bakteriensuspension zu einem Inokulum von jeweils  $5 \times 10^5$  Bakterien/ml beimpft. Eine Kultur ohne Substanz diente als Positivkontrolle. Die Röhrchen wurden 18 h bei 37°C schüttelnd inkubiert und anschließend optisch ausgewertet. Aufgrund unterschiedlicher Anforderungen an die Wachstumsbedingungen wurde *Streptococcus pneumoniae* in microaerophiler Umgebung statisch inkubiert. MHK-Werte von Staphylokokken, welche unter diesen veränderten Bedingungen inkubiert wurden, zeigten keine Abweichung.

### 3.3 Untersuchung des bakteriellen Wachstums

#### 3.3.1 Absterbekinetik

Um über einen längeren Zeitraum verfolgen zu können, wie sich die Anzahl von lebenden Bakterien in einer Kultur nach Zugabe einer antibakteriellen Substanz verändert, wurden sogenannte Killing-Kurven angefertigt (verändert nach Raafat *et al.*, 2008). Dazu wurden 25 ml MH-Medium mit  $1 \times 10^6$  Bakterien/ml *S. aureus* HG001 beimpft. Anschließend wurden unterschiedliche Konzentrationen an MT02 zugegeben, die Kulturen bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert und nach bestimmten Zeitintervallen Proben entnommen. Diese wurden in MH-Medium verdünnt und in Duplikaten auf

MH-Agar ausplattiert. Anhand der jeweiligen Verdünnungsstufe konnte auf die Anzahl lebender Bakterien cfu (colony forming units) in der Kultur zum Zeitpunkt der Probenentnahme rückgerechnet werden und somit die Anzahl lebender Bakterien unter Einfluss von MT02 über den Versuchszeitraum verfolgt werden.

### 3.3.2 Autolyse

Die Auswirkung von MT02 auf die Autolyserate von *S. aureus* HG001 wurde wie von Mani *et al.* beschrieben durchgeführt (Mani *et al.*, 1993). Kulturen wurden aus einer 18 h-Kultur in 25 ml B-Medium zu einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,05 angeimpft und bei 37°C schüttelnd bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,3 inkubiert. Nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an MT02 wurden die Kulturen weiter inkubiert, bis die Kontrollkultur ohne MT02 eine  $OD_{600}$  von 0,7 erreicht hatte. Nun wurde 5 min bei 6000 U/min zentrifugiert, die Kulturen in 10 ml 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Präzipitate wurden zu einer  $OD_{600}$  von 1,0 in Autolysepuffer resuspendiert und weiter schüttelnd bei 30°C inkubiert. Der Verlauf der  $OD_{600}$  wurde alle 15 min über einen Zeitraum von 4 h bestimmt.

#### Phosphat-gepufferte Saline (PBS)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM

#### Autolysepuffer

Tris-HCl pH 7,0	50 mM
Triton X-100	0,05 % (v/v)

## 3.4 Bildgebende Verfahren

### 3.4.1 Lebend-Tot-Färbung

Mit dem LIFE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit ist es möglich, lebende von toten Bakterien visuell zu unterscheiden. Dieses Kit beinhaltet die beiden Farbstoffe SYTO® 9 und Propidiumiodid, welche beide in DNA interkalieren und mittels Laser zur Fluoreszenz angeregt werden können. Ersterer ist dabei membrangängig, kann somit in lebende Bakterien mit intakter Membran eindringen und diese anfärben, zweiterer ist nicht membrangängig, kann somit nur in tote Bakterien mit zerstörter Zellmembran eindringen und färbt diese an. Die Emissionsmaxima von den an DNA gebundenen Farbstoffen liegen dabei bei 530 nm (grün) bzw. 630 nm (rot). Kulturen von *S. aureus* HG001 wurden zu einer  $OD_{600}$  von 0,1 in 10 ml B-Medium angeimpft, welchem unterschiedliche Konzentrationen an MT02 zugesetzt worden war. Die Kulturen wurden 3 h schüttelnd bei 37°C inkubiert und anschließend je 200 µl auf kompartimentierten Objektträgern mit dem LIFE/DEAD Kit

nach Herstellerangaben gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokalen Fluoreszenzmikroskops. Zur Auswertung der Aufnahmen wurde das Programm LSM Image Browser (Zeiss, Göttingen) verwendet.

### 3.4.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen entstanden in der Abteilung für Elektronenmikroskopie der Universität Würzburg, um die Auswirkung von MT02 auf zelluläre Strukturen von *S. aureus* zu untersuchen. Dazu wurden Kulturen von *S. aureus* HG001 auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 in B-Medium verdünnt und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen an MT02 zugegeben und weitere 3 h inkubiert. Jeweils 1 ml der Kultur wurde 4 min bei 8000 U/min zentrifugiert und das Präzipitat in 90 µl 1 x PBS pH 7,4 resuspendiert. Nach Zugabe von 2,5 % (v/v) Glutardialdehyd wurden die Proben über Nacht bei 4°C fixiert. Am nächsten Morgen wurden sie zur weiteren Präparation zur Abteilung für Elektronenmikroskopie gebracht. Dort wurden sie mit Osmiumtetroxid kontrastiert, entwässert, in Epon eingebettet und Ultradünnschnitte angefertigt, bevor sie im Transmissionselektronenmikroskop betrachtet werden konnten.

### 3.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Um die kompetitive Bindung des DNA-interkalierenden Farbstoffs Hoechst 33342 und MT02 an eukaryotische DNA zu untersuchen, wurden damit menschliche adenokarzinomische alveoläre Basalepithelzellen der Linie A-549 angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dazu wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 75 cm<sup>3</sup> Zellkulturflasche in 2 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS resuspendiert und 1:6 mit Medium verdünnt. Jeweils 0,5 ml dieser Zellsuspension wurden in kompartimentierte Objektträger ausgesät und 18 h bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen am Boden der Kammern durch vorsichtiges Aufpipettieren von jeweils 200 µl Methanol 15 min fixiert. Nach Entfernen des Methanols und Waschen der Zellen mit 200 µl 1 x PBS wurden die Zellen teilweise mit 200 µl 0,1 % (v/v) Triton X-100 2 min permeabilisiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen gefärbt. Dies erfolgte einerseits mit 40 µl Hoechst 33342 (4 µg/ml) für 1 min oder mit 40 µl MT02-Lösung der Konzentration 0,5 mg/ml für 2 min. Nach abschließendem Waschen wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einer Anregungswellenlänge von 365 nm unter Verwendung eines UV-Filters bei einer Emissionswellenlänge von 397 nm betrachtet.

## 3.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 3.5.1 Isolation von Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Staphylokokken

Für die Isolation von genomischer DNA aus Staphylokokken wurden zunächst 4 ml einer 18 h Kultur in LB-Medium in der Tischzentrifuge bei 8000 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde in 1 ml TE-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und in 100 µl 10 mM Tris-HCl mit 25 % (v/v) Saccharose pH 7,5 resuspendiert. Um die Pentaglycin-Brücken der Peptidoglycanschicht aufzubrechen, wurden 15 µl 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8,0 und 10 µl Lysostaphin (2 mg/ml) zugegeben und der Ansatz 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 375 µl TE-Puffer zugegeben sowie 225 µl 10 % SDS um die Zellmembran zu lysieren und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml), um Proteine abzubauen und 30 min bei 55°C inkubiert. Daraufhin wurden 150 µl 5 M Natriumperchlorat zugegeben um an der DNA gebundene Proteine abzulösen, der Ansatz kurz geschwenkt, mit 450 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) versetzt und 2 h im Tischrüttler kräftig geschüttelt. Hierbei werden die Proteine extrahiert, die DNA verbleibt in der wässrigen Phase. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13300 U/min wurden zweimal 400 µl des wässrigen Überstands abgenommen, zur Fällung der DNA mit je 800 µl reinem Ethanol versetzt und nach kurzem Schenken 10 min bei 13300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das DNA-Präzipitat mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

#### Tris-EDTA (TE) Puffer

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

### 3.5.2 Isolation von DNA aus Gram-negativen Bakterien

Die Isolation von DNA aus Gram-negativen Bakterien ähnelte vom Prinzip der der Isolation von DNA aus Staphylokokken. Allerdings waren aufgrund von Unterschieden im Aufbau der Zellhülle Modifikationen notwendig. Nach Zentrifugation der Kultur wurde das Präzipitat in 1 ml TNE-Puffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 600 µl TNEX-Puffer aufgenommen. Zur Hydrolyse der Peptidoglycanschicht wurden 3 µl Lysozym (50 mg/ml) zugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Der Abbau der zellulären Proteine fand nach Zugabe von 30 µl Proteinase K (20 mg/ml) für 2 h bei 65°C statt. Zur Stabilisierung der DNA wurden nun 30 µl 5 M NaCl-Lösung zugegeben und zur Fällung der DNA 1 ml reines Ethanol hinzugefügt. Der Ansatz wurde 10 min bei 13300 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat zunächst mit 200 µl reinem Ethanol und anschließend mit

200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13000 U/min wurde der Überstand entfernt, das Präzipitat 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 200 µl Reinstwasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte auch hier bei 4°C.

#### Tris-Natriumchlorid-EDTA[-Triton X-100] (TNE[X]) Puffer

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	10 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
[Triton X-100	1 % (v/v)]

### **3.5.3 Isolation von DNA aus eukaryotischen Zellen**

Zunächst wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 75 cm<sup>3</sup> Zellkulturflasche zweimal mit je 10 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde 2 ml Trizol aufgebracht, die Zellen mit einem Zellschaber von der bewachsenen Oberfläche abgekratzt und jeweils 500 µl der Zellsuspension in ein Plastikreagiergefäß überführt. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform und einminütigem Schütteln wurde 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 11600 U/min zentrifugiert. Die danach oben liegende wässrige Phase, die die gelösten Nukleinsäuren enthielt, wurde abgenommen und durch Zugabe von 150 µl reinem Ethanol die DNA gefällt. Nach kurzer Invertierung und 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die gefällte DNA nach Trocknen bei Raumtemperatur in 40 µl Reinstwasser gelöst, indem der Ansatz 5 min bei 55°C inkubiert wurde. Die Lagerung von eukaryotischer DNA erfolgte bei -20°C.

### **3.5.4 Isolation, Aufreinigung und Fällung von bakterieller Ribonukleinsäure (RNA)**

Für Transkriptionsstudien mit *S. aureus* und *S. epidermidis* wurde die gesamte RNA einer Bakterienkultur isoliert. Dazu wurde aus einer 18 h Kultur des entsprechenden Stamms 25 ml MH-Medium zu einer OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft und diese Kultur bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> ca. 0,7) inkubiert. Um die Auswirkung bestimmter Antibiotika auf das Transkriptom zu untersuchen wurde an dieser Stelle zur jeweiligen Kultur die zehnfache minimale Hemmkonzentration der entsprechenden Substanz zugegeben und 60 min inkubiert. Um die RNA während des Isolationsprozesses vor Degradation zu schützen, wurden 7 ml einer *S. aureus* Kultur bzw. 20 ml einer *S. epidermidis* Kultur mit je 7 bzw. 20 ml RNA protect® Bacteria Reagent versetzt und sofort auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden anschließend bei 4°C für 10 min bei 6000 U/min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Präzipitat in 1 ml RLT-Puffer, der mit 1 % (v/v)

$\beta$ -Mercaptoethanol versetzt war, resuspendiert. Die Proben wurden zum mechanischen Zellaufschluss in Lysing Matrix E Gefäße überführt und im Zellaufschlussgerät bei Stufe 6.0 zweimal für 45 sec gerüttelt. Nach anschließendem Abkühlen der Proben für 2 min auf Eis wurden die Glasperlen bei 13000 U/min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und zur Fällung der Nukleinsäuren mit dem gleichen Volumen reinen Ethanol vermischt. Dieser Ansatz wurde mittels RNeasy® Mini Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt, wobei dreimal mit je 500  $\mu$ l RPE-Puffer gewaschen wurde, um anhaftende Salze möglichst quantitativ zu entfernen. Die Elution erfolgte in 40  $\mu$ l Reinstwasser. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde das Eluat ein zweites Mal auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert.

Um Verunreinigungen der RNA durch DNA zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde dem gesamten Eluat 5  $\mu$ l 10 x incubation buffer sowie 5  $\mu$ l DNase I zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 175  $\mu$ l RLT-Puffer mit 1 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol sowie 125  $\mu$ l reinem Ethanol versetzt und die RNA erneut mittels RNeasy® Mini Kit aufgereinigt. Nach Konzentrationsbestimmung der RNA im Spektrophotometer wurde sie elektrophoretisch auf mögliche Degradation und Verunreinigungen überprüft und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Sollte die RNA gefällt werden, wurde der Ansatz mit 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 2,5 Volumenanteilen eiskaltem, reinen Ethanol versetzt und 2 h bei -80°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 4°C für 15 min bei 12000 U/min wurde der Überstand abgenommen, das Präzipitat mit 50  $\mu$ l eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und mit 70 % eiskaltem Ethanol überschichtet. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### **3.5.5 Synthese von komplementärer DNA (cDNA) für Transkriptom-Analysen**

Um die reverse Transkription aller isolierten RNA-Fragmente zu erreichen, wurden zunächst 10  $\mu$ g Gesamt-RNA mit 1  $\mu$ l Random Primers gemischt und mit Reinstwasser auf ein Endvolumen von 15  $\mu$ l ergänzt. Der Ansatz wurde 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Folgenden wurden 8  $\mu$ l 5 x first strand buffer, 4  $\mu$ l 0,1 M DTT, 1  $\mu$ l RNaseOUT™, 4  $\mu$ l Nukleotid-Triphosphat-Mix (je 5 mM dATP, dGTP und dTTP sowie 2 mM dCTP) und 2  $\mu$ l SuperScript™ III zugegeben. Außerdem wurden den Ansätzen mit RNA von Kulturen, die nicht mit Antibiotika inkubiert wurden 4  $\mu$ l Cy™3-dCTP und Ansätzen mit RNA von Kulturen, die mit Antibiotika inkubiert wurden 4  $\mu$ l Cy™5-dCTP zugesetzt. Durch diese Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen konnten bei der späteren Analyse der Microarrays cDNA-Fragmente aus Kulturen mit Antibiotika rot, und cDNA-Fragmente aus Kulturen ohne Antibiotika grün dargestellt werden. Die reverse Transkription der RNA erfolgte 25 min bei 50°C, worauf erneut 1  $\mu$ l reverse Transkriptase zugegeben wurde, um

möglicherweise mit der Zeit inaktives Enzym zu ersetzen. Nach weiteren 35 min bei 50°C wurde der Ansatz zur Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase 15 min auf 70°C erhitzt. Um die im Ansatz enthaltene RNA zu hydrolysieren wurde anschließend 10 µl 1 M Natronlauge zugegeben und der Ansatz 15 min bei 65°C inkubiert. Abschließend wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur zur Neutralisation des Ansatzes 25 µl 1 M Tris-HCl Lösung pH 7,5 zugegeben. Die Reinigung der cDNA-Fragmente erfolgte mittels QIAquick® PCR Purification Kit nach Herstellerangaben, wobei insgesamt dreimal mit 700 µl PE-Puffer gewaschen wurde und am Ende mit 30 µl Reinstwasser eluiert wurde. Die Konzentration der erhaltenen cDNA sowie deren Fluoreszenz wurden im Fluoreszenzspektrometer überprüft und die Ansätze in der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 3-5 µl eingengt.

### 3.5.6 Transkriptom-Analyse

Zur Untersuchung der Auswirkung von Antibiotika auf das Transkriptom von *S. epidermidis* 567 wurden Microarrays der Firma Scienion (Berlin) verwendet. Auf deren Oberfläche waren in Duplikaten 2081 PCR-Produkte von insgesamt 2282 identifizierten offenen Leserastern des Genoms von *S. epidermidis* RP62A aufgebracht, was mehr als 91 % entspricht. Um eine bestimmte Bedingung zu untersuchen, zum Beispiel die Zugabe von 10 x MHK eines Antibiotikums zu einer bakteriellen Kultur, wurden jeweils drei Microarrays mit cDNA-Fragmenten aus drei unterschiedlichen RNA-Isolationen hybridisiert. Um Auswirkungen der unterschiedlichen Fluoreszenzintensität der beiden Farbstoffe während der Analyse ausschließen zu können, wurden bei einem Ansatz die Farbstoffe vertauscht und das sich daraus ergebene umgekehrte Fluoreszenzschema bei der späteren Analyse einberechnet. Die Probenvorbereitung erfolgte wie von der Firma Scienion vorgegeben. Die beiden jeweiligen cDNA-Ansätze wurden in insgesamt 40 µl auf 49°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer vereinigt und zur Denaturierung 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf einen Chip gegeben, der in einer Hybridisierungskammer lag. Mit einem Deckglas wurde der Chip so abgedeckt, dass sich die Probe luftblasenfrei gleichmäßig verteilte. In die vier Vertiefungen der Hybridisierungskammer wurden jeweils 20 µl Reinstwasser gegeben, um ein feuchtes Milieu aufrechtzuerhalten. Nun wurde die Kammer verschlossen und drei Tage bei 49°C im Wasserbad inkubiert. Nach dieser Hybridisierungszeit wurden die Chips aus den Kammern entnommen und das Deckglas entfernt. Um restliche, nicht-gebundene cDNA zu entfernen, wurden die Chips jeweils 5 min in 2 x SSC-Puffer mit 0,02 % SDS, 0,2 x SSD-Puffer und auf 30°C vorgewärmten 0,05 x SSC-Puffer gewaschen und abschließend trocken zentrifugiert. Die Chips wurden mit dem Programm Axon GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices, Downington, USA) gescannt, wobei der PMT-(photo multiplier tube)-Wert automatisch erfasst wurde. Die anschließende Auswertung wurde mit dem Programm Acuity® 4.0 (Molecular Devices, Downington, USA) durchgeführt. Bei der Analyse wurde das

Verhältnis der Intensität des roten Fluoreszenzsignals zur Intensität des grünen Fluoreszenzsignals errechnet. Dadurch ergibt sich, dass Transkripte, die als Reaktion des Bakteriums auf das jeweilige Antibiotikum stärker exprimiert wurden einen Wert größer 1 erhalten und solche, die unter Antibiotikumseinfluss schwächer exprimiert wurden einen Wert kleiner 1. Es erfolgte eine LOWESS-Normalisierung, um die oben erwähnten unterschiedlichen Intensitäten der Fluoreszenzsignale bei der Auswertung berücksichtigen zu können sowie zur Überprüfung der statistischen Signifikanz ein One Sample t-Test mit der p-value Grenze von 0,05.

### 20 x Saline-Natriumcitrat (SSC) Puffer

NaCl	3 M
Tri-Natriumcitrat	300 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt.

Für Transkriptom-Analysen mit *S. aureus* HG001 wurde RNA wie oben beschrieben isoliert und nach Fällung auf Trockeneis zu Kooperationspartnern nach Genf geschickt. In der Gruppe von Prof. Dr. Jacques Schrenzel am Geneva University Hospital wurde fluoreszent markierte cDNA synthetisiert und diese auf Microarrays (Agilent, Palo Alto, CA, USA) hybridisiert. Diese Microarrays decken mehr als 98 % aller annotierten offenen Leseraster der Stämme N315, Mu50 (Kuroda *et al.*, 2001), MW2 (Baba *et al.*, 2002), COL (Gill *et al.*, 2005), NCTC8325, USA300 (Diep *et al.*, 2006), MRSA252 und MSSA476 (Holden *et al.*, 2004) sowie deren jeweiliger Plasmide ab. Die Daten wurden mit dem Programm GeneSpring 8.0 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA) analysiert und die statistische Signifikanz durch einen ANOVA-Test bestimmt (p-value Grenze 0,05).

### **3.5.7 Synthese von komplementärer DNA für semiquantitative RT-PCR**

Um cDNA für semiquantitative reverse Transkriptase-(RT)-PCR herzustellen wurde ein vereinfachtes Protokoll der Synthese von cDNA für Transkriptom-Analysen verwendet. Zu 4 µg von aus Staphylokokken isolierter Gesamt-RNA wurden 1 µg Random Primers und je 1 µl 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTT gegeben. Der Ansatz wurde mit Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 13 µl ergänzt und zur Bindung der Oligonukleotide an die RNA 5 min bei 65°C und anschließend 1 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl 5 x first strand buffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNaseOUT™ sowie 1 µl SuperScript™ III wurde der Ansatz zunächst 5 min bei 25°C, für die Synthese von cDNA 60 min bei 65°C und abschließend zur Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase 5 min bei 70°C inkubiert.

### **3.5.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Bereiche mittels PCR wurde das GoTaq® Flexi Polymerase System unter den folgenden Bedingungen verwendet.

<u>Standard-PCR Ansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>		
5x Buffer	4 µl	1) Denaturierung	95°C	10 min
MgCl (25 mM)	3,2 µl	2 a) Denaturierung	95°C	1 min
dNTP (je 10 mM)	0,4 µl	2 b) Annealing	T <sub>M</sub>	1 min
Oligonukleotid 1 (10 pM)	1,0 µl	2 c) Elongation	72°C	20 s / 500 bp
Oligonukleotid 2 (10 pM)	1,0 µl	3) Finale Elongation	72°C	10 min
Taq-Polymerase	0,1 µl	4) Kühlen	16°C	
DNA	1 µl (< 10 ng)			
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl			

Die jeweilige Annealing-Temperatur T<sub>M</sub> wurde dabei den verwendeten Oligonukleotiden angepasst und schwankte zwischen 58°C und 65°C. Die mit 2) bezeichneten Schritte wurden zyklisch zwischen 25 und 30mal wiederholt, die Elongationszeit 2 c) war abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Bereichs.

### 3.5.9 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente ihrer Länge entsprechend analysieren zu können, wurden sie mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden 1 oder 2 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und in entsprechende Gelkammern gegossen. Nach Abkühlung und gleichzeitiger Aushärtung des Gels wurden die Proben im Verhältnis 1:5 mit Probenauftragspuffer versetzt. Als Größenstandards wurden eine 1 kb-Ladder oder eine 100 bp-Ladder verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei 120 V. Nach 20-minütiger Färbung im Ethidiumbromidbad konnten die DNA-Fragmente auf dem UV-Monitor visualisiert werden und die erhaltenen Bilder auf Fotopapier gedruckt werden.

#### 50 x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### 3.5.10 Sequenzierung

Um die DNA-Sequenzen bestimmter Bereiche des bakteriellen Genoms zu erhalten, wurde dieser Bereich zunächst vervielfältigt, anschließend das Produkt gereinigt und einer zweiten Vervielfältigung unterzogen. Für den ersten Schritt wurde die Taq DNA Polymerase von Qiagen nach Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von 25 µl pro Ansatz verwendet. Als Vorlage diente 1 µl

aus dem betreffenden Stamm isolierter genomischer DNA. Das Programm für die PCR wurde entsprechend den Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden Fragments angepasst. Zur Kontrolle der Größe des erhaltenen PCR-Produkts wurden 5 µl über ein 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch analysiert. Stimmt die Größe des Fragments mit der erwarteten Größe überein, wurden 5 µl des Ansatzes gereinigt. Dazu wurden 1 µl alkaliner Phosphatase, 0,05 µl Exonuclease sowie 0,95 µl Reinstwasser zugegeben und zunächst 45 min bei 37°C inkubiert, worauf eine Hitzeinaktivierung der Enzyme für 10 min bei 80°C erfolgte. Mit diesen gereinigten PCR-Fragmenten wurde nun die eigentliche Sequenzierungs-PCR durchgeführt, wobei pro Ansatz nur jeweils ein Oligonukleotid (vorwärts oder rückwärts) zugegeben wurde. Die Sequenzierung wurde vom Institut für Virologie und Immunologie der Universität Würzburg durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Vektor NTI Advance 10 (Invitrogen, Darmstadt) analysiert.

<u>Sequenzierungs-PCR Ansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>		
5x Buffer	1 µl	1) Denaturierung	94°C	3 min
Oligonukleotid (10 pM)	1 µl	2 a) Denaturierung	94°C	30 sec
BigDye® Premix	1 µl	2 b) Annealing	T <sub>M</sub>	15 sec
Gereinigtes PCR-Produkt	2 µl	2 c) Elongation	60°C	4 min

Die jeweilige Annealing-Temperatur T<sub>M</sub> wurde dabei den verwendeten Oligonukleotiden angepasst. Die mit 2) bezeichneten Schritte wurden zyklisch 25mal wiederholt.

### 3.6 Radioaktive Zellmarkierung

Es sollte untersucht werden, ob eine Auswirkung von MT02 auf die bakterielle Replikation, Transkription oder Proteinbiosynthese festzustellen ist. Dazu wurde die Methode der radioaktiven Zellmarkierung verwendet und diese wie von Onishi *et al.* beschrieben angewendet (Onishi *et al.*, 1996). Aus einer 18 h Kultur von *S. aureus* HG001 wurden 25 ml MH-Medium zu einer OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Pro Ansatz wurden 5 ml der Kultur in ein 15 ml Reagenzgefäß aus Plastik überführt, in denen die jeweiligen Antibiotika vorgelegt waren. Dabei handelte es sich neben der zu untersuchenden Substanz MT02 um die Kontrollantibiotika Ciprofloxacin für die Replikation, Rifampicin für die Transkription und Gentamicin für die Proteinbiosynthese. Alle Antibiotika wurden entsprechend ihrer zehnfachen MHK eingesetzt. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Vorstufen zugegeben. Diese waren Methyl-[<sup>3</sup>H]-Thymidin, 5,6-[<sup>3</sup>H]-Uracil und 4,5-[<sup>3</sup>H]-L-Leucin, jeweils für die Untersuchung von Replikation, Transkription und Proteinbiosynthese. Die Endkonzentrationen betragen dabei 1 µCi/ml

für Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin und 5,6- $^3\text{H}$ -Uracil sowie 5  $\mu\text{Ci/ml}$  für 4,5- $^3\text{H}$ -L-Leucin. Die Plastikgefäße wurden anschließend in einem Hybridisierungssofen fixiert und bei 37°C und höchster Rotationsstufe drehend inkubiert. 30, 60 und 120 min nach Zugabe der radioaktiv markierten Vorstufen wurden Proben entnommen und 4 min bei 8000 U/min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zum Entfernen von extrazellulär anhaftenden radioaktiven Stoffen zweimal mit je 100  $\mu\text{l}$  1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die gewaschenen Zellen in 100  $\mu\text{l}$  1 x PBS resuspendiert, mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit gut vermischt und im Szintillationszähler die radioaktive Strahlung bestimmt. Um den Einfluss der Antibiotika auf das Wachstum der Kulturen unter diesen Bedingungen festzustellen, wurden Vergleichskulturen ohne radioaktive Markierung im Hybridisierungssofen inkubiert und nach gleicher Inkubationszeit die  $\text{OD}_{600}$  bestimmt. Zudem dienten Kulturen mit radioaktiv markierten Vorstufen, jedoch ohne Antibiotika als Positivkontrollen, die Bezugswerte für die Auswertung lieferten.

## 3.7 Bindungsstudien

### 3.7.1 Verdrängungsversuche

Wenn Ethidiumbromid DNA interkaliert führt diese Bindung zu einer Änderung des Absorptionsspektrums und der Intensität der Fluoreszenz-Emission nach Anregung durch UV-Strahlung. Um eine mögliche Bindung von Substanzen mit DNA zeigen zu können, wurde genomische DNA zunächst mit oder ohne den Substanzen für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf eine Ethidiumbromid enthaltende Agaroseplatte getropft. Falls die Substanzen an DNA binden, kann Ethidiumbromid nicht mehr interkalieren, wodurch auf dem UV-Schirm kein Signal mehr nachweisbar ist.

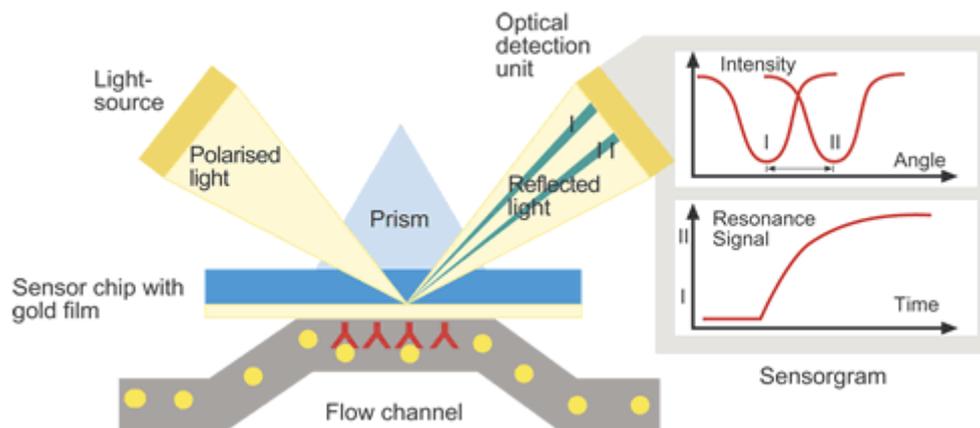
### 3.7.2 Gelretardation

Hierfür wurde zunächst ein ca. 250 bp großes DNA-Fragment des *lexA*-Gens von genomischer DNA von *S. aureus* HG001 amplifiziert. Nach Aufreinigung mittels PCR-Purifikation Kit wurde dieses PCR-Produkt mit oder ohne den zu untersuchenden Substanzen für unterschiedliche Zeit bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Produkte teilweise erneut aufgereinigt und nach erfolgter Gelelektrophorese in einem 2 % Agarosegel auf dem UV-Schirm betrachtet.

### 3.7.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Die hier erläuterten Studien wurden am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II am Biozentrum der Universität Würzburg durchgeführt. Das Prinzip der Oberflächen-Plasmon-Resonanz ist in Abbildung

3.1 dargestellt. Dabei wird polarisiertes Licht auf einen Biosensorchip fokussiert, der an der Unterseite mit einer Goldschicht bedeckt ist. An dieser Schicht wird das Licht reflektiert und anschließend von einem Detektor registriert. Die Unterseite der Goldschicht wurde mit Streptavidin beschickt und ragt in eine Durchflusskammer. Zunächst wurden nun biotinylierte Doppelstrang-Oligonukleotide in die Kammer eigeleitet, welche an Streptavidin binden und dieses absättigen. Das dadurch entstandene Reflexionssignal wurde als Grundwert angenommen. Binden nun weitere Stoffe an die Oligonukleotide führt das zu einer Änderung des Reflexionswinkels des eingestrahlichten polarisierten Lichts, was detektiert werden kann.



**Abbildung 3.1:** Prinzip der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (nach Longqin Hu, Rutgers University School of Pharmacy, Department of Medicinal Chemistry, New Brunswick, USA)

Die durchgeführten Studien hatten das Ziel, eine Bindung von MT02 an DNA, in diesem Fall doppelsträngige Oligonukleotide, nachzuweisen. Die hierbei verwendeten Chips waren vom Typ CM5 (Nickel *et al.*, 2005), der verwendete Laufpuffer HBS150. Die Durchflussrate betrug 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  bei einer Temperatur von 25°C. Die Assoziationszeit betrug 5 min, die Dissoziationszeit 20 min. Da nach diesen 20 min das Signal wieder auf den Grundwert zurückgekehrt war, also keine Bindung von MT02 an die Oligonukleotide mehr detektierbar war, wurden die Chips zwischen den Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an MT02 nicht regeneriert. Die Auswertung der aufgezeichneten Sensogramme erfolgte mit dem Programm BIAevaluation 2.2.4 (Biacore, GE Healthcare, Freiburg).

#### HBS150 Puffer

HEPES pH 7,4	10 mM
NaCl	150 mM

### 3.8 Zytotoxizitätstest

Der Effekt von antibakteriellen Substanzen auf das Wachstum von eukaryotischen Zellen wurde wie von Ponte-Sucre *et al.* beschrieben bestimmt (Ponte-Sucre *et al.*, 2006). Als Zellen wurden die aus der Maus stammende Makrophagen Zelllinie J-774.1, die menschliche embryonale Nierenzelllinie 293T, die menschliche adenokarzinomische alveoläre Basalepithelzelllinie A-549 sowie die menschliche adenokarzinomische kolorektale Epithelzelllinie Caco-2 eingesetzt. Als Medium wurde RPMI 1640 verwendet, dem 10 % fötales Kalbsserum, 100 µg/ml Penicillin, 50 µg/ml Gentamicin und 50 µM β-Mercaptoethanol zugesetzt worden war. Die Zellen wurden in jeweils 200 µl zu einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml mit oder ohne zu untersuchender Substanz in 96-Kavitäten Mikrotiterplatten bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h wurden pro Kavität 20 µl alamarBlue® zugegeben. Dieses Reagenz enthält den blauen, zellpermeablen Farbstoff Resazurin, welcher im reduzierenden Milieu des Zytoplasmas lebender Zellen zu dem roten Stoff Resorufin umgesetzt wird. Durch die Absorptionsmessung bei 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm nach 24, 48 und 72 h weiterer Inkubation konnte somit verifiziert werden, ob die Zellen durch die Zugabe von MT02 abgetötet wurden. Dabei wurde die Absorption der Kontrolle ohne MT02 als 100 % Wachstum angenommen. Die Gesamtkonzentration von DMSO war nie größer als 1 % (v/v) und hatte somit keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen.

### 3.9 Versuche zur intrazellulären Wirksamkeit von MT02

Die Auswirkung von MT02 auf intrazelluläre Bakterien wurde mittels Invasionsassay untersucht. Die verwendeten Zellen stammten dabei von der menschlichen, embryonalen Nierenzelllinie 293T, der Bakterienstamm war *S. aureus* HG001. Das Medium zur Zellkultivierung war DMEM mit 10 % hitzeinaktiviertem, fötalem Kalbsserum, die Bakterien wurden in B-Medium kultiviert. Um eine bessere Adhäsion der Zellen beim späteren Versuch zu gewährleisten, wurden zunächst 12-Kavitätenplatten mit je 1 ml pro Kavität einer 0,4 %igen Gelatinelösung beschickt. Nach Inkubation für 24 h bei 4°C wurde der Überstand entfernt und die Platten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Zellen einer konfluent bewachsenen 75 cm<sup>3</sup> Zellkulturflasche wurden in 10 ml Medium resuspendiert und in der Neubauerkammer die Lebendzellzahl bestimmt. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau vermischt, 10 µl davon auf die Zählkammer aufgebracht und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Aus der Zellsuspension wurde nun ein Volumen entsprechend  $5 \times 10^5$  Zellen pro Kavität in die vorbereiteten 12-Kavitätenplatten verteilt, 1 ml Medium zugegeben und die Zellen über Nacht inkubiert. Dadurch erhielt man am nächsten Tag eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  adhärirter Zellen pro Kavität. Aus einer 18 h Bakterienkultur wurde in Zellkulturmedium eine

Suspension mit  $1 \times 10^7$  Bakterien/ml vorbereitet. Nachdem das Medium der Kavitätenplatten abgesaugt worden war, wurde pro Kavität 1 ml der Bakteriensuspension zugegeben, 2 min bei 1200 U/min zentrifugiert und zur Invasion 1 h inkubiert. Um extrazellulär verbliebene Bakterien abzutöten, wurden pro Kavität 100 µg Gentamicin sowie 20 µg Lysostaphin zugegeben und weitere 45 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vom Boden der Kavitäten gelöst, in 50 ml Plastikreagiergefäße überführt und 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 25 ml Medium resuspendiert und je 5 x 5 ml in die Vertiefungen einer 6-Kavitätenplatte ausgebracht. Nach Zugabe von Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen wurde weitere 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Plastikreagiergefäße überführt und 4 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat zur Lyse der Zellen in je 1 ml 1 % Saponin-Lösung in 1 x PBS resuspendiert. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine Verdünnungsreihe der Suspension angefertigt und in Duplikaten auf B-Agar ausplattiert. Die Auswertung erfolgte nach 24 h Inkubation der Platten bei 37°C.

### **3.10 In vivo-Untersuchungen**

#### **3.10.1 Toxizitätsstudien**

Für Verträglichkeitsstudien von MT02 in Mäusen wurden weibliche, 6-8 Wochen alte BALB/c Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 18 bis 20 g verwendet. Diesen wurden entweder intraperitoneal (i. p.) oder intravenös (i. v.) in die Schwanzvene einmalig verschiedene Mengen an MT02, gelöst in 0,9 % NaCl-Lösung gespritzt und die Tiere danach im Hinblick auf auffällige Verhaltensweisen oder gesundheitliche Beeinträchtigungen beobachtet.

#### **3.10.2 Wirksamkeitsstudien**

Die Wirksamkeit von MT02 wurde in einem Maus-Nierenabszessmodell untersucht. Zunächst wurde eine Bakteriensuspension für die Infektion vorbereitet. Dazu wurden 20 ml einer 18 h Kultur von *S. aureus* HG001 in B-Medium 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert und dreimal mit je 5 ml 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde durch Resuspension in 0,9 % NaCl-Lösung eine Zellzahl von  $1 \times 10^9$  Bakterien/ml eingestellt. Bei einem Injektionsvolumen von 50 µl ergab das eine Infektionsdosis von  $5 \times 10^7$  Bakterien. Um die genaue Menge an injizierten Bakterien festzustellen, wurden aus der für die Infektion hergestellten Bakteriensuspension Proben genommen, verdünnt und auf B-Agar ausplattiert. Durch anschließendes Auszählen der Kolonien konnte die tatsächliche Anzahl an injizierten Bakterien ermittelt werden. Die Infektion der BALB/c Mäuse erfolgte intravenös über die Schwanzvene an Tag 0. Eine Stunde nach der Infektion wurde die erste Wirkstoff-Dosis

verabreicht. Dies geschah entweder i. p. mit einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  oder i. v. über die Schwanzvene mit einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$ . Als Kontrolle für eine erfolgreiche Infektion wurde 0,9 % NaCl-Lösung verabreicht, Vancomycin diente als Positivkontrolle der Behandlung. Die Gabe von Antibiotika wurde teilweise bei mehreren Dosen pro Tag über 4 Tage fortgesetzt. Vor der Infektion und über den ganzen Versuchszeitraum wurde täglich das Gewicht der Tiere aufgezeichnet. An Tag 4 wurden die Tiere euthanasiert, sezziert, die Organe auf äußere Auffälligkeiten untersucht sowie die Nieren entnommen. Um die Nieren hinsichtlich der enthaltenen Bakterienpopulation zu untersuchen wurden sie in 2 ml 1 x PBS homogenisiert, von der erhaltenen Suspension Verdünnungsreihen angefertigt und auf MKP-Agar ausplattiert. Nach 48 h Inkubation wurden die Platten ausgewertet.

### 3.11 Erzeugung MT02-resistenter Stämme

Um gegen MT02 resistente Stämme von *S. aureus* zu erhalten, wurden 4 ml Flüssigkulturen in MH-Medium angesetzt. Dem Medium wurden sukzessive ansteigende Konzentrationen an MT02 zugegeben und jeweils 50  $\mu\text{l}$  der Vorgängerkulturen ein- oder zweimal pro Tag in frisches Medium mit der nächsthöheren Konzentration an MT02 überimpft. Zu Beginn wurden subinhibitorische Konzentrationen eingesetzt, angefangen mit 0,5 x MHK. Diese wurden in Schritten von 0,1 x MHK bis zum Erreichen von 2 x MHK gesteigert, worauf sich die Konzentrationserhöhung in Schritten von 0,5 x MHK bis zu einer Gesamtkonzentration von 10 x MHK steigern ließ. Ab dieser Konzentration wurde in Stufen von 1 x MHK bis zum Erreichen von 25 x MHK erhöht und von dort an in Schritten von 2,5 x MHK bis zu einer Endkonzentration von 100 x MHK. Bei diesem Wert wurden die Kulturen als gegen MT02 resistent betrachtet.

Zum Nachweis, dass es sich bei den resistenten Bakterien nach wie vor um *S. aureus* handelt, wurde zunächst mikroskopisch die Morphologie untersucht sowie die für Staphylokokken spezifische, thermostabile Nuclease (*nuc*) mittels PCR wie von Brakstad *et al.* beschrieben nachgewiesen (Brakstad *et al.*, 1992). Zudem wurde ein vergleichendes Stoffwechselprofil mit dem API® Staph Kit nach Herstellerangaben generiert und ein Teil der 16 S ribosomalen DNA (rDNA) wie oben beschrieben sequenziert.



## 4. Ergebnisse

In Vorarbeiten wurde innerhalb eines Substanz-Screenings ein Molekül gefunden, welches starke antibakterielle Aktivität gegen die Stämme *S. aureus* 8325 und *S. epidermidis* RP62A zeigte und gegen humane Nierenepithelzellen 293T nicht zytotoxisch war. Diese vielversprechende neue Substanz, welche die Bezeichnung MT02 trägt und zur Gruppe der bisquartären Bisnaphthalimiden gehört, sollte daraufhin genauer untersucht werden. Zunächst wurde das Wirkungsspektrum gegen verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterien getestet sowie der zeitliche Verlauf der Wirksamkeit gegen *S. aureus* untersucht. Im Anschluss daran sollte der Wirkungsmechanismus gegen *S. aureus* aufgeklärt werden. Dazu wurde zunächst die Methode der radioaktiven Ganzzellmarkierung angewendet sowie Transkriptomanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien ließen einen Wirkungsmechanismus vermuten, welcher mit der bakteriellen DNA-Replikation zusammenhängt, weshalb weitere Experimente zur DNA-Bindung von MT02 folgten. Nach weiteren Zytotoxizitätstests wurde die Wirkung von MT02 auf intrazelluläre *S. aureus* untersucht. Außerdem wurden Tierversuche zur Verträglichkeit von MT02 in der Maus durchgeführt, sowie untersucht, ob MT02 im Maus-Nierenabszessmodell wirksam ist.

Zusätzlich wurde eine MT02-resistente Mutante des Stamms *S. aureus* HG001 generiert, welche bei Inkubation und Wachstum mit hohen Konzentrationen an MT02 einen roten Phänotyp entwickelte. Durch Transkriptionsanalysen sollten mögliche Ursachen für die Resistenz gefunden werden. Außerdem wurden erste Versuche zur Identifizierung des roten Farbstoffs unternommen.

In einem zweiten Projekt wurden vergleichende Transkriptionsstudien mit *S. epidermidis* und verschiedenen Antibiotika durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten dazu dienen, den Wirkungsmechanismus neuer Wirkstoffe anhand ihres Transkriptionsprofils einordnen zu können. Dazu wurde die Veränderung des Transkriptionsprofils von *S. epidermidis* 567 durch Antibiotika mit bekanntem Wirkungsmechanismus erstellt und mit dem durch neue Wirkstoffe veränderten Transkriptionsprofil verglichen.

### 4.1 Studien zu Wirkung und Wirkungsmechanismus von MT02

#### 4.1.1 Bestimmung von Minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs)

Die standardisierte Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration eines Antibiotikums gegen Bakterien ergibt Werte, welche miteinander verglichen werden können und so zur relativen Bestimmung der in-vitro-Aktivität von neuen antibiotischen Substanzen dienen können.

Da eine Anzahl von hier durchgeführten Studien den Einsatz von Antibiotika mit bekanntem Wirkungsmechanismus erforderten, wurden die MHK-Werte dieser Vergleichssubstanzen gegen die Bakterien *Staphylococcus aureus* HG001 und *S. epidermidis* 567 bestimmt (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1:** MHK-Werte von *S. aureus* HG001 und *S. epidermidis* 567 gegen Antibiotika mit bekanntem Wirkungsmechanismus

Antibiotikum	MHK-Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
	<i>S. aureus</i> HG001	<i>S. epidermidis</i> 567
Ciprofloxacin	0,2	64
Gentamicin	0,38	0,06
Oxacillin	6,25	2
Rifampicin	0,013	nicht bestimmt
Levofloxacin	0,078	nicht bestimmt

Nun wurde zunächst untersucht, welche Wirkung MT02 gegen weitere Gram-positive und Gram-negative Bakterien zeigt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Tabellen 4.2a und 4.2b aufgelistet.

**Tabelle 4.2a:** MHK-Werte von MT02 gegen Gram-positive Bakterien

Bakterium	MHK-Wert [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Bakterium	MHK-Wert [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
113	1,25	567	2,5
325	0,63	ATCC12228	10
8325	2,5	RP62A	5
COL	2,5	<i>Bacillus subtilis</i> 168	5
HG001	0,63	<i>Listeria monocytogenes</i>	5
MA12	1,25	<i>Streptococcus</i>	
Newman	0,63	<i>agalacticae</i> S44	10
RKI 05-01702	0,63	<i>agalacticae</i> S45	2,5
RKI 05-02040	0,31	<i>canis</i> S23	5
RKI 07-03310	2,5	<i>equi</i> S31	10
RKI 08-00010	1,25	<i>pyogenes</i> S36	10
RKI 08-00248	0,15	<i>suis</i> S2	2,5
RKI 08-00465-1	0,63	<i>mutans</i> UA159	> 160 <sup>a</sup>
RKI 08-00470	1,25	<i>pneumoniae</i> #wt37	20 <sup>a</sup>
RKI 08-00966	5	<i>pneumoniae</i> 107	40 <sup>a</sup>
SH1000	1,25	<i>pneumoniae</i> 111	5 <sup>a</sup>
USA300	0,31	<i>pneumoniae</i> 165	20 <sup>a</sup>
Xen29	1,25	<i>pneumoniae</i> 261	40 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Diese Stämme wurden unter statischen, microaerophilen Bedingungen getestet.

Wie aus Tabelle 4.2a ersichtlich ist, besitzt MT02 eine gute Aktivität gegen Gram-positive Bakterien. Die niedrigsten MHK-Werte wurden dabei gegen *S. aureus*-Stämme erzielt. Diese lagen zumeist bei 0,625 oder 1,25 µg/ml. Gegen die stark virulente Methicillin-resistente klonale Linie USA300 ergab sich ein niedrigerer MHK-Wert von 0,31 µg/ml. Weitere getestete Bakterienspezies, welche nicht der Gattung *Staphylococcus* angehören, zeigten höhere MHK-Werte von 2,5 bis 40 µg/ml, jedoch wirkte MT02 auch gegen diese inhibitorisch. Lediglich das Wachstum von *Streptococcus mutans* UA159 konnte durch die hier getesteten Konzentrationen an MT02 nicht beeinflusst werden.

Des Weiteren wurde MT02 auch auf die Aktivität gegen Gram-negative Bakterien untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2b dargestellt.

**Tabelle 4.2b:** MHK-Werte von MT02 gegen Gram-negative Bakterien

Bakterium	MHK-Wert [µg/ml]	Bakterium	MHK-Wert [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i>		<i>Citrobacter coseri</i>	160
ETEC-1	80	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 160
EAEC	80	<i>Proteus mirabilis</i>	> 160
EHEC	80	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 160
ETEC-2	20	<i>Salmonella typhimurium</i>	> 160
MENEC	160	<i>Serratia marcescens</i>	> 160
UPEC	80	<i>Shigella dysenteria</i>	80

Im Gegensatz zu den Gram-positiven Bakterien konnte keine gute Wirksamkeit von MT02 gegen Gram-negative Bakterien festgestellt werden. Lediglich das enterotoxische *E. coli*-Isolat zeigt mit 20 µg/ml eine gewisse Sensitivität gegenüber MT02, welche jedoch im Vergleich zu den getesteten *S. aureus*-Stämmen wesentlich geringer ist. Zusammenfassend besaß MT02 eine starke Wirksamkeit gegen Gram-positive Bakterien mit den niedrigsten MHK-Werten gegen *S. aureus*-Stämme, wohingegen kaum Wirkung gegen Gram-negative Bakterien zu beobachten war.

Zusätzlich zu MT02 wurden für Untersuchungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung auch Mononaphthalimide sowie weitere bisquartäre Bisnaphthalimide auf ihre Wirkung gegen *S. aureus* HG001 getestet. Die Ergebnisse dieser Studien sind in Tabelle 4.3 aufgelistet.

**Tabelle 4.3:** MHK-Werte von verschiedenen Naphthalimiden gegen *S. aureus* HG001

Bisnaphthalimide	MHK-Wert [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Mononaphthalimide	MHK-Wert [ $\mu\text{g/ml}$ ]
MT04	40	MT01	> 160
MTFP03	5	MT03	20
MTFP04	5	MT51	> 160
MTFP05	10	MT58	> 160
MTFP06 = MT109	20		
MTFP07	40		
MTFP08	10		
MTFP09	10		
MTFP10	5		
MTFP11	5		
MTFP12	1,25		

MT03 (siehe Abbildung 2.1 und Tabelle 2.5) zeigte als einziges des getesteten Mononaphthalimide antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* HG001, jedoch lag der MHK-Wert mit 20  $\mu\text{g/ml}$  relativ hoch. Das Bisnaphthalimid MT04, welches sich zum stark aktiven MT02 nur durch die verschiedene Position der Nitrogruppen am Aromaten unterscheidet (siehe Abbildung 2.2 und Tabelle 2.6), zeigte ebenfalls nur geringe Aktivität. Die bisquartären Derivate mit unterschiedlichen Kettenlängen (siehe Abbildung 2.2 und Tabelle 2.6) der Linkerregion zeigten bei drei und vier sowie bei zehn bis zwölf Methylgruppen gute Aktivität, bei fünf bis neun Methylgruppen jedoch kaum. Die aktivste Substanz dieser Reihe war MTFP12 mit einer MHK von 1,25  $\mu\text{g/ml}$ , welches mit zwölf Methylgruppen das Derivat mit der längsten Linkerregion ist.

In weiteren MHK-Tests sollte der mögliche Synergismus von MT02 und Antibiotika mit bekanntem Wirkungsmechanismus gegen *S. aureus* HG001 getestet werden. Dazu wurden subinhibitorische Konzentrationen der potentiell synergistischen Antibiotika mit subinhibitorischen Konzentrationen an MT02 kombiniert und die Auswirkung auf das bakterielle Wachstum untersucht. Auf diese Art wurden jeweils die Antibiotika Ciprofloxacin, Levofloxacin, Gentamicin und Oxacillin getestet. Dabei hatte nur die Kombination von MT02 mit den DNA-Gyrasehemmern Ciprofloxacin und Levofloxacin synergistische Wirkung bei der Inhibition des Wachstums von *S. aureus*. Wurde von MT02 0,5 x MHK eingesetzt, waren von Ciprofloxacin und Levofloxacin jeweils nur 0,25 x MHK nötig, um das bakterielle Wachstum zu unterbinden. Bei 0,25 x MHK MT02 waren von Ciprofloxacin 0,5 x MHK nötig, bei Levofloxacin jedoch 1 x MHK. Somit kann für die Kombination von MT02 mit Ciprofloxacin eine synergistische Wirkung postuliert werden. Dies gilt für Levofloxacin nur eingeschränkt, da hier von MT02 mindestens die halbinhibitorische Konzentration eingesetzt werden musste.

Außerdem wurde getestet, ob die Zugabe eines Antioxidans die Toleranz von *S. aureus* HG001 gegenüber MT02 verändern kann. Dazu wurde das für die MHK-Bestimmung eingesetzte Medium mit unterschiedlichen Mengen an Ascorbinsäure versetzt. Tabelle 4.4 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

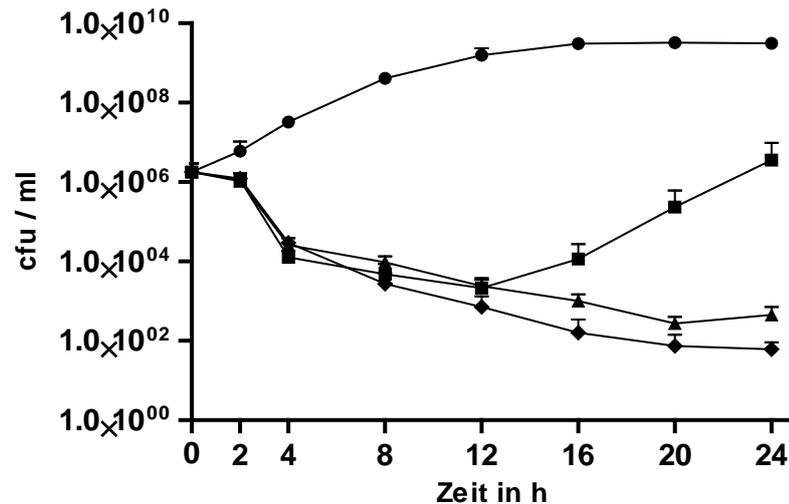
**Tabelle 4.4:** MHK-Werte von MT02 gegen *S. aureus* HG001 nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an Ascorbinsäure

Konzentration an Ascorbinsäure [mM]	MHK-Wert [ $\mu\text{g/ml}$ ]
0	0,63
0,5	0,63
1	2,5
5	10
10	10
50	< 0,31

Durch die Zugabe von 0,5 - 10 mM Ascorbinsäure konnte die Toleranz gegen MT02 deutlich gesteigert werden. Dies führte zu einer bis zu 15fach erhöhten MHK. Geringere Konzentrationen als 1 mM Ascorbinsäure hatten keinen Einfluss. Bei Zugabe von 50 mM Ascorbinsäure fiel der MHK-Wert unter den Wert, welcher durch MT02 alleine erreicht wurde. Ab einer gewissen Konzentration konnte demnach Ascorbinsäure die antibakterielle Wirkung von MT02 abschwächen, bei zu hohen Konzentrationen scheint es jedoch selbst inhibitorisch auf das bakterielle Wachstum zu wirken.

#### 4.1.2 Killing-Eigenschaften von MT02

Zur genaueren Charakterisierung der antibakteriellen Wirkung von MT02 wurde die Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen Kulturen von *S. aureus* HG001 zugesetzt und die Anzahl lebender Bakterien über die Zeit verfolgt. Für diese sogenannten Killing-Kurven wurde ein Inokulum verwendet, welches im Vergleich zu den Versuchen zur MHK-Bestimmung doppelt so groß war. Somit konnten Kulturen auch mit höheren Konzentrationen als der vorher bestimmten MHK von MT02 wachsen. Die Anzahl der lebenden Bakterien wurde über einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden verfolgt. Die Untersuchung der Bakterienzahl innerhalb von 90 Minuten nach Zugabe von MT02 ergab keine Veränderung. Erst nach einem Zeitraum von 120 Minuten konnte einerseits eine Vermehrung der Bakterienzahl in der Kontrollkultur ohne MT02 beobachtet werden. Andererseits fand ab dem gleichen Zeitpunkt eine Verringerung der Lebendzellzahl unter dem Einfluss von MT02 statt.



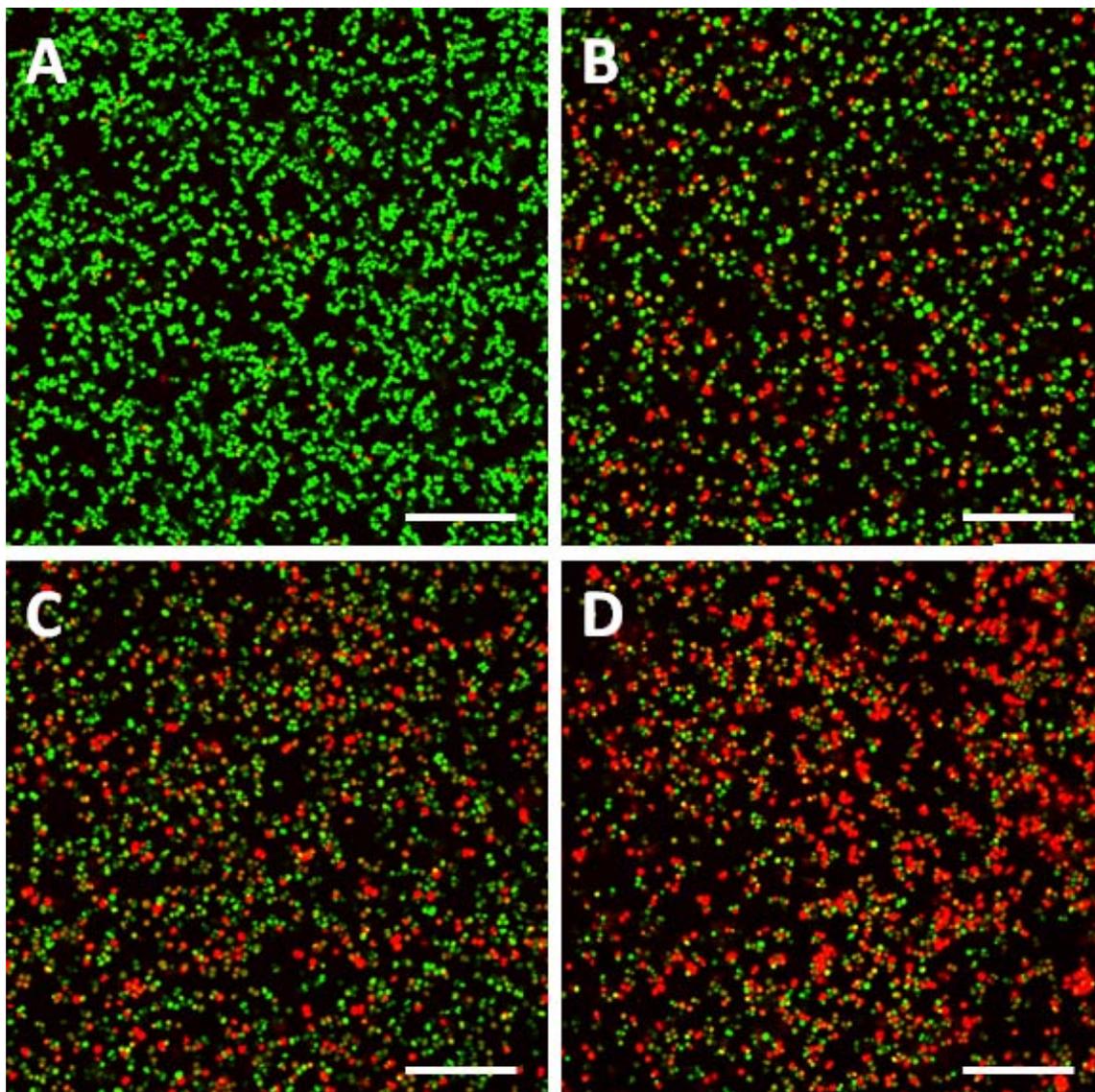
**Abbildung 4.1:** Anzahl von Kolonie-bildenden Einheiten (cfu) von *S. aureus* HG001 über einen Zeitraum von 24 h nach Zugabe von (●) 0 x, (■) 1 x, (▲) 2 x und (◆) 4 x MHK MT02; Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an

Wie in Abbildung 4.1 zu erkennen ist, stieg die Anzahl der lebenden Bakterien in der Kultur ohne MT02 bis sechzehn Stunden nach Beginn der Untersuchung an und blieb im Anschluss daran gleich. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von sowohl 1 x, 2 x als auch 4 x MHK nach einer Verzögerungsphase von ca. zwei Stunden zum Absterben von Bakterien. Innerhalb der nächsten zwölf Stunden nahm dabei die Anzahl lebender Bakterien unter allen drei Bedingungen um den Faktor 1000 ab. Anschließend fand bei der Kultur, der 1 x MHK MT02 zugesetzt wurde, wieder Wachstum statt, wobei die Anzahl lebender Bakterien bis zum Versuchsende nach 24 Stunden wieder auf den anfänglichen Wert von ca.  $1 \times 10^6$  Bakterien/ml anstieg. Im Gegensatz dazu nahm die Anzahl lebender Bakterien in den Kulturen mit 2 x bzw. 4 x MHK weiter ab und erreichte nach 24 Stunden einen Wert von ca. 450 bzw. 60 Bakterien/ml.

Bei einer Bakterienzahl von  $1 \times 10^6$  Bakterien/ml, was der doppelten Anzahl im Vergleich zu den MHK-Studien entspricht, war demzufolge die doppelte Konzentration an MT02 ausreichend, um die Lebendzellzahl um den Faktor  $10^3$  zu verringern. Bei Einsatz der vierfachen MHK verringerte sich die Bakterienzahl um den Faktor  $10^4$ . Geringere Konzentrationen hatten eine Abnahme der Lebendzellzahl innerhalb der ersten zwölf Stunden zur Folge, wonach sich die Bakterienpopulation allerdings wieder erholte und die Zellzahl zunahm.

Um die Abnahme der lebenden Bakterien einer Kultur nach Zugabe von MT02 visualisieren zu können, wurden Lebend-Tot-Färbungen von Bakterien nach dreistündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an MT02 durchgeführt. Die Anzahl an Bakterien betrug dabei ca.

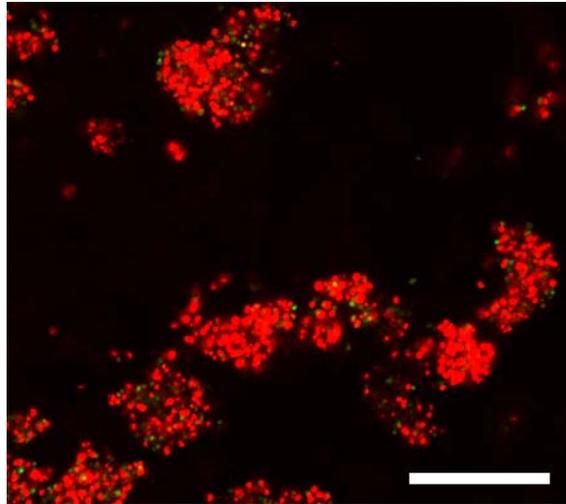
$6 \times 10^8$  Bakterien/ml um im Sichtfeld des Mikroskops eine ausreichende Anzahl an Bakterien erfassen zu können. Aufgrund der hohen Zellzahlen wurden MT02-Konzentrationen von 10 x, 20 x und 50 x MHK verwendet.



**Abbildung 4.2:** Konfokal-mikroskopische Aufnahmen der Lebend-Tot-Färbung von *S. aureus* HG001 nach dreistündiger Inkubation mit A) 0 x, B) 10 x, C) 20 x, D) 50 x MHK MT02; grün gefärbte Bakterien leben, rot gefärbte sind abgestorben; Balken: 30  $\mu$ m

Ohne Zugabe von MT02 waren kaum rot gefärbte Bakterien zu erkennen (Abbildung 4.2 A). Erst unter dem Einfluss ansteigender Konzentrationen von MT02 (Abbildung 4.2 B-D) nahm die Anzahl an rot gefärbten und somit toten Zellen zu. Dass selbst nach Zugabe von 50 x MHK MT02 nicht alle Zellen tot waren, liegt an der wesentlich höheren Zellzahl von ca.  $5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Bakterien pro ml in diesem Versuchsansatz. Im Vergleich zu  $5 \times 10^5$  Bakterien pro ml bei der Bestimmung der MHK wurden somit mindestens 100fach mehr Bakterien eingesetzt.

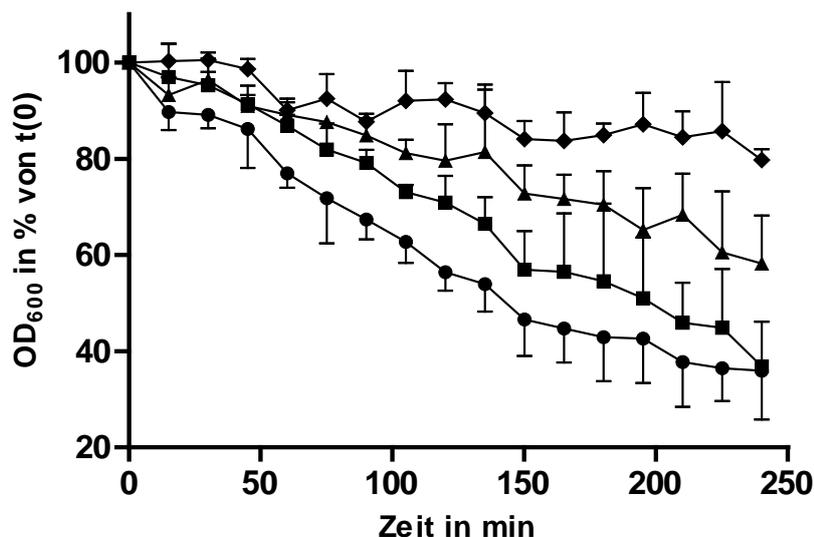
Im Fall der Zugabe von 50 x MHK MT02 konnten viele Zellaggregate beobachtet werden (Abbildung 4.3), welche überwiegend aus toten Zellen bestanden. Sie umfassten mehrere Hundert Zellen pro Aggregat und waren biofilmartig zusammengelagert. Jedoch hafteten sie nicht fixiert am Boden der Objektträger an, sondern kamen frei in der Suspension schwebend vor.



**Abbildung 4.3:** Konfokal-mikroskopische Aufnahmen der Lebend-Tot-Färbung von Zellaggregaten von *S. aureus* HG001 nach dreistündiger Inkubation mit 50 x MHK MT02; grün gefärbte Bakterien leben, rot gefärbte sind abgestorben; Balken: 30 µm

### 4.1.3 Einfluss von MT02 auf die Autolyse von *S. aureus* HG001

Es wurde untersucht, ob MT02 die Autolyseeigenschaft von *S. aureus* verändert. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an MT02 zu Kulturen von *S. aureus* HG001 gegeben, diese nach einstündiger Inkubation gewaschen und anschließend der Verlauf der optischen Dichte in Autolysepuffer über vier Stunden verfolgt (Abbildung 4.4).

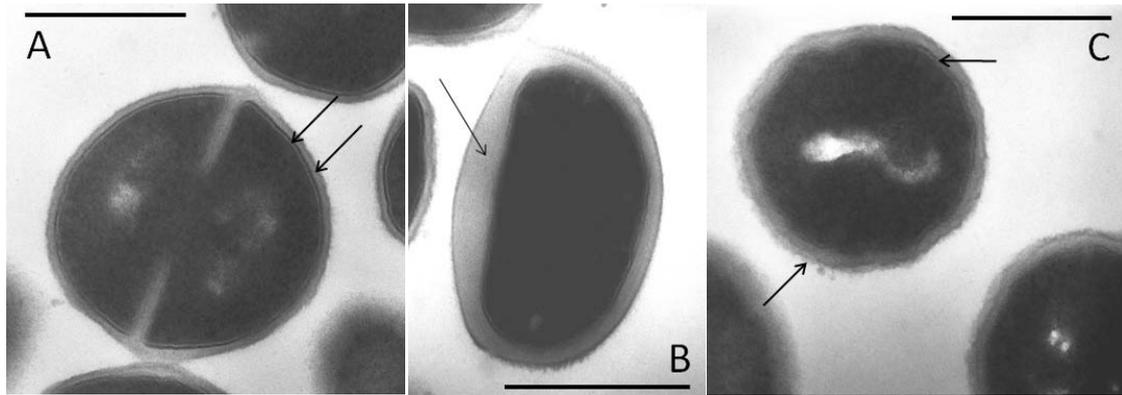


**Abbildung 4.4:** Auswirkung der vorherige Inkubation von *S. aureus* HG001 mit (●) 0 x, (■) 1 x, (▲) 10 x und (◆) 100 x MHK MT02 auf die Entwicklung der optischen Dichte in Autolysepuffer; Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an

Die optische Dichte nahm aufgrund von Zellyse ohne MT02 innerhalb von vier Stunden auf weniger als 40 % des Anfangswertes ab. Dies war auch nach Zugabe von 1 x MHK MT02 der Fall, jedoch nahmen die OD-Werte anfänglich nicht so stark ab wie bei der Kontrolle. Der geringe Einfluss dieser Substanzmenge lässt sich auf die vergleichsweise hohe Zellzahl von ca.  $7 \times 10^8$  Bakterien/ml zurückführen. Durch Zugabe höherer Konzentrationen von 10 x bzw. 100 x MHK MT02 verringerte sich die OD innerhalb von vier Stunden auf 60 bzw. 80 % des Anfangswertes. Die Anwesenheit von MT02 hatte also Einfluss auf die Autolyserate von *S. aureus* und schwächte diese bei höheren Konzentrationen deutlich ab.

#### 4.1.4 Transmissionselektronenmikroskopie von *S. aureus* HG001 nach Behandlung mit MT02

Um eine mögliche Auswirkung von MT02 auf die zelluläre Struktur von Staphylokokken zu untersuchen, wurde *S. aureus* HG001 mit verschiedenen Konzentrationen an MT02 inkubiert, die Zellen fixiert, entwässert, kontrastiert, in Harz eingebettet und Ultradünnschnitte angefertigt. Diese wurden im Transmissionselektronenmikroskop auf Auffälligkeiten der Zellstruktur und Zellform hin betrachtet.



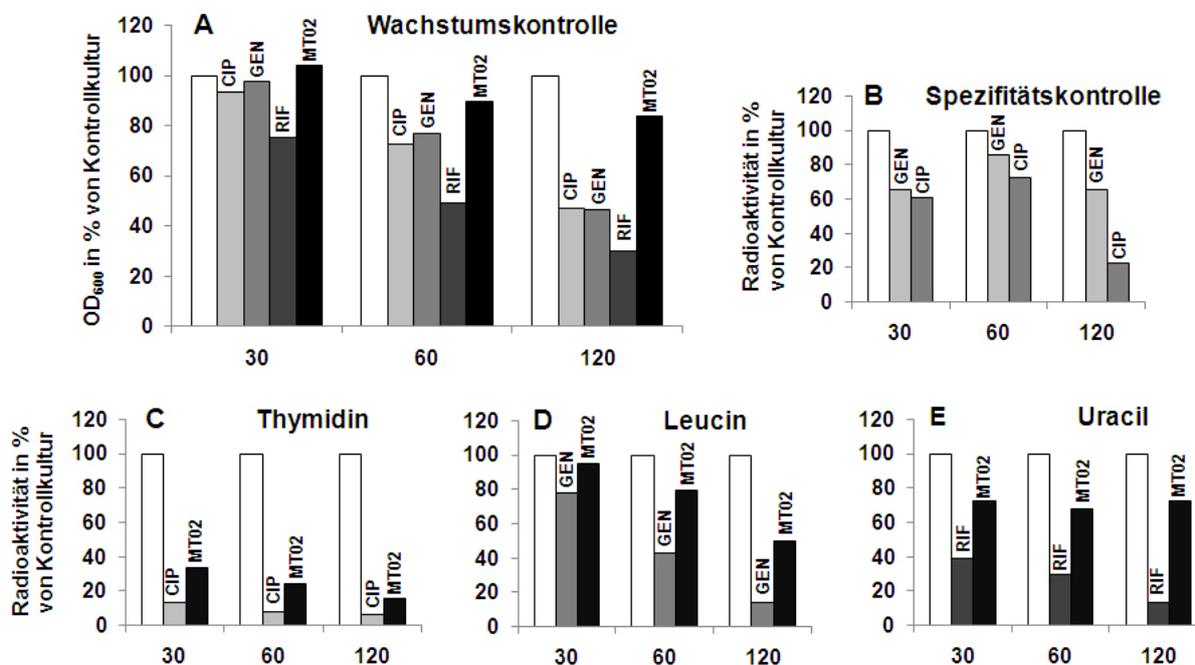
**Abbildung 4.5:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten von *S. aureus* HG001 nach Negativkontrastierung; A) Kontrolle ohne MT02, B) nach vorheriger Inkubation mit 50 x MHK MT02, C) nach vorheriger Inkubation mit 100 x MHK MT02; Pfeile deuten auf Unterschiede der Zellhüllen; Balken: 0,5  $\mu\text{m}$

In Abbildung 4.5 sind repräsentative Bilder der in den jeweiligen Proben gefundenen Bakterien dargestellt. Abbildung 4.5 A zeigt eine sich teilende Bakterienzelle, die nicht mit MT02 behandelt wurde. Die Pfeile markieren einerseits die Zytoplasmamembran (helle, dünne Linie) und andererseits die Peptidoglycanschicht (breitere, äußere Schicht). Die in Abbildung 4.5 B gezeigte Zelle war drei Stunden mit 50 x MHK MT02 inkubiert worden. Der Pfeil deutet auf die im Vergleich zur Kontrolle enorm verdickte Zellwandschicht. Die Inkubation mit 100 x MHK MT02 für drei Stunden (Abbildung 4.5 C) bewirkte sehr häufig eine unregelmäßig strukturierte Zellmembran (oberer Pfeil). Die Mureinschicht war ebenfalls wie bei den Proben mit 50 x MHK MT02 verdickt. Zudem war diese an der Außenseite sehr häufig unregelmäßig, rau und ausgefranst (unterer Pfeil). Die Inkubation von *S. aureus* mit MT02 hat demnach einen Einfluss auf die Beschaffenheit und Organisation der Zellhülle.

#### 4.1.5 Einfluss von MT02 auf die Synthese von DNA, RNA und Proteinen

Die Methode der radioaktiven Ganzzellmarkierung wurde eingesetzt, um die Auswirkung von MT02 auf die Funktionalität der drei Hauptsynthesewege zur Informationsverarbeitung in Zellen zu untersuchen. Dabei sollte der Einsatz von radioaktiv markiertem Thymidin auf den Einfluss von MT02 auf die Replikation, von markiertem Leucin auf die Translation und von markiertem Uracil auf die Transkription rückschließen lassen. Als Kontrollantibiotika mit bekanntem Wirkungsmechanismus wurden der Gyrasehemmer Ciprofloxacin, der Proteinsyntheseinhibitor Gentamicin und der RNA-Polymerase-Inhibitor Rifampicin eingesetzt. Zunächst wurden Kontrollversuche ohne radioaktiv markierte Substanzen durchgeführt, um die Auswirkung der verwendeten Antibiotika auf das

Wachstum der Kulturen festzustellen (Abbildung 4.6 A). Dabei zeigte sich, dass die verwendeten Kontrollantibiotika das Wachstum der Kulturen nach zwei Stunden um 50 bis 70 % im Vergleich zur Kontrollkultur ohne Antibiotikum reduzierten. Durch MT02 wurde in dem gewählten Modell im gleichen Zeitraum nur eine Verringerung des Wachstums um 10 % erreicht.



**Abbildung 4.6:** Radioaktive Ganzzellmarkierung von *S. aureus* HG001 unter dem Einfluss unterschiedlicher Antibiotika; A) Wachstumskontrolle von *S. aureus* HG001 nach Zusatz von jeweils 10 x MHK der angegebenen Antibiotika; B) Spezifitätskontrolle der Antibiotikawirkung: Kulturen mit Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin (hellgraue Balken) wurden mit 10 x MHK Gentamicin versetzt, Kulturen mit 4,5- $^3\text{H}$ -L-Leucin (dunkelgraue Balken) wurde 10 x MHK Ciprofloxacin zugegeben; C-E) Ganzzellmarkierung von *S. aureus* HG001 mit C) Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin, D) 4,5- $^3\text{H}$ -L-Leucin und E) 5,6- $^3\text{H}$ -Uracil nach Zugabe von jeweils 10 x MHK der angegebenen Antibiotika; CIP: Ciprofloxacin, GEN: Gentamicin, RIF: Rifampicin; x-Achse: Zeit nach Antibiotikazugabe in Minuten; weiße Balken: Referenzkulturen ohne Antibiotikum

Die Versuche mit radioaktiv markierten Stoffwechseledukten und den dazugehörigen Kontrollantibiotika (Abbildung 4.6 C-E) ergaben, dass alle Antibiotika den Einbau der radioaktiven Makromoleküle in zelleigene Bestandteile in gewissem Ausmaß unterbinden können. Alle gewählten Vergleichsantibiotika reduzierten die Intensität an abgegebener radioaktiver Strahlung bis zwei Stunden nach Versuchsbeginn auf unter 20 %, im Fall von Ciprofloxacin und radioaktiv markiertem Thymidin sogar auf unter 10 %. Die Wirkung von Ciprofloxacin und Rifampicin zeigte sich dabei bereits nach 30 Minuten deutlich, wohingegen Gentamicin erst nach 60 Minuten eine Reduktion des aufgenommenen radioaktiv markierten Leucins von mehr als 50 % im Vergleich zur Kontrollkultur

bewirkte. Als Kontrolle für unspezifische Inhibition der Aufnahme von Thymidin und Leucin wurde Kulturansätzen mit radioaktiv markiertem Thymidin Gentamicin zugegeben sowie Kulturen mit radioaktiv markiertem Leucin mit Ciprofloxacin versetzt (Abbildung 4.6 B). Im ersten Fall schwankte die Aufnahme von Methyl-[<sup>3</sup>H]-Thymidin zwischen 65 % und 85 %, wobei nach 60 min der höchste Wert erreicht wurde. Da der Wert zunächst anstieg und anschließend wieder abfiel ist keine unspezifische Wechselwirkung von Gentamicin auf die Aufnahme von Methyl-[<sup>3</sup>H]-Thymidin zu vermuten. Im zweiten Fall ergab sich ein Verlauf von 61 % nach 30 min über 73 % nach 60 min zu 23 % nach 120 min. Zwar fiel der Wert nach 120 min deutlich ab, jedoch nahm er zwischen 30 und 60 min zunächst zu, weshalb ebenfalls kein direkter Einfluss von Ciprofloxacin auf die Aufnahme von 4,5-[<sup>3</sup>H]-L-Leucin ursächlich sein kann. Zudem lag das erhaltene Signal von radioaktiv markiertem Leucin noch um das Doppelte höher als bei dem entsprechenden Versuch mit Gentamicin (siehe unten und Abbildung 4.6 D), was ebenfalls gegen eine spezifische Wechselwirkung von Ciprofloxacin und der Aufnahme von 4,5-[<sup>3</sup>H]-L-Leucin spricht.

Die Versuche mit der zu untersuchenden Substanz MT02 ergaben, dass dieses kaum Einfluss auf die Aufnahme von Uracil in die Bakterien hatte. Im Vergleich zur Kontrollkultur war die Aufnahme von Uracil über den ganzen Versuchszeitraum um ca. 30 % erniedrigt. Im Fall von radioaktiv markiertem Leucin zeigte sich über die Versuchsdauer eine fortschreitende Abnahme der detektierten radioaktiven Strahlung. Jedoch wurde nach 120 min lediglich eine Abnahme um ca. 50 % des Signals im Vergleich zur Kontrollkultur festgestellt. Somit konnte ein direkter Einfluss von MT02 auf Transkription und Translation ausgeschlossen werden. Bei den Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Thymidin verringerte sich jedoch das detektierte Signal deutlich auf ca. 30 % nach 30 min und weniger als 20 % nach 120 min. Dieser schnelle und drastische Effekt ließ auf einen direkten Einfluss von MT02 auf die Replikation bzw. die daran beteiligten Komponenten schließen.

### **4.1.6 Auswirkungen von MT02 auf das Transkriptom von *S. aureus* HG001**

Der Einfluss von MT02 auf die globale Genexpression in *S. aureus* HG001 wurde durch Transkriptionsanalysen mittels Microarrays bestimmt. Dabei wurde die mRNA einer Kultur, welche 60 min mit 10 x MHK MT02 inkubiert worden war mit der mRNA einer Kontrollkultur ohne MT02 verglichen. Die Hybridisierung erfolgte auf Chips, die mehr als 98 % der Genome von acht *S. aureus*-Stämmen abdeckten. Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse der unterschiedlich regulierten Gene erfolgte bezogen auf den Stamm *S. aureus* COL. Insgesamt wurden 112 herunterregulierte und 196 hochregulierte Gene gefunden. Tabelle 4.5 zeigt davon eine Auswahl, auf die hier genauer eingegangen wird. Der komplette Datensatz ist in Tabelle A1 im Anhang dargestellt.

**Tabelle 4.5:** Deregierte Gene wichtiger Stoffwechselwege von *S. aureus* HG001 nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK MT02

ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung
<b>DNA Metabolismus</b>			
hochregulierte ORFs			
SACOL0001	<i>dnaA</i>	Chromosomales Replikationsinitiationsprotein	2,52
SACOL0002	<i>dnaN</i>	DNA Polymerase III Untereinheit beta	2,44
SACOL0004	<i>recF</i>	Rekombinationsprotein	2,60
SACOL0005	<i>gyrB</i>	DNA Gyrase Untereinheit B	2,24
SACOL0823	<i>uvrB</i>	Excinuklease ABC Untereinheit B	4,36
SACOL0824	<i>uvrA</i>	Excinuklease ABC Untereinheit A	3,66
SACOL1304	<i>recA</i>	Rekombinase A	4,79
SACOL1374	<i>lexA</i>	LexA Repressor	6,85
SACOL1382	<i>sbcC</i>	Exonuklease	4,96
SACOL1381	<i>sbcD</i>	Nuklease	4,51
SACOL1400		UmuC Familie Polymerase	18,05
SACOL1401		UmuC Familie Polymerase	25,41
SACOL2089		Ähnlich zu DNA-Einzelstrangbindeprotein	2,18
SACOL2727		Integrase/Rekombinase, core domain Familie	2,06
<b>Phagen-bezogen</b>			
hochregulierte ORFs			
SACOL0318	<i>int</i>	Prophage L54a, Integrase	5,00
SACOL0321		Prophage L54a, Repressor Protein, hypothetisch	2,64
SACOL0325		Prophage L54a, Antirepressor, hypothetisch	48,05
SACOL0335		Hypothetisches Protein	29,53
SACOL0336		Phi PVL ORF 39-ähnliches Protein	28,77
SACOL0343		Prophage L54a, replikative DNA Helicase, hypothetisch	21,63
SACOL0348		Konserviertes hypothetisches Protein	12,03
SACOL0357	<i>dut</i>	Prophage L54a, Deoxyuridin-5'-Triphosphat Nukleotidohydrolase	7,31
SACOL0358		Hypothetisches Protein	6,55
SACOL0361		Hypothetisches Protein	5,33
SACOL0369		Prophage L54a, Clp Protease, hypothetisch	4,28
<b>LexA-reguliert</b>			
hochregulierte ORFs			
SACOL0436		Hypothetisches Protein	18,02
SACOL0437		Hypothetisches Protein	24,31
SACOL0823	<i>uvrB</i>	Excinuklease ABC Untereinheit B	4,36
SACOL0824	<i>uvrA</i>	Excinuklease ABC Untereinheit A	3,66
SACOL1304	<i>recA</i>	Rekombinase A	4,79
SACOL1374	<i>lexA</i>	LexA Repressor	6,85
SACOL1375		Hypothetisches Protein	57,47
SACOL1381	<i>sbcD</i>	Hypothetisches Protein	4,53
SACOL1382	<i>sbcC</i>	Exonuklease	4,96
SACOL1400		Hypothetisches Protein	18,05
SACOL1401		Hypothetisches Protein	25,41
SACOL1986		Hypothetisches Protein	16,84
SACOL1987		Hypothetisches Protein	17,21

Fortsetzung Tabelle 4.5

SACOL2162		Hypothetisches Protein	3,88
<b>Transport und Zellwand</b>			
hochregulierter ORF			
SACOL2525		ABC Transporter	4,27
herunterregulierte ORFs			
SACOL0079		Hypothetisches Protein	0,43
SACOL0480		Hypothetisches Protein	0,45
SACOL0682		Monovalenter Kation/H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit D, hypothetisch	0,45
SACOL0684		Monovalenter Kation/H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit E, hypothetisch	0,46
SACOL0991	<i>oppB</i>	Oligopeptidtransportsystem, Permease	0,30
SACOL0994	<i>oppF</i>	Hypothetisches Protein	0,32
SACOL1193	<i>ftsL</i>	Zellteilungsprotein	0,33
SACOL1195	<i>mraY</i>	Phospho-N-Muraminsäure-Pentapeptid Translokase	0,35
SACOL1196	<i>murD</i>	UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamat Synthetase	0,43
SACOL1319	<i>glpF</i>	Vermittler der Glycerolaufnahme	0,45
SACOL2450	<i>opuCD</i>	Glycin/Betain/Carnitin/Cholin ABC transporter, hypothetisch	0,43
SACOL2452	<i>opuCB</i>	Glycin/Betain/Carnitin/Cholin ABC transporter, hypothetisch	0,25
SACOL2453	<i>opuCA</i>	Glycin/Betain/Carnitin/Cholin ABC transporter, hypothetisch	0,21
SACOL2475		Peptid ABC Transporter, Permease, hypothetisch	0,34
<b>Nukleotidmetabolismus</b>			
hochregulierte ORFs			
SACOL0791	<i>nrdI</i>	Ribonukleotid Reduktase stimulierendes Protein	5,89
SACOL0792	<i>nrdE</i>	Ribonukleotid-Diphosphat Reductase Untereinheit alpha	5,68
SACOL0793	<i>nrdF</i>	Ribonukleotid-Diphosphat Reductase Untereinheit beta	4,80
SACOL2606	<i>pyrD</i>	Dihydroorotat Dehydrogenase 2	2,50
<b>Toxinproduktion/Resistenz und Pathogenese</b>			
hochregulierte ORFs			
SACOL0096	<i>sarS</i>	Staphylococcal accessory regulator S	4,26
SACOL0103		Hypothetisches Protein	2,15
SACOL2326	<i>fosB</i>	Fosfomycin Resistenz Protein	2,38
SACOL2712	<i>drp35</i>	Drp35 protein	2,42
herunterregulierte ORFs			
SACOL1173	<i>hly</i>	Alpha-Hämolyisin Vorstufe	0,41
SACOL1194	<i>pbpA</i>	Penicillin-bindendes Protein 1	0,31
SACOL2023	<i>agrB</i>	Accessory gene regulator Protein B	0,36
SACOL2026	<i>agrA</i>	Accessory gene regulator Protein A	0,33

Die Inkubation von *S. aureus* HG001 mit MT02 bewirkte eine Deregulation von vielen Genen des DNA-Metabolismus. Beispiele dafür sind die Hochregulation der Gene für das chromosomale Replikationsinitiationsprotein *dnaA*, für die beta-Untereinheit der DNA Polymerase III *dnaN*, die Untereinheit B der DNA Gyrase *gyrB* und für ein Protein, welches Ähnlichkeit zu einem DNA-Einzelstrangbindepotein hat (SACOL2089). Die Produkte dieser Gene sind alle an der Replikation der bakteriellen DNA beteiligt. Zudem waren Gene wie *sbcD* und *sbcD* hochreguliert, deren Produkte

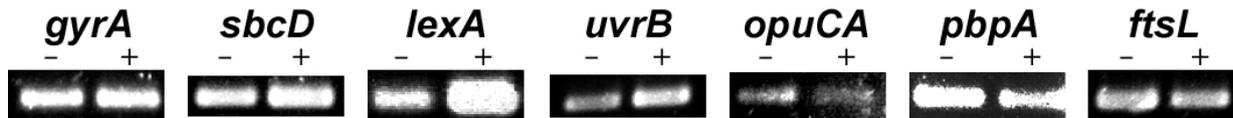
am DNA-Reparationsmechanismus beteiligt sind. Auch das Gen des LexA-Repressors erschien hochreguliert, welcher Bestandteil des SOS-Reparaturmechanismus beschädigter DNA ist. Infolgedessen waren einige Gene, welche unter der Kontrolle von LexA stehen ebenfalls hochreguliert, darunter die für Exonukleasen codierenden Gene *uvrA* und *uvrB* sowie die für Rekombinaseproteine codierenden Gen *recA* und *recF*. Zusätzlich wurde eine Anzahl von Phagengenen hochreguliert, so beispielsweise für die Phagenintegrase (SACOL0318), einen hypothetischen phagenspezifischen Antirepressor (SACOL0325) und eine hypothetische Phagenhelikase (SACOL0343). Insgesamt konnten nach MT02-Zugabe 29 deregulierte Gene gefunden werden, welche in Zusammenhang mit Phagen stehen sowie 14 Gene, die in die SOS-Antwort involviert sind.

Andere Gruppen von Genen wurden durch den Einfluss von MT02 herunterreguliert. Solche waren beispielsweise Membranproteine der Gruppe der ABC-Transporter und Antiporter wie *opuCA*, *opuCB* und *opuCD*. Außerdem waren die Gene *mraY* und *murD* herunterreguliert, welche am Transport von Vorstufen für die Zellwandsynthese über die Zellmembran und an der Mureinbiosynthese beteiligt sind. Zusätzlich waren durch MT02 die Gene *fosB* und *pbpA* hochreguliert die für Fosfomycin- bzw. Penicillin-Resistenzproteine codieren. Auch *drp35*, welches eine Rolle bei der Reaktion von *S. aureus* auf zellwandaktive Antibiotika spielt, wurde durch Inkubation mit MT02 hochreguliert. Im Gegensatz dazu wurde das für die Zellteilung essentielle Gen *ftsL* herunterreguliert.

Viele der insgesamt 308 durch MT02 deregulierten Gene waren in Stoffwechselwege involviert, die nicht miteinander in Zusammenhang standen bzw. auf keinen bestimmten Wirkungsmechanismus schließen ließen. Zudem waren viele hypothetische Proteine betroffen, deren Funktion in der Bakterienzelle bislang noch unbekannt ist. Die große Anzahl an deregulierten Genen, die im Zusammenhang mit dem DNA-Metabolismus und DNA-Reparatursystemen stehen, ließ darauf schließen, dass MT02 in diesem Bereich des bakteriellen Stoffwechsels aktiv ist. Auch die große Zahl an Phagen-Genen unterstützt diese Vermutung. Die vermehrte Transkription von *drp35* und *fosB* sowie die verringerte Transkription der Gene *ftsL*, *mraY* und *murD* könnten zusätzlich Hinweise auf einen sekundären Wirkmechanismus sein, der im Zusammenhang mit der Zellwand oder Zellwandbiosynthese steht.

#### 4.1.7 Validierung der Transkriptomanalysen von *S. aureus* HG001 und MT02

Die Kontrolle dieser Ergebnisse erfolgte mittels semi-quantitativer Reverse Transkriptase (RT) PCR. Dazu wurde unter den gleichen Bedingungen wie für die Transkriptionsanalysen Gesamt-RNA aus Kulturen isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese mit Oligonukleotiden für Fragmente der Gene *sbcD*, *lexA*, *uvrB*, *opuCA*, *pbpA* und *ftsL* mittels PCR amplifiziert. Als nicht-reguliertes Kontrollgen diente *gyrA*. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.7 dargestellt.



**Abbildung 4.7:** Validierung der Transkriptionsanalyse zur Untersuchung des Wirkmechanismus von MT02 gegen *S. aureus* HG001 mit semiquantitativer RT-PCR anhand ausgewählter Gene; (-): Proben aus Kontrollkulturen ohne MT02, (+): Proben aus Kulturen nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK MT02

Das Kontrollgen *gyrA* wurde in beiden Ansätzen gleich stark exprimiert. Die Ergebnisse der Transkriptomanalysen mittels Microarray ergaben für die Gene *sbcD*, *lexA* und *uvrB* nach Inkubation mit MT02 erhöhte Werte, was durch semi-quantitative RT-PCR bestätigt werden konnte. Ebenso waren die im Microarray herunterregulierten Gene *opuCA*, *pbpA* und *ftsL* auch hier schwächer exprimiert. Die Ergebnisse der Microarray-Analysen konnten somit anhand ausgewählter Gene mittels semi-quantitativer RT-PCR bestätigt werden.

#### 4.1.8 Auswirkungen von MT109 auf das Transkriptom von *S. aureus* HG001

Zusätzlich wurde von einem weiteren bisquartären Bisnaphthalimid, MT109, ein Transkriptionsprofil nach Inkubation von *S. aureus* HG001 mit 10 x MHK dieser Substanz angefertigt. MT109 zeigte trotz großer struktureller Ähnlichkeit im Vergleich zu MT02 geringere Aktivität gegen Staphylokokken. Trotzdem sollte untersucht werden, ob sich Gemeinsamkeiten des Wirkungsmechanismus anhand des durch Inkubation mit der Substanz veränderten Transkriptionsprofils vermuten ließen. In Tabelle 4.6 ist eine Auswahl von deregulierten Genen dargestellt, der komplette Datensatz ist im Anhang A2 gezeigt.

**Tabelle 4.6:** Deregulierte Gene wichtiger Stoffwechselwege von *S. aureus* HG001 nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK MT109

ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung
<b>DNA Metabolismus</b>			
hochregulierte ORFs			
SACOL0001	<i>dnaA</i>	Chromosomales Replikationsinitiationsprotein	2,92
SACOL0004	<i>recF</i>	Rekombinationsprotein F	14,03
SACOL0005	<i>gyrB</i>	DNA Gyrase Untereinheit B	17,51
SACOL0006	<i>gyrA</i>	DNA Gyrase Untereinheit A	16,60
SACOL0464		wahrscheinlich Transposase	18,64
SACOL0528		DNA Replikationsinitiationskontrollprotein YabA	6,04
SACOL0823	<i>uvrB</i>	Excinuklease ABC Untereinheit B	7,30
SACOL0824	<i>uvrA</i>	Excinuklease ABC Untereinheit A	11,00
SACOL1154	<i>mutS2</i>	Rekombinationsprotein und DNA-Strangaustausch Inhibitor	4,57
SACOL1315	<i>mutS</i>	DNA mismatch Reparaturprotein	3,00
SACOL1382	<i>sbvC</i>	Exonuklease SbcC	4,21
SACOL1492	<i>nth</i>	Endonuklease-ähnliches Protein	2,66
SACOL1523	<i>recQ2</i>	ATP-abhängige DNA Helicase RecQ	4,14
SACOL1564	<i>recN</i>	DNA Reparaturprotein	2,86
SACOL1568	<i>xseA</i>	Exodeoxyribonuklease VII große Untereinheit	2,67
SACOL1636	<i>dnaJ</i>	DnaJ Protein	25,96
SACOL1737	<i>polA</i>	DNA Polymerase I	2,90
SACOL1966	<i>pcrA</i>	ATP-abhängige DNA Helicase	9,64
<b>Gene ribosomaler Protein</b>			
hochregulierte ORFs			
SACOL2212	<i>rplQ</i>	50S ribosomales Protein L17	4,33
SACOL2214	<i>rpsK</i>	30S ribosomales Protein S11	5,16
SACOL2220	<i>rplO</i>	50S ribosomales Protein L15	4,16
SACOL2223	<i>rplR</i>	50S ribosomales Protein L18	7,37
SACOL2224	<i>rplF</i>	50S ribosomales Protein L6	8,62
SACOL2225	<i>rpsH</i>	30S ribosomales Protein S8	8,38
SACOL2229	<i>rplN</i>	50S ribosomales Protein L14	8,81
SACOL2232	<i>rplP</i>	50S ribosomales Protein L16	9,68
SACOL2234	<i>rplV</i>	50S ribosomales Protein L22	5,87
<b>Zellwand</b>			
hochregulierte ORFs			
SACOL0697	<i>tagX</i>	Teichonsäure BiosyntheseProtein X	2,36
SACOL0698	<i>tagD</i>	Teichonsäure BiosyntheseProtein D	3,00
SACOL1264	<i>lytN</i>	Wahrscheinlich Zellwandhydrolase	3,21
SACOL2073	<i>murF</i>	UDP-N-Acetylmuramoylalaninyl-D-Glutamyl-2, 6-Diaminopimelat-D-Alanyl-D-Alanyl Ligase	6,54
SACOL2074	<i>ddl</i>	D-Alanyl-Alanin Synthetase A	4,88
SACOL2092	<i>murA</i>	UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase	2,94
SACOL2116	<i>murZ</i>	UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase	4,78
herunterregulierte ORFs			
SACOL0177	<i>murQ</i>	N-Acetylmuraminsäure-6-Phosphat Etherase	0,10
SACOL0695	<i>tagG</i>	Teichonsäure Translokationspermease Protein	0,32

Fortsetzung Tabelle 4.6

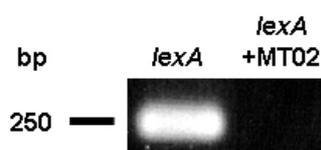
SACOL0743	<i>uppP</i>	Undecaprenyl Pyrophosphat Phosphatase	0,27
<b>Riboflavinbiosynthese</b>			
hochregulierte ORFs			
SACOL1818	<i>ribA</i>	Riboflavin Biosynthese Protein	21,93
SACOL1819	<i>ribB</i>	Riboflavin Synthase Untereinheit alpha	24,54
SACOL1820	<i>ribD</i>	Riboflavin-spezifische Deaminase	15,78
<b>Stress und Resistenz</b>			
hochregulierte ORFs			
SACOL2017	<i>groES</i>	Co-Chaperonin GroES	20,39
SACOL2628	<i>betB</i>	Betainaldehyd Dehydrogenase	52,37
	<i>gbsA</i>	Glycin Betaine Aldehyd Dehydrogenase <i>gbsA</i>	46,86
herunterregulierte ORFs			
SACOL1066	<i>fmtA</i>	FmtA, beteiligt an Autolyse und Methicillinresistenz	0,37
SACOL1396	<i>fmtC</i>	Beteiligt an Oxacillin Resistenz	0,33

Durch die Inkubation von *S. aureus* HG001 mit 10 x MHK MT109 wurden 18 hochregulierte Gene gefunden, deren zugehörige Proteine mit dem DNA-Metabolismus in Verbindung stehen, darunter sowohl DNA prozessierende Enzyme als auch DNA-Reparaturproteine. Neun Gene ribosomaler Proteine waren ebenfalls hochreguliert. Im Bezug auf den Zellwand-Metabolismus wurden sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gene gefunden, die an der Synthese von Teichonsäuren und Murein beteiligt sind. Drei Gene der Riboflavinbiosynthese waren durch den Einfluss von MT109 stark hochreguliert. Des Weiteren wurde ein Co-Chaperonin gefunden (SACOL2017), welches stark überexprimiert wurde. Zwei der am stärksten überexprimierten Gene waren *betB* und *gbsA*, welche beide an der Prozessierung von Betain-Derivaten beteiligt sind. Die zwei am Resistenzmechanismus gegen Methicillin bzw. Oxacillin beteiligten Gene *fmtA* und *fmtC* waren deutlich herunterreguliert.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Transkriptionsstudien mit MT02 mit den Resultaten der Untersuchungen mit MT109 ergab 24 identische deregulierte offene Leseraster, darunter 18 mit bislang ungeklärter Funktion. Die anderen sechs kodieren für das chromosomale Replikations-Initiations-Protein DnaA (SACOL0001), das Rekombinationsprotein F RecF (SACOL0004), die Untereinheit B der DNA Gyrase GyrB (SACOL0005), die Untereinheiten A und B der Excinuklease ABC UvrA und UvrB (SACOL0824 und SACOL0823) sowie für das verkürzte Beta-Hämolyisin Hlb (SACOL2003).

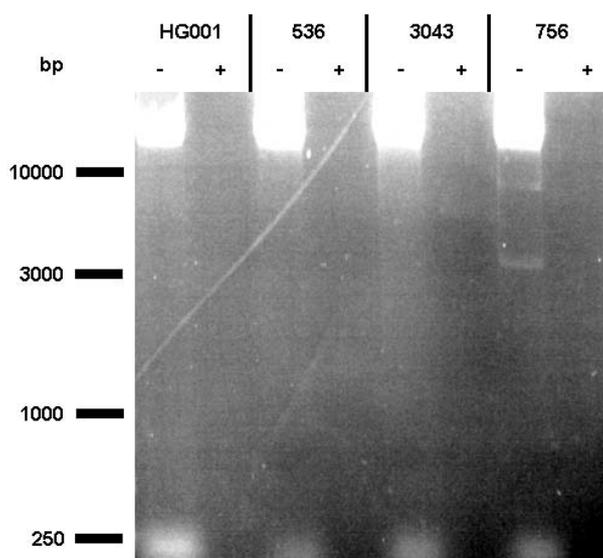
#### 4.1.9 Untersuchungen zur Wechselwirkung von MT02 mit DNA

Die oben beschriebenen Ergebnisse der Versuche mit radioaktiver Ganzzellmarkierung und die Transkriptomanalysen ließen darauf schließen, dass der Wirkungsmechanismus von MT02 gegen Staphylokokken im Zusammenhang mit der DNA oder dem DNA-Metabolismus steht. Deshalb wurden Studien zur Interaktion von MT02 mit DNA durchgeführt. Dazu wurden zunächst 150 ng eines PCR-Produkts des Gens *lexA* mit 20 µg MT02 eine Stunde inkubiert. Dieser Ansatz sowie zur Kontrolle unbehandeltes PCR-Produkt wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, die Elektrophorese durchgeführt, das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend auf dem UV-Schirm betrachtet.



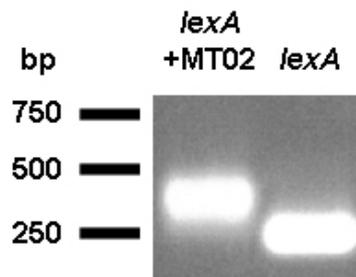
**Abbildung 4.8:** Links: PCR-Produkt eines Fragments des Gens *lexA* nach Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid; Rechts wurde eine identische Probe vor der Gelelektrophorese mit 20 µg MT02 inkubiert.

Wie Abbildung 4.8 zeigt, konnte das PCR-Produkt nach der Inkubation mit MT02 nicht mehr detektiert werden. Dieser Versuch wurde im Anschluss mit jeweils ca. 1 µg genomischer DNA von *S. aureus* HG001 sowie den *E. coli* Stämmen 536, 3043 und 756 wiederholt (Abbildung 4.9). Auch hier wurde die DNA mit jeweils 20 µg MT02 inkubiert.



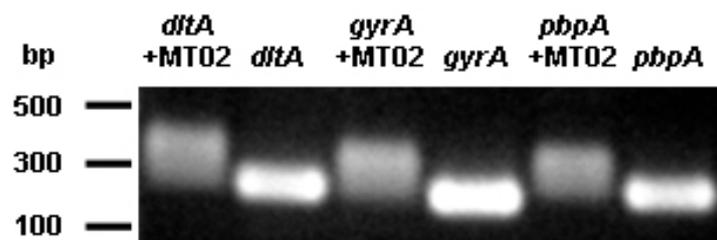
**Abbildung 4.9:** Genomische DNA von *S. aureus* HG001 sowie *E. coli* 536, 3043 und 756 jeweils ohne (-) und mit (+) 20 µg MT02 inkubiert nach anschließender Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid

Nach der Inkubation mit MT02 konnte keine DNA auf dem Agarosegel mehr detektiert werden. Somit wurde gezeigt, dass der durch MT02 ausgelöste Effekt unabhängig von der Herkunft der eingesetzten DNA ist. Da für diesen Versuch die DNA von drei verschiedenen *E. coli*-Stämmen isoliert wurde, konnte zudem gezeigt werden, dass der Effekt nicht auf die DNA eines bestimmten Isolats beschränkt ist. Als Ursache dafür wurde der Abbau von DNA durch MT02 als sehr unwahrscheinlich angesehen, weshalb der erste hier gezeigte Versuch erneut durchgeführt wurde. Allerdings erfolgte diesmal nach der Inkubation mit MT02 eine Aufreinigung des PCR-Produkts mittels PCR Purification Kit, bevor es in die Gelelektrophorese eingesetzt wurde.



**Abbildung 4.10:** Rechts: PCR-Produkt eines Fragments des Gens *lexA* nach Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid; Links wurde eine identische Probe vor der Elektrophorese mit 20 µg MT02 inkubiert und anschließend aufgereinigt.

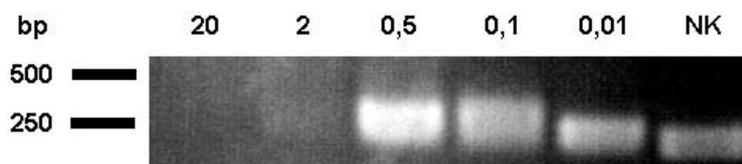
Nach der Aufreinigung konnte das PCR-Produkt wieder detektiert werden (Abbildung 4.10). Allerdings erschien die Länge des DNA-Fragments nach Inkubation mit MT02 größer als ohne Behandlung mit der Substanz. Um eine sequenzspezifische Wechselwirkung von MT02 mit DNA auszuschließen, wurden weitere PCR-Produkte auf die gleiche Weise behandelt und mittels Agarosegel analysiert (Abbildung 4.11).



**Abbildung 4.11:** PCR-Produkte von Fragmenten der Gene *dltA*, *gyrA* und *pbpA* nach Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid; jeweils links wurde das PCR-Produkt vor der Elektrophorese mit 20 µg MT02 inkubiert und anschließend aufgereinigt.

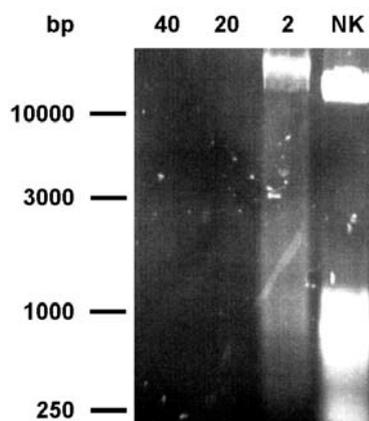
Die Veränderung der apparenten Größe der PCR-Produkte war kein sequenzspezifisches Phänomen, da es bei allen untersuchten DNA-Fragmenten auftrat.

Weiterhin wurde untersucht, ob die der DNA zugegebene Menge an MT02 einen Einfluss auf die gelelektrophoretische Auftrennung hat. Dazu wurden zunächst jeweils ca. 150 ng eines *lexA*-PCR-Produkts mit unterschiedlichen Mengen an MT02 versetzt und ohne Aufreinigung in die Gelelektrophorese eingesetzt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 4.12.



**Abbildung 4.12:** PCR-Produkt eines Fragments des Gens *lexA*, nach Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid; vor der Elektrophorese wurde das PCR-Produkt mit der jeweils über dem Bild in  $\mu\text{g}$  angegebenen Menge an MT02 inkubiert; NK: Negativkontrolle ohne MT02

Hier wiesen die Fragmente, die mit MT02 inkubiert worden waren ebenfalls eine größere apparente Masse auf dem Gel auf und zwar umso mehr mit zunehmender Menge an zugegebenem MT02. Nach Inkubation des PCR-Produkts mit 2  $\mu\text{g}$  MT02 erschien nur noch ein leichter Schmier, bei noch größeren Mengen konnte kein PCR-Produkt mehr detektiert werden. Das gleiche Experiment wurde mit jeweils ca. 1  $\mu\text{g}$  genomischer DNA durchgeführt, das Ergebnis ist in Abbildung 4.13 dargestellt.

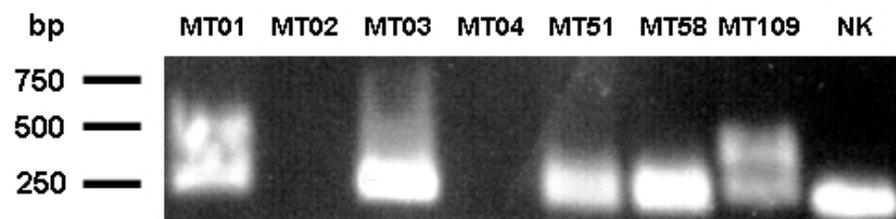


**Abbildung 4.13:** Genomische DNA von *S. aureus* HG001 nach Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid; die Proben wurden vor der Elektrophorese mit der jeweils über dem Bild in  $\mu\text{g}$  angegebenen Menge an MT02 inkubiert; NK: Negativkontrolle ohne MT02

Auf dem Gel wurde auch die apparente Masse genomischer DNA durch Inkubation mit MT02 erhöht. Zudem war ersichtlich, dass die Inkubation mit 2  $\mu\text{g}$  MT02 bereits zu einer Verringerung der detektierbaren DNA-Menge führte, da in der entsprechenden Spur die Signalstärke im Vergleich zur Positivkontrolle deutlich vermindert war.

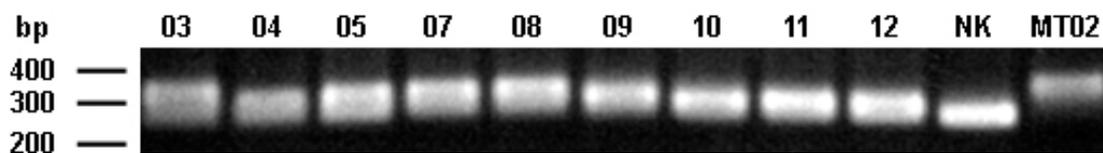
Im Gegensatz zur somit nachgewiesenen Konzentrationsabhängigkeit der DNA-MT02-Interaktion konnten keine Unterschiede bei Veränderungen der Inkubationsdauer von DNA mit MT02 festgestellt werden. Im Zeitrahmen von 30 Sekunden bis 30 Minuten Inkubation vor Aufreinigung der DNA ergaben sich keine Unterschiede in der apparenten Größe der nach der Gelelektrophorese detektierten DNA-Fragmente.

Neben MT02 wurden auch weitere Mono- und Bisnaphthalimide auf Wechselwirkung mit DNA untersucht, um mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufzuklären. Dazu wurden jeweils 150 ng eines *lexA*-PCR-Produkts mit jeweils 20 µg der jeweiligen Substanz inkubiert und ohne Aufreinigung in die Gelelektrophorese eingesetzt (Abbildung 4.14).



**Abbildung 4.14:** PCR-Produkt eines Fragments des Gens *lexA*, nach Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid; vor der Elektrophorese wurden die PCR-Produkte mit je 20 µg des jeweils über dem Bild angegebenen Naphthalimids inkubiert; NK: Negativkontrolle ohne Substanz

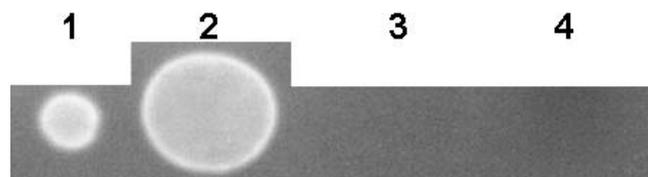
MT04 hatte auf DNA einen ähnlichen Einfluss wie MT02. Die Substanzen MT01, MT109 und in geringem Maße auch MT03 zeigten leichte Wechselwirkung mit DNA, wohingegen MT51 und MT58 keine Auswirkung auf das Verhalten von DNA in der Gelelektrophorese hatten. Bei der Untersuchung der Substanzen mit unterschiedlicher Kettenlänge der Linkerregion wurde das in Abbildung 4.15 dargestellte Ergebnis erhalten. Diese Proben waren im Gegensatz zu denen in Abbildung 4.14 vor der Gelelektrophorese aufgereinigt worden, da sonst keine Signale auf dem Gel zu sehen waren.



**Abbildung 4.15:** PCR-Produkt eines Fragments des Gens *lexA*, nach Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid; vor der Elektrophorese wurden die PCR-Produkte mit je 20 µg einer als MTFP bezeichneten Substanz inkubiert und anschließend aufgereinigt; über dem Bild sind die jeweiligen Kettenlängen der Linkerregion der eingesetzten MTFPs angegeben (siehe Abbildung 2.2 und Tabelle 2.6); NK: Negativkontrolle ohne Substanz; MT02: Positivkontrolle durch Inkubation mit MT02

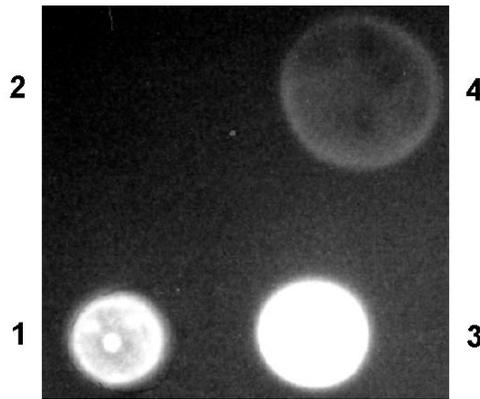
Keine der untersuchten Substanzen hatte eine so starke Wirkung auf DNA wie MT02. Generell ließ sich feststellen, dass die Interaktion bei einer Kettenlänge von 8 Methylgruppen am stärksten war und bei längeren oder kürzeren Linkerregionen abnahm. Lediglich MTFP03 stellte dabei eine Ausnahme dar, welches im Vergleich zu MTFP04 und MTFP05 eine stärkere Interaktion zeigte.

Drei mögliche Erklärungen dafür, dass DNA-Fragmente nach der Inkubation mit MT02 teilweise nicht mehr mittels Anfärben mit Ethidiumbromid nachweisbar sind, wurden in Betracht gezogen. Entweder wurde die DNA von MT02 abgebaut, oder die positive Ladung von MT02 verhinderte durch elektrische Kompensation der negativen Ladung der DNA eine normale Auftrennung im Agarosegel. Die dritte Möglichkeit war, dass die Interaktion von MT02 und DNA eine Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA verhindern konnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurden DNA-Proben nicht mittels Elektrophorese aufgetrennt, sondern auf Agarosegelplatten die Ethidiumbromid enthielten aufgetropft. Abbildung 4.16 zeigt einen solchen Versuch mit genomischer DNA von *S. aureus* HG001.



**Abbildung 4.16:** Genomische DNA von *S. aureus* HG001 wurde auf eine Ethidiumbromid enthaltende Agarosegelplatte aufgebracht. 1) 1  $\mu\text{g}$  DNA; 2) 1  $\mu\text{g}$  DNA + 1  $\mu\text{l}$  DMSO; 3) 1  $\mu\text{g}$  DNA + 2  $\mu\text{g}$  MT02; 4) 1  $\mu\text{g}$  DNA + 20  $\mu\text{g}$  MT02

Wie bei 1) in Abbildung 4.16 zu erkennen ist, konnte das in der Agaroseplatte enthaltene Ethidiumbromid in die aufgebraute DNA interkalieren und ein Signal auf dem UV-Schirm detektiert werden. Die Zugabe von DMSO hatte aufgrund der Verringerung der Oberflächenspannung der Lösung eine Vergrößerung des Radius der aufgetropften Lösung zur Folge, jedoch konnte auch hier Ethidiumbromid interkalieren und ein Signal detektiert werden. Nach Zugabe von sowohl 2  $\mu\text{g}$  als auch 20  $\mu\text{g}$  MT02 zur DNA (3) und 4)) konnte kein Signal detektiert werden, was bedeutet, dass kein Ethidiumbromid in die DNA interkalierte. Die Interaktion von MT02 mit DNA verhinderte also das Einlagern von Ethidiumbromid in DNA. Dieser Versuch wurde mit eukaryotischer DNA aus HEK-Zellen im Vergleich zur DNA von Staphylokokken wiederholt, um eine Spezifität von MT02 gegenüber der DNA von Gram-positiven Bakterien auszuschließen.



**Abbildung 4.17:** Genomische DNA wurde auf eine Ethidiumbromid enthaltende Agarosegelplatte aufgebracht. 1) 2 µg DNA HEK-Zellen; 2) 2 µg DNA HEK-Zellen + 2 µg MT02; 3) 2 µg DNA *S. aureus* HG001; 4) 2 µg DNA *S. aureus* HG001+ 2 µg MT02

Aus Abbildung 4.17 ist ersichtlich, dass das detektierbare Signal sowohl beim Einsatz von eukaryotischer DNA, als auch bei DNA von *S. aureus* nach Zugabe von 2 µg MT02 stark abnahm. Im Fall der eukaryotischen DNA konnte nichts mehr detektiert werden. MT02 interagierte also mit eukaryotischer DNA ebenso wie mit der aus *S. aureus*. Im Vergleich zum vorher dargestellten Versuch mit genomischer DNA von *S. aureus* (Abbildung 4.16) war hier nach Zugabe von MT02 zur DNA zwar ein Signal nachweisbar, jedoch war hier auch die doppelte Menge an DNA eingesetzt worden. Dieser Effekt war also wiederum auf die oben bereits erwähnte Konzentrationsabhängigkeit der Interaktion von MT02 mit DNA zurückzuführen.

Abschließend wurde untersucht, ob die Reihenfolge der Zugabe von MT02 und Ethidiumbromid zur DNA eine Auswirkung auf die erzielten Ergebnisse hat. Die hier verwendeten Proben wurden auf Agarosegelplatten getropft, denen kein Ethidiumbromid zugesetzt worden war.



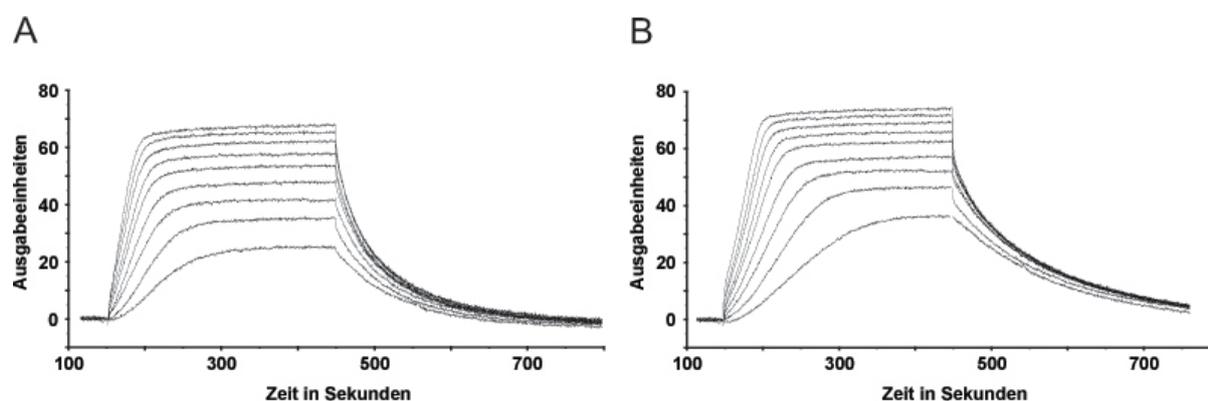
**Abbildung 4.18:** Genomische DNA von *S. aureus* HG001 wurde auf eine Agarosegelplatte aufgebracht. 1) 1 µg DNA; 2) 1 µg DNA + 100 ng Ethidiumbromid; 3) 1 µg DNA + 100 ng Ethidiumbromid + 2 µg MT02; 4) 1 µg DNA + 2 µg MT02 + 100 ng Ethidiumbromid

Die Negativkontrolle ohne Ethidiumbromid 1) in Abbildung 4.18 erzeugte wie erwartet kein Signal, die Positivkontrolle mit Ethidiumbromid 2) schon. Die Proben 3) und 4) wurden jeweils zuerst 5 min mit Ethidiumbromid bzw. MT02 inkubiert, bevor die entsprechend andere Substanz zugegeben wurde. In beiden Fällen war kein Signal auf dem UV-Schirm detektierbar. MT02 verhinderte also nicht

nur die Interkalation von Ethidiumbromid in DNA, sondern konnte auch die bereits erfolgte Bindung von Ethidiumbromid an DNA wieder lösen.

#### 4.1.10 Oberflächen Plasmon Resonanz

Die oben beschriebenen Versuche mit DNA, Ethidiumbromid und MT02 zeigten einerseits, dass MT02 mit DNA interagieren kann. Andererseits ergaben die gelelektrophoretischen Untersuchungen, dass MT02 an DNA binden kann. Diese Bindung der Substanz an DNA sollte mittels Oberflächen Plasmon Resonanz genauer untersucht werden. Da bekannt war, dass das tertiäre Bisnaphthalimid Elinafid spezifisch in die Basensequenz TGCA interkaliert (González-Bulnes, Gallego, 2009), wurden für die hier durchgeführten Studie ein doppelsträngiges Oligonukleotid mit ebendieser Sequenz sowie ein zweites doppelsträngiges Oligonukleotid mit der davon stark abweichenden Sequenz AGTC eingesetzt. Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an MT02 durchgeführt, wobei das Zeitintervall für die Bindung der Substanz an die Oligonukleotide stets konstant gehalten wurde. Anschließend wurde mit Pufferlösung ohne MT02 gewaschen. Die Ergebnisse dieser Studien sind grafisch in Abbildung 4.19 dargestellt.



**Abbildung 4.19:** Oberflächen Plasmon Resonanz zur Untersuchung der Bindung von MT02 an die doppelsträngigen Oligonukleotide A) Bio-TGCA und B) Bio-Kontrolle; MT02-Konzentrationen von der untersten zur obersten Kurve: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 und 200 nM

An der detektierten Signalzunahme unmittelbar nach Zufuhr von MT02 ist erkennbar, dass die Substanz an DNA band. Die für Elinafid bestimmte Sequenzspezifität konnte bei MT02 nicht festgestellt werden. Bei beiden verwendeten Oligonukleotiden fand Bindung statt, bei dem die Kontrollsequenz AGTC enthaltenden war die Bindung sogar etwas stärker. Die Bindung von MT02 erfolgte zeitabhängig bis zu einem Sättigungswert. Dieser lag bei größeren Konzentrationen höher und war dabei auch schneller erreicht. Wurde nach der Bindung von MT02 mit Puffer ohne MT02 gewaschen, kehrte das detektierte Signal wieder auf den Anfangswert zurück. Dies zeigt, dass die

Bindung von MT02 an DNA ein reversibler Prozess ist. Anhand der gemessenen Daten wurden für die beiden Oligonukleotide die jeweiligen thermodynamischen Dissoziationskonstanten errechnet. Diese beschreiben, bei welcher Konzentration von MT02 die DNA-Fragmente zur Hälfte mit der Substanz abgesättigt sind. Sie ergaben sich zu  $1,95 \times 10^{-8}$  mol/l für das Oligonukleotid Bio-TGCA und  $5,81 \times 10^{-8}$  mol/l für das Kontroll-Oligonukleotid. Somit liegen die Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich.

### 4.1.11 Zytotoxizität von MT02

Nachdem eine starke antibakterielle Wirkung von MT02 gegen Gram-positive Bakterien festgestellt wurde, sollte untersucht werden, ob diese Substanz auch toxisch gegen eukaryotische Zellen wirkt. Aus diesem Grund wurden vier Zelllinien einem Zytotoxizitätstest mit MT02 unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 dargestellt.

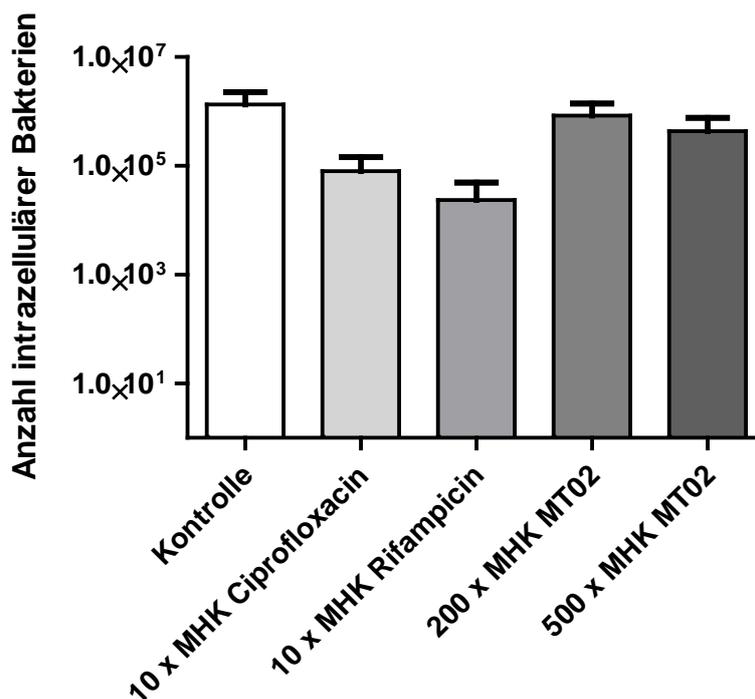
**Tabelle 4.7:** Zytotoxizitätswerte von MT02 gegen verschiedene Zelllinien

Zelllinie	Zytotoxizitätswert [ $\mu\text{g/ml}$ ]
J-774.1 (murine Makrophagen)	95
293T (humane Nierenepithelzellen)	> 152
A-549 (humane alveoläre Basalepithelzellen)	73
Caco-2 (humane kolorektale Epithelzellen)	146

MT02 war zwar in geringem Ausmaß zytotoxisch gegen eukaryotische Zellen, allerdings lagen die hierfür benötigten Konzentrationen deutlich höher als die gegen Staphylokokken bestimmten MHK-Werte.

### 4.1.12 Wirkung von MT02 auf intrazelluläre *S. aureus*

Wie oben dargestellt, besitzt MT02 eine starke Wirkung gegen Gram-positive Bakterien, insbesondere Staphylokokken. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität von MT02 gegen eukaryotische Zellen deutlich geringer. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass MT02 nicht in der Lage ist, in eukaryotische Zellen einzudringen. Dies wurde untersucht, indem die antibakterielle Wirkung von MT02 gegen intrazelluläre *S. aureus*-Zellen bestimmt wurde. Hierfür wurden *S. aureus* HG001 in HEK-Zellen invadiert, die Zellen MT02 bzw. Vergleichsantibiotika ausgesetzt und nach dreistündiger Inkubationszeit und anschließender Zellyse die Anzahl an lebenden *S. aureus* festgestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.20 zusammengefasst.



**Abbildung 4.20:** Wirkung von Antibiotika auf intrazelluläre Bakterien; Dargestellt ist die Anzahl der in HEK-Zellen überlebenden *S. aureus* HG001 nach Behandlung invadierter Zellen mit den an der x-Achse bezeichneten Antibiotika. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an

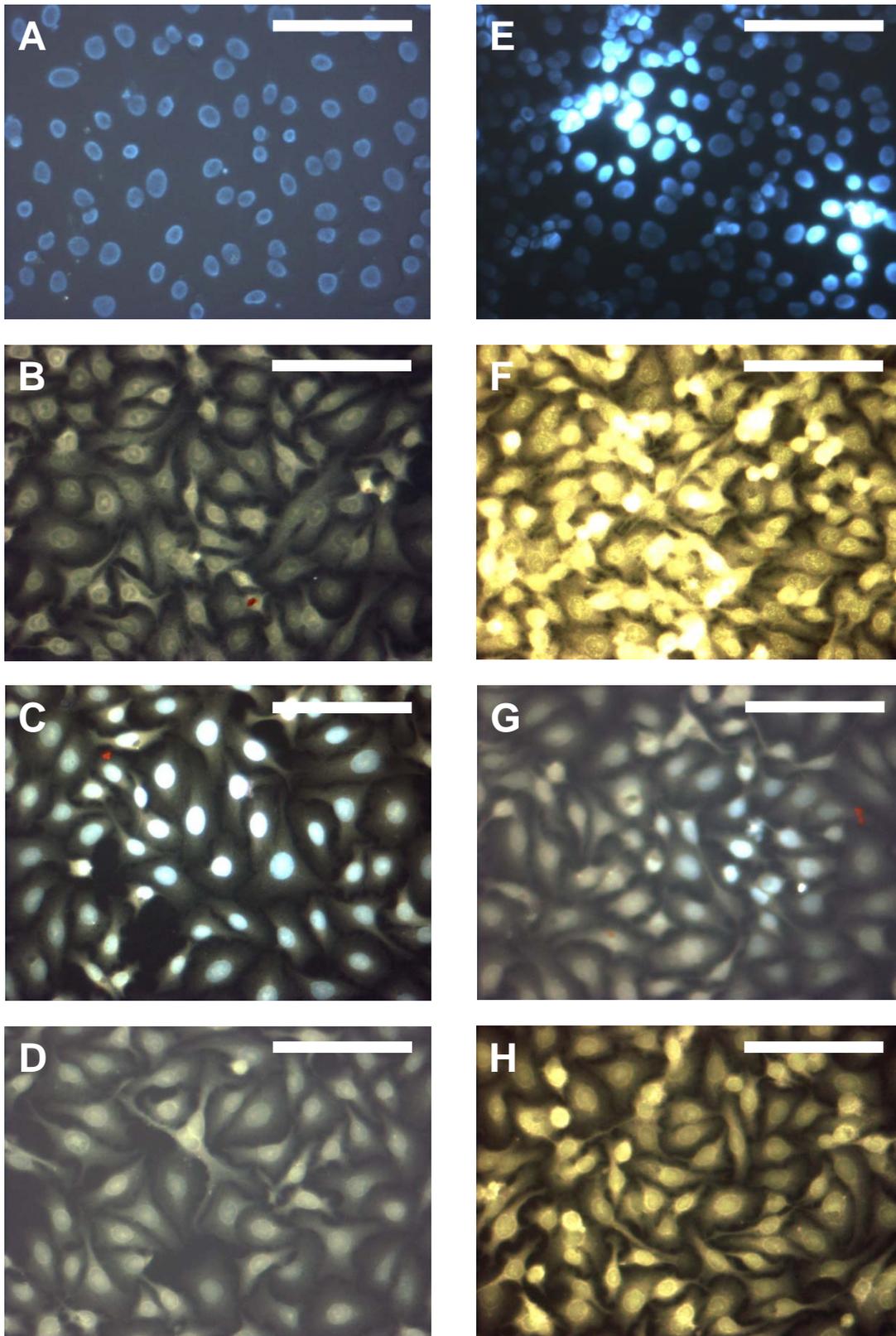
Als Vergleichsantibiotika dienten Ciprofloxacin und Rifampicin, von denen eine Wirkung auf intrazelluläre Bakterien bekannt ist. Aus den Zellen der Kontrollkulturen konnten jeweils etwas mehr als  $1 \times 10^6$  Bakterien isoliert werden. Die Inkubation mit 10 x MHK Ciprofloxacin reduzierte die Menge an intrazellulären Bakterien auf knapp  $1 \times 10^5$  Bakterien. Eine noch bessere Wirkung ergab die Zugabe von 10 x MHK Rifampicin, nach der die Anzahl lebender Bakterien etwas mehr als  $1 \times 10^4$  pro Ansatz betrug. Im Gegensatz dazu zeigte die deutlich höhere Konzentration von 200 x MHK MT02 im Vergleich zur Kontrollkultur keinen Unterschied. Auch eine Steigerung der Substanzmenge auf 500 x MHK MT02 ergab lediglich eine Reduktion der intrazellulären Bakterien auf ca.  $4 \times 10^5$  pro Ansatz. Aufgrund zytotoxischer Effekte, welche die Ergebnisse verfälscht hätten, wurden keine höheren MT02-Konzentrationen untersucht. Die Zugabe von sehr hohen Konzentrationen an MT02 zu HEK-Zellen ergab also keine deutliche Verringerung der Anzahl überlebender intrazellulärer *S. aureus*-Zellen. Die plausibelste Erklärung hierfür ist, dass MT02 nicht in HEK-Zellen eindringen kann und somit die intrazellulären *S. aureus*-Zellen nicht erreichen kann. Dabei könnte entweder überhaupt kein MT02 in die Zellen gelangen oder lediglich eine geringe Menge, die nicht ausreicht um intrazelluläre Bakterien zu beeinflussen. Jedoch konnten an dieser Stelle auch komplexere

Mechanismen wie beispielsweise metabolomische Prozesse innerhalb der eukaryotischen Zellen, die zum Abbau und somit zur Unwirksamkeit von MT02 führen würden, nicht ausgeschlossen werden.

### **4.1.13 Studien zur Zellgängigkeit von MT02 mittels Fluoreszenzmikroskopie**

Wie oben erläutert bindet MT02 an DNA und verdrängt dort bereits interkaliertes Ethidiumbromid aus der DNA. Außerdem ist die Zytotoxizität von MT02 gegen eukaryotische Zellen im Vergleich zu den MHK-Werten gegen Gram-positive Bakterien gering. Hoechst 33342 ist ein Farbstoff, welcher ähnlich Ethidiumbromid nach Interkalation in die DNA fluoresziert. Eukaryotische Zellen wurden zunächst mit Hoechst 33342 gefärbt und anschließend mit MT02 inkubiert. Damit wurde untersucht, ob MT02 in eukaryotische Zellen eindringen, den Farbstoff von der DNA verdrängen und somit dessen blaue Fluoreszenz unterbinden kann. MT02 selbst fluoreszierte bei der verwendeten Wellenlänge gelblich, wobei das Signal erst schwach war und mit zunehmender Expositionsdauer stark zunahm. In parallelen Ansätzen wurden Zellen vor der Färbung mit Hoechst 33342 permeabilisiert um die Zellgängigkeit des Farbstoffs zu erhöhen.

Wie in den Abbildungen 4.21 A) und E) zu sehen ist, färbte Hoechst 33342 die DNA, welche sich in den Zellkernen befindet an, was zu einem blauen Fluoreszenzsignal führte. Waren die Zellen vor der Färbung permeabilisiert worden, emittierten manche Zellkerne deutlich mehr Licht (Abbildung 4.21 E)), jedoch nicht alle, was darauf schließen lässt, dass die Permeabilisierung unter den gegebenen Bedingungen nicht vollständig erreicht wurde. Durch längere Inkubationszeiten während der Permeabilisierung konnte keine Verbesserung erzielt werden. Die Färbung mit MT02 (Abbildung 4.21 B)+F)) führte zu einer gelben Fluoreszenz der gesamten Zellen, wobei vom Zellkern ein deutlich höheres Signal ausging. MT02 drang demnach in die Zellen ein und akkumulierte im Zellkern. Das weitaus stärkere Signal in Abbildung 4.21 F) im Vergleich zu Abbildung 4.21 B) ist auf eine längere Expositionsdauer unter dem Mikroskop zurückzuführen. Bis auf diesen Unterschied der Signalstärke ließ sich zwischen den permeabilisierten und den nicht permeabilisierten Zellen nach Inkubation mit MT02 kein Unterschied im Bezug auf die Signalverteilung feststellen. MT02 dringt also auch in nicht permeabilisierte Zellen ein. Erfolgte zunächst eine Färbung mit Hoechst 33342 und anschließend mit MT02, konnte bei kurzer Expositionsdauer unter dem Fluoreszenzmikroskop teilweise ein blaues Signal im Zellkern detektiert werden (Abbildungen 4.21 C)+G)). Dieses verblasste jedoch recht schnell und konnte nur bei ca. 25 % der Zellen festgestellt werden. Die Abbildungen 4.21 D)+H) zeigen Zellen,



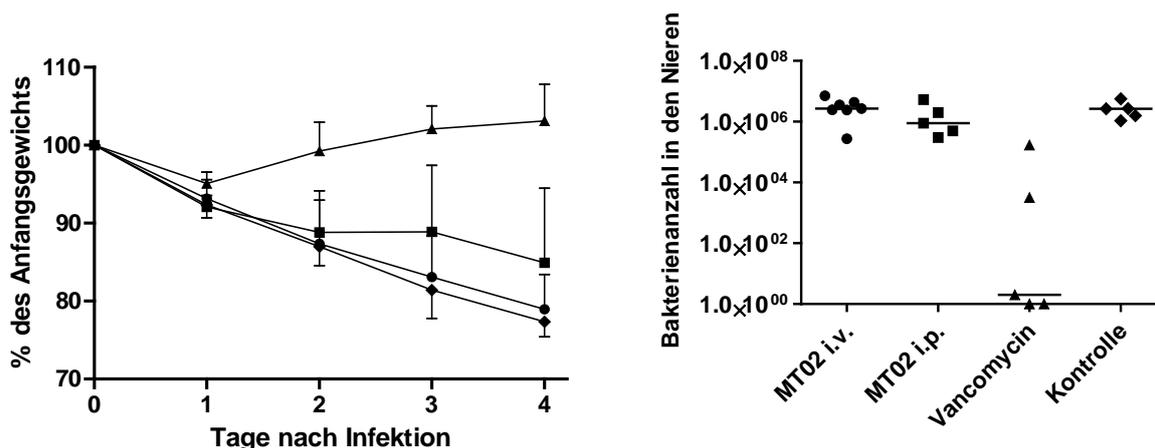
**Abbildung 4.21:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A-549 Zellen nach Färbung mit A)+E) Hoechst 33342, B)+F) MT02, C)+D)+G)+H) Hoechst und MT02; Zellen der Bilder E)-H) wurden vor der Färbung permeabilisiert; Balken: 50 μm

die ebenfalls zunächst mit Hoechst 33342 und anschließend mit MT02 behandelt wurden und kein blaues Signal emittierten. Auch bei diesen doppelt gefärbten Präparaten war kein Einfluss der Permeabilisierung der Zellen auf das Färbungsvermögen der beiden Farbstoffe auszumachen. MT02 konnte sich folglich in eukaryotischen Zellen ansammeln, wobei die Konzentration im Zellkern am größten war. Zudem konnte MT02 eine vorherige Bindung von Hoechst 33342 so verändern, dass kein blaues Fluoreszenzsignal mehr detektierbar war. Generell hatte die Permeabilisierung der Zellen kaum Einfluss auf das qualitative Ergebnis der Färbungen, weder im Fall von Hoechst 33342, noch bei MT02.

### **4.1.14 MT02 im murinen Nierenabszessmodell**

Nachdem die Zytotoxizitätstests eine recht hohe Toleranz der eukaryotischen Zellen gegen MT02 gezeigt hatten, sollte nun untersucht werden, inwiefern sich die Substanz *in vivo* in der Maus zur Behandlung von Infektionen durch *S. aureus* einsetzen lässt. Dazu wurden zunächst Vorversuche zur Verträglichkeit von MT02 in der Maus durchgeführt. In einem ersten Versuch wurde jeweils einer Maus eine einmalige Dosis von 50, 150 und 270 µg/kg MT02 in die Schwanzvene injiziert. Alle drei Mäuse zeigten daraufhin keine auffällige Reaktion und die Kontrolle des Gewichts über die folgenden fünf Tage ergab eine Zunahme von 3,6 bis 7,3 %. Diese Dosen an MT02 waren also für die Mäuse gut verträglich.

Anhand dieser Daten wurden mit 4 Gruppen mit je 5 Mäusen Infektionen im Nierenabszessmodell untersucht. Alle Mäuse wurden an Tag 0 mit jeweils  $6 \times 10^7$  *S. aureus* HG001 über die Schwanzvene infiziert. Eine Gruppe erhielt als Positivkontrolle für die Infektion im Anschluss 0,9 % NaCl-Lösung *i. p.* verabreicht, eine zweite Gruppe erhielt 30 mg/kg/Tag Vancomycin *i. p.* als Kontrollantibiotikum. Zwei weitere Gruppen erhielten jeweils 500 µg/kg/Tag MT02, einerseits *i. p.*, andererseits *i. v.* injiziert. Die Gabe der Antibiotikadosen erfolgte an Tag 0 nach 2, 4 und 6 Stunden nach der Infektion. An Tag 1 und 2 wurden jeweils zwei Dosen gegeben, an Tag 3 eine. An Tag 4 wurden die Mäuse euthanasiert, die Nieren entnommen und die Bakterienzahl in den Nieren bestimmt. Abbildung 4.22 zeigt sowohl den Gewichtsverlauf der Tiergruppen sowie die Anzahl der nach Versuchsende in den Nieren nachgewiesenen Bakterien.

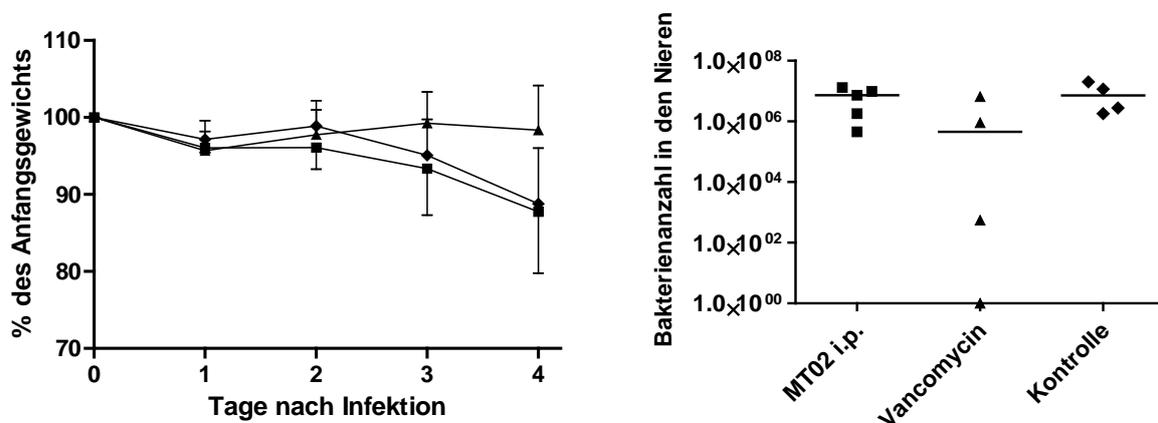


**Abbildung 4.22:** In-vivo-Aktivität von MT02 im Nierenabszessmodell mit BALB/c Mäusen und *S. aureus* HG001; Infektion an Tag 0 mit  $6 \times 10^7$  cfu über die Schwanzvene; Links: Gewichtsverlauf der Tiergruppen bei Behandlung mit (●) 500 µg/kg/d MT02 i. v., (■) 500 µg/kg/d MT02 i. p., (▲) 30 mg/kg/d Vancomycin i. p., (◆) 0,9 % NaCl i. p.; Zeitpunkte der Antibiotikagabe: 2, 4, 6, 24, 32, 48, 56, 72 und 80 h nach Infektion; Zeitpunkt der Euthanasie: 96 h nach Infektion; Rechts: Bakterienanzahl in den Nieren an Tag 4

Die Mäuse der Kontrollgruppe ohne Antibiotikabehandlung verloren über den Versuchszeitraum ca. 20 % ihres Gewichts. In den Nieren wurde eine Bakterienzahl von über  $2 \times 10^6$  festgestellt. Im Gegensatz dazu erreichten die Mäuse, die mit Vancomycin behandelt wurden zu Versuchsende im Schnitt eine Gewichtszunahme von ca. 3 % und in den Nieren war die Zahl der Bakterien bei drei von fünf Mäusen auf nahezu null reduziert. Durch Behandlung mit MT02 über die Schwanzvene ließ sich weder die Gewichtsabnahme noch die Anzahl der Bakterien in den Nieren reduzieren. Durch Gabe von MT02 i. p. verloren die Mäuse im Durchschnitt ca. 15 % ihres Gewichts und die Bakterienzahl in den Nieren war bei Versuchsende nicht reduziert.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein zweiter Tierversuch zur allgemeinen Verträglichkeit von MT02 durchgeführt um mittels einer Steigerung der Dosis eine antibakterielle Wirkung zu erkennen. Diesmal wurden jeweils einer Maus an drei aufeinanderfolgenden Tagen 0,5 bzw. 2,5 mg/kg MT02 i. p. verabreicht. Das Gewicht der Mäuse nahm während des Versuchszeitraums um 1,6 % bzw. 1,7 % zu, was darauf schließen ließ, dass die Mäuse diese Dosen gut vertrugen. Einer weiteren Maus wurden 12,5 mg/kg MT02 i. p. verabreicht. Diese zeigte ca. 5 min nach der Injektion motorische Störungen und Desorientierung. Nach weiteren 5 min verschlechterte sich der Zustand, weshalb der Versuch abgebrochen wurde. Einer vierten Maus wurden 2,5 mg/kg MT02 i. v. verabreicht. Diese starb ca. 15 sek nach Verabreichung der Dosis.

Anhand dieser Daten wurde ein zweiter Infektionsversuch im Nierenabszessmodell durchgeführt. Die Infektionsdosis betrug diesmal  $5 \times 10^7$  Bakterien. Erneut erhielt eine Kontrollgruppe 0,9 % NaCl-Lösung und eine zweite Kontrollgruppe 30 mg/kg/Tag Vancomycin i. p. verabreicht. Im vorangegangenen Tierversuch konnten zu Versuchsende keine Unterschiede in der Bakterienzahl in den Nieren zwischen den i. p. und i. v. mit MT02 behandelten Mäusen festgestellt werden. Das Gewicht war bei den i. p. behandelten Mäusen jedoch im Schnitt um 5 % weniger reduziert. Deshalb wurde nun lediglich eine Gruppe mit 2 mg/kg/Tag i. p. behandelt und auf eine Injektion der Substanz i. v. verzichtet. Im Übrigen blieben die Anzahl und Zeiten der Antibiotikagaben identisch zum ersten Versuch beibehalten. In Abbildung 4.23 sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt.



**Abbildung 4.23:** In-vivo-Aktivität von MT02 im Nierenabszessmodell mit BALB/c Mäusen und *S. aureus* HG001; Infektion an Tag 0 mit  $5 \times 10^7$  cfu über die Schwanzvene; Links: Gewichtsverlauf der Tiergruppen bei Behandlung mit (■) 2 mg/kg/d MT02 i. p., (▲) 30 mg/kg/d Vancomycin i. p., (◆) 0,9 % NaCl i. p.; Zeitpunkte der Antibiotikagabe: 2, 4, 6, 24, 32, 48, 56, 72 und 80 h nach Infektion; Zeitpunkt der Euthanasie: 96 h nach Infektion; Rechts: Bakterienanzahl in den Nieren an Tag 4

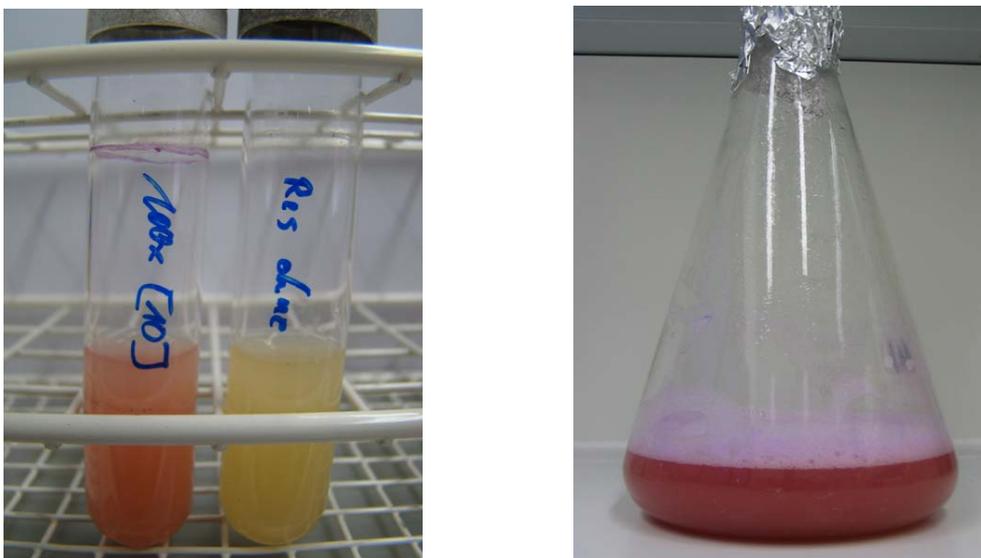
Die mit MT02 behandelten Mäuse verloren im gleichen Maße an Gewicht, wie die mit NaCl-Lösung behandelten, in diesem Fall um ca. 12 %. Die Kontrollgruppe, welche Vancomycin erhielt, verlor auf die Versuchsdauer knapp 2 %. Auch bei der Bakterienanzahl in den Nieren zu Versuchsende zeigte sich die gleiche Tendenz wie beim vorherigen Versuch: Die Anzahl ließ sich durch die Verabreichung von MT02 im Vergleich zur Infektionskontrolle nicht verringern. Durch die Gabe von Vancomycin erniedrigte sich dieser Wert in einer Maus auf null, bei zwei blieb er jedoch auch hier unverändert hoch.

Der Einsatz von MT02 im hier verwendeten Maus-Nierenabszessmodell führte somit nicht zu einer Heilung bzw. Milderung der durch *S. aureus* HG001 herbeigeführten Infektion. Jedoch ist auch Vancomycin unter den hier angewendeten Versuchsbedingungen nicht in der Lage, bei allen Mäusen die Infektion durch *S. aureus* zu verhindern bzw. zu heilen.

## 4.2 Charakterisierung einer MT02-resistenten Mutante

### 4.2.1 Generierung MT02-resistenter Stämme

Mit dem Ziel, den Wirkungsmechanismus von MT02 gegen Staphylokokken genauer untersuchen zu können, wurden resistente Mutanten der Stämme HG001, RN1, MA12 und Xen29 erzeugt. Dies war nicht möglich, indem Kulturen auf MH-Platten mit 100 x MHK MT02 ausplattiert und über Nacht inkubiert wurden. Es kam also zu keinen spontanen Mutationen die eine Resistenz bewirkten. Aus diesem Grund wurden die Stämme in Flüssigkulturen mit ansteigenden Konzentrationen an MT02 überimpft, bis die Menge an MT02 100 x MHK entsprach. Die so erhaltenen resistenten Stämme wurden als HG001<sup>R</sup>, RN1<sup>R</sup>, MA12<sup>R</sup> und Xen29<sup>R</sup> bezeichnet. Die Entwicklung einer Resistenz ging dabei mit einer zunehmenden Rotfärbung der Kulturen mit ansteigenden MT02-Konzentrationen einher, die ab einer Konzentration von ca. 30 x MHK MT02 zu erkennen war (siehe Abbildung 4.24).

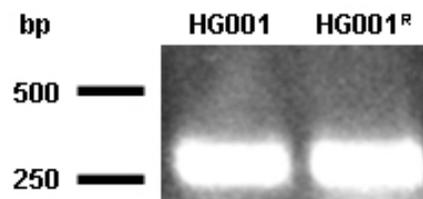


**Abbildung 4.24:** Linkes Bild: Je 4 ml 18 h Kulturen von *S. aureus* HG001<sup>R</sup>; links: + 100 x MHK MT02, rechts: ohne MT02; Rechtes Bild: 500 ml 8 h Kultur von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> + 100 x MHK MT02

Die Resistenz blieb auch nach längerer Inkubation von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> in Medium ohne MT02 erhalten. So wurde eine Kultur täglich zweimal in frisches Medium ohne MT02 überimpft und nach einer Woche wieder in Medium mit 100 x MHK MT02. Die Kultur zeigte erneut Wachstum in Medium mit MT02. Bei diesen Versuchen zeigte sich der rote Phänotyp allerdings nur, wenn MT02 dem Medium zugegeben wurde, jedoch nicht ohne die Substanz.

#### 4.2.2 Verifizierung der MT02-resistenten Mutante als *S. aureus* HG001<sup>R</sup>

Um sicherzustellen, dass es sich bei Bakterien in diesen roten Kulturen nach wie vor um den ursprünglichen *S. aureus* Stamm handelte, wurden mehrere Tests angewendet. Zunächst wurden die beiden Kulturen lichtmikroskopisch untersucht, wobei sich keine morphologischen Unterschiede erkennen ließen. Zudem wurde ein Api<sup>®</sup> Staph Test durchgeführt, welcher sowohl für *S. aureus* HG001 als auch für *S. aureus* HG001<sup>R</sup> das gleiche Stoffwechselprofil ergab. Außerdem wurde die genomische DNA isoliert und mittels PCR das Vorhandensein des *nuc*-Gens überprüft, welches für eine *S. aureus*-spezifische thermostabile Nuklease codiert. Ist das Gen in dem untersuchten Bakterium vorhanden, handelt es sich demnach um einen *S. aureus*-Stamm (Brakstad *et al.*, 1992). Das Ergebnis zeigt Abbildung 4.25.



**Abbildung 4.25:** PCR-Fragmente zum Nachweis des *nuc*-Gens in der genomischen DNA von *S. aureus* HG001 (links) und HG001<sup>R</sup> (rechts) nach Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung

Da auch das Genom des gegen MT02 resistenten Isolats HG001<sup>R</sup> für das *nuc*-Gen codiert, handelt es sich um einen Vertreter der Art *S. aureus*. Um nachzuweisen, dass es sich bei den *S. aureus* Stämmen HG001 und HG001<sup>R</sup> um das gleiche Isolat handelt, wurde zusätzlich deren chromosomale DNA isoliert, ein Teil der für die 16 S rDNA codierenden Sequenzen amplifiziert, sequenziert und im Anschluss die erhaltenen Genom-Sequenzen miteinander verglichen. Die verwendeten Primer waren 16S rDNA 24for und 16S rDNA 1492rev, so dass das untersuchte DNA-Fragment eine Länge von 1468 bp hatte. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit dem Programm Vector NTI Advance 10 (Invitrogen, Karlsruhe) analysiert und mittels BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) miteinander verglichen. Die erhaltenen Sequenzen der beiden untersuchten Stämme stimmten zu 99 % überein. Somit war nachgewiesen, dass die MT02-resistente Mutante HG001<sup>R</sup> ein Abkömmling des Stamms *S. aureus* HG001 war.

#### 4.2.3 Kreuzresistenzen von *S. aureus* HG001<sup>R</sup>

Es wurde untersucht, ob der MT02-resistente Stamm HG001<sup>R</sup> Kreuzresistenzen gegen weitere Naphthalimide sowie gegen Antibiotika mit bekanntem Wirkungsmechanismus besitzt. Tabelle 4.8

gibt die MHK-Werte des Ursprungsstammes HG001 sowie des Stammes HG001<sup>R</sup> gegen die getesteten Substanzen an.

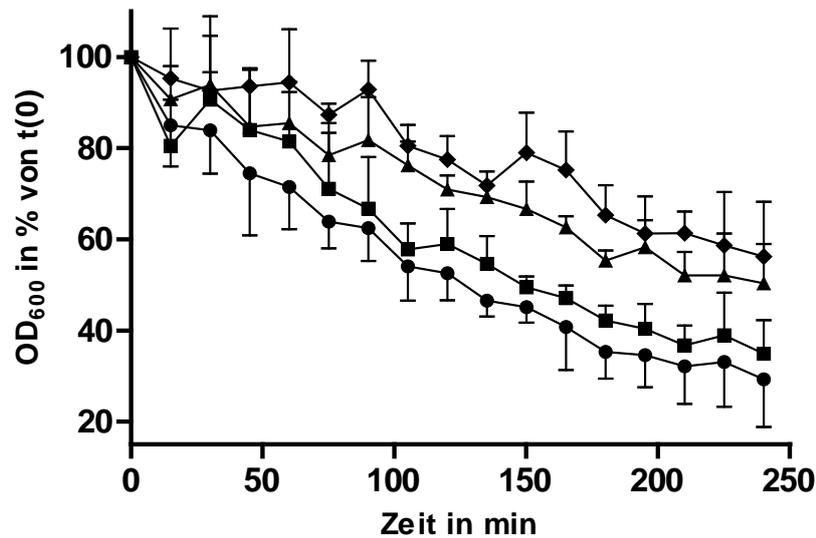
**Tabelle 4.8:** MHK-Werte von *S. aureus* HG001 und HG001<sup>R</sup> gegen verschiedene Naphthalimide sowie die Veränderung der MHK-Werte nach Erwerb der MT02-Resistenz

Substanz	MHK-Wert <i>S. aureus</i> HG001 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	MHK-Wert <i>S. aureus</i> HG001 <sup>R</sup> [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Änderung der MHK
MT02	0,63	160	x 256
MT03	20	20	---
MT04	40	80	x 2
MTFP03	5	40	x 8
MTFP04	2,5	40	x 16
MTFP05	10	80	x 8
MTFP06	20	40	x 2
MTFP07	40	40	---
MTFP08	10	20	x 2
MTFP09	10	10	---
MTFP10	5	20	x 4
MTFP11	5	10	x 2
MTFP12	1,25	5	x 4
Ciprofloxacin	0,2	0,39	x 2
Levofloxacin	0,08	0,31	x 4
Rifampicin	0,013	0,4	x 32
Gentamicin	0,38	1,5	x 4
Chloramphenicol	2,5	5	x 2
Oxacillin	6,25	1,56	x 0,25

Bei keiner der untersuchten Naphthalimide war eine ähnlich starke Resistenz von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> zu beobachten wie gegen MT02. Allerdings stieg der MHK-Wert von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> gegenüber MTFP03 und MTFP05 um das Achtfache sowie gegenüber MTFP04 um das Sechzehnfache an. Zudem hat sich die Toleranz gegenüber MTFP10 und MTFP12 vervierfacht. Somit kann eine gewisse Kreuzresistenz gegen andere Naphthalimide postuliert werden, welche jedoch nicht bei allen Derivaten auftritt. Gegenüber den DNA-Gyrase-Hemmern Ciprofloxacin und Levofloxacin war die MT02-resistente Mutante geringfügig unsensibler, ebenso gegenüber den Proteinbiosynthese-Inhibitoren Gentamicin und Chloramphenicol. Auffällig ist die um den Faktor 32 gesteigerte Toleranz gegenüber dem Transkriptions-Inhibitor Rifampicin. Bemerkenswerterweise war Oxacillin als Inhibitor der Zellwandbiosynthese das einzige hier getestete Antibiotikum, gegen das die MT02-resistente Mutante empfindlicher war als der nicht-resistente Stamm HG001.

#### 4.2.4 Einfluss von MT02 auf die Autolyse von *S. aureus* HG001<sup>R</sup>

Auch mit der MT02-resistenten Mutante wurde untersucht, ob die Präinkubation von Kulturen mit MT02 die Autolyseeigenschaften zu verändern vermag. Abbildung 4.26 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.



**Abbildung 4.26:** Auswirkung der vorherige Inkubation von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> mit (●) 0 x, (■) 1 x, (▲) 10 x und (◆) 100 x MHK MT02 auf die Entwicklung der optischen Dichte in Autolysepuffer; Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an

Durch die Inkubation von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> in Autolysepuffer ohne vorherige Zugabe von MT02 nahm die optische Dichte innerhalb von 4 Stunden stetig bis auf 30 % des Anfangswertes ab. Durch vorherige Inkubation mit 1 x MHK MT02 zeigte sich eine nur geringe Abweichung dieses Endwertes um weniger als 5 %. Stärker war die relative Zunahme des Endwertes nach Zugabe von 10 x bzw. 100 x MHK MT02, was zu einer Abnahme der optischen Dichte auf Werte von 60 % bzw. 65 % des Anfangswerts führte. Durch vorherige Inkubation der Bakterien mit MT02 wird also die Autolyse von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> verringert. Vergleicht man die Autolyserate des nicht MT02-resistenten Stamms *S. aureus* HG001 (Abbildung 4.4) mit den hier erhaltenen, ergibt sich ohne vorherige Inkubation mit MT02 bzw. nach Zugabe von 1 x MHK MT02 kaum ein Unterschied. Ohne MT02 nehmen die OD-Werte auf ca. 35 % bzw. ca. 30 % ab, nach Zugabe von 1 x MHK MT02 erreichen sie in beiden Fällen ca. 35 %. Erst nach Inkubation mit 10 x MHK MT02 unterscheiden sich die Werte deutlicher: Beim Stamm HG001 sinken sie auf knapp 60 %, beim resistenten Stamm HG001<sup>R</sup> auf 50 %. Der größte Unterschied trat nach Inkubation mit 100 x MHK MT02 auf, wonach der OD-Wert des Stamms HG001 nur auf 80 % des Ursprungswertes absank, beim Stamm HG001<sup>R</sup> jedoch auf weniger als 60 %. Bei

höheren Konzentrationen an MT02 kam es beim MT02-resistenten Stamm also vergleichsweise zu einer stärkeren Autolyse als beim nicht-resistenten Stamm.

#### 4.2.5 Auswirkungen von MT02 auf das Transkriptom von *S. aureus* HG001<sup>R</sup>

Um Hinweise auf die Ursache der Resistenz von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> zu bekommen wurden auch mit diesem Stamm Transkriptomanalysen mit den oben beschriebenen Microarray-Chips durchgeführt. Hierbei wurde die Gesamt-RNA des Stammes HG001<sup>R</sup> ohne MT02-Zugabe mit der Gesamt-RNA des Stammes HG001<sup>R</sup> nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK MT02 (bezogen auf den Stamm HG001) verglichen. Die Gesamtheit aller 410 durch die Inkubation mit MT02 deregulierten Gene mit Beschreibung der Funktion des zugehörigen Proteins, soweit bekannt, ist in Tabelle A3 im Anhang aufgelistet. Davon waren 185 herunterreguliert und 225 hochreguliert. Tabelle 4.9 zeigt eine Auswahl dieser Gene, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

**Tabelle 4.9:** Deregulierte Gene wichtiger Stoffwechselwege von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK MT02

ORF	x-fache Änderung						
<b>Gene ribosomaler Proteine</b>							
hochregulierte ORFs							
SACOL0584	SACOL2236	SACOL2239	SACOL2238	3,26	3,34	3,42	3,20
SACOL2227	SACOL2224	SACOL0585	SACOL0583	3,33	2,87	3,62	2,29
SACOL0586	SACOL2207	SACOL2229	SACOL2220	3,61	2,29	2,32	2,53
SACOL2232	SACOL2212	SACOL2223	SACOL1725	3,25	3,26	2,09	3,88
SACOL1702	SACOL2234	SACOL2237	SACOL2228	2,82	2,29	3,58	3,14
SACOL1700	SACOL2231	SACOL2221	SACOL1608	2,26	3,21	2,74	2,35
SACOL1726	SACOL1274	SACOL2233	SACOL1769	2,70	2,62	3,03	3,08
SACOL2222	SACOL0437	SACOL0592	SACOL2225	2,46	2,98	2,29	3,20
SACOL2206	SACOL2240	SACOL2214	SACOL2215	2,82	3,03	3,04	2,67
SACOL2226	SACOL1292	SACOL1254	SACOL2230	2,52	2,43	2,67	3,11
SACOL0439	SACOL2235	SACOL1642	SACOL1635	2,65	2,50	2,51	2,34
	SACOL2217	SACOL1727	SACOL0593	2,24	2,20	2,29	
<b>DNA-Metabolismus</b>							
hochregulierte ORFs							
SACOL1357	SACOL1267	SACOL1390	SACOL2072	2,47	2,19	2,16	2,97
SACOL2109	SACOL0438	SACOL2213	SACOL2120	2,32	2,41	3,51	2,57
herunterregulierte ORFs							
	SACOL0824	SACOL0823		0,48	0,42		

## Fortsetzung Tabelle 4.9

**Zellhülle**

## hochregulierte ORFs

SACOL1242	SACOL0507	SACOL0980	SACOL0247	2,71	2,51	2,10	5,47
	SACOL0699	SACOL1264			2,80	2,12	

## herunterregulierte ORFs

SACOL1319	SACOL1320	SACOL0214	SACOL0177	0,31	0,30	0,23	0,23
SACOL0244	SACOL0136	SACOL0137	SACOL0138	0,32	0,21	0,12	0,38
SACOL0139	SACOL0140	SACOL0141	SACOL0142	0,25	0,36	0,35	0,35

**Eisen-/Metall-Metabolismus**

## hochregulierte ORFs

SACOL0102	SACOL0797	SACOL0798	SACOL0799	2,27	4,07	3,33	5,28
SACOL2165	SACOL2166	SACOL2565	SACOL2564	2,08	2,07	2,43	2,26
	SACOL0099	SACOL2277	SACOL0796		2,42	3,97	3,24

## herunterregulierte ORFs

SACOL1952	SACOL0679	SACOL0680	SACOL0681	0,49	0,48	0,48	0,47
SACOL0682	SACOL1084	SACOL2572	SACOL2068	0,50	0,25	0,47	0,09
	SACOL2067	SACOL2066			0,10	0,16	

**Transportproteine**

## hochregulierte ORFs

SACOL2252	SACOL2347	SACOL2566		2,04	3,91	7,77	
-----------	-----------	-----------	--	------	------	------	--

## herunterregulierte ORFs

SACOL0991	SACOL0992	SACOL0993	SACOL0994	0,24	0,26	0,24	0,29
-----------	-----------	-----------	-----------	------	------	------	------

**Purin/Pyrimidin Stoffwechsel**

## hochregulierte ORFs

SACOL0018	SACOL1214	SACOL1215	SACOL1212	2,60	5,40	7,65	4,72
SACOL1213	SACOL2606	SACOL1217	SACOL1216	4,99	2,19	12,52	11,92
	SACOL2119	SACOL1210			2,72	2,25	

## herunterregulierte ORFs

SACOL1079	SACOL1078	SACOL1080	SACOL1077	0,40	0,45	0,43	0,45
-----------	-----------	-----------	-----------	------	------	------	------

**Stressproteine**

## hochregulierte ORFs

SACOL2731	SACOL1636	SACOL1637	SACOL1638	2,23	2,83	3,10	3,08
SACOL0270	SACOL2016	SACOL2017	SACOL2291	2,17	2,56	3,05	5,77

**Regulatoren**

## hochregulierte ORFs

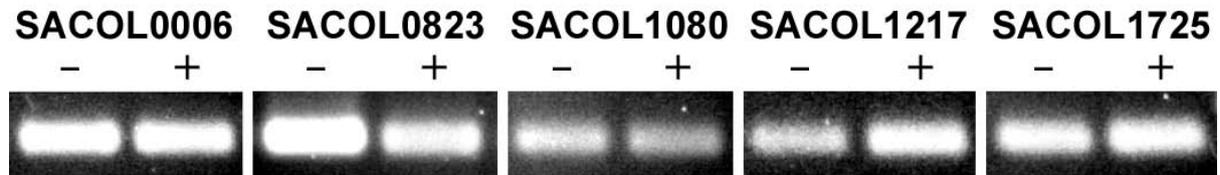
SACOL0672	SACOL0096	SACOL2258	SACOL0726	2,01	2,78	2,06	3,23
-----------	-----------	-----------	-----------	------	------	------	------

Nach der Inkubation der MT02-resistenten Mutante HG001<sup>R</sup> waren insgesamt 44 ribosomale Gene hochreguliert, davon 18 bzw. 26 Gene für ribosomale Proteine der 30 S bzw. 50 S Untereinheit.

Zudem wurden zwei Initiationsfaktoren (SACOL2217 und SACOL1727) sowie ein Elongationsfaktor der Proteinbiosynthese (SACOL0593) vermehrt exprimiert. An DNA-modifizierenden Enzymen waren die Theronuklease (SACOL1357), die Topoisomerasen I und IV (SACOL1267 und SACOL1390), eine Methylase (SACOL2109), ein Einzelstrang-bindendes Protein (SACOL0438) sowie die beiden Untereinheiten alpha und beta einer RNA-Polymerase (SACOL2213 und SACOL2120) vermehrt exprimiert. Die für eine Excinulease codierenden Gene *uvrA* und *uvrB* waren hingegen leicht herunterreguliert. Bezüglich der Zellhülle waren ebenfalls einige Gene beeinflusst. So waren unter anderem ein Regulator der Fettsäuresynthese (SACOL1242), eine Mureinhydrolase (SACOL0247), das Penicillin-Bindeprotein 4 (SACOL0699) und eine Zellwandhydrolase (SACOL1264) hochreguliert. Andererseits waren Gene zur Glycerolaufnahme und -verarbeitung (SACOL1319 und SACOL1320), eine Fettsäureligase (SACOL0214), die Acetylmuranimat-Etherase (SACOL0177), ein weiteres Zellwand Biosyntheseprotein (SACOL0244) sowie sieben Syntheseproteine von Kapselpolysacchariden (SACOL0136 bis SACOL1042) herunterreguliert. Ebenfalls beeinflusst war der Eisen- bzw. Metall-Metabolismus der Bakterien. Insgesamt elf Gene zur Biosynthese von Siderophoren und Eisentransportern erschienen vermehrt exprimiert, wohingegen Ferritin (SACOL1952) herunterreguliert war. Zudem waren Gene, welche im Transport von anderen Ionen als Eisen involviert sind, verringert exprimiert, darunter Transporter von Kalium (SACOL2066 bis SACOL2068), Kupfer (SACOL2572) und Cobalt (SACOL1084). Weitere Transportproteine, die zumeist Oligopeptide transportieren waren ebenfalls herunterreguliert (SACOL0991 bis SACOL0994). Teilweise stark hochreguliert waren hingegen die Gene für einen Wirkstoffresistenz-Transporter (SACOL2347), ein Gen für ein Protein der Resistenz-Transporter AcrB-Familie (SACOL2252) sowie für eine hypothetische Effluxpumpe (SACOL2566). Teilweise bis zu zwölffach hochreguliert waren neun Gene der Pyrimidinsynthese (SACOL 1210, SACOL1212 bis SACOL1217, SACOL2119 und SACOL2606). Im Gegensatz dazu waren vier Gene der Purinbiosynthese herunterreguliert (SACOL1077 bis SACOL1080). Innerhalb dieses Stoffwechselweges war lediglich das Gen der Adenylosuccinatsynthetase (SACOL0018) hochreguliert. Zudem an hochregulierten Genen erwähnenswert sind zwei Staphyloxanthin Biosyntheseproteine (SACOL0270 und SACOL2291), ein Kälteschock-Gen (SACOL2731) sowie vier Chaperone und ein Chaperon-Cofaktor (SACOL1636 bis SACOL1638, SACOL2016 und SACOL2017). Auffällig war auch, dass die vier virulenzspezifischen Regulatoren *sarA* (SACOL0672), *sarS* (SACOL0096), *sarV* (SACOL2258) und *sarX* (SACOL0726) hochreguliert waren.

#### 4.2.6 Validierung der Transkriptomanalysen von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> mit MT02

Auch hier erfolgte eine Bestätigung der erhaltenen Daten durch semiquantitative RT-PCR (Abbildung 4.27). Die hierfür verwendeten Gene waren *uvrB*, *purM*, *pyrE* und *rplT*. Als Kontrollgen diente wiederum *gyrA*.



**Abbildung 4.27:** Validierung der Transkriptionsanalyse zur Untersuchung des Resistenzmechanismus *S. aureus* HG001<sup>R</sup> gegen MT02 mit semiquantitativer RT-PCR anhand ausgewählter Gene; (-): Proben aus Kontrollkulturen ohne MT02, (+): Proben aus Kulturen nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK MT02

Das Kontrollgen SACOL0006 (*gyrA*) wurde unter beiden Bedingungen gleichstark exprimiert. Die im Microarray als herunterreguliert bestimmten Gene SACOL0823 (*uvrB*) und SACOL1080 (*purM*) erschienen auch nach Zugabe von MT02 in der semiquantitativen RT-PCR weniger stark exprimiert. Die Gene SACOL1217 (*pyrE*) und SACOL1725 (*rplT*), welche im Microarray als hochreguliert bestimmt wurden, zeigten auch hier eine vermehrte Expression nach Zugabe von MT02. Die Daten der Transkriptomanalyse konnten somit anhand ausgewählter Gene verifiziert werden.

#### 4.2.7 Versuche zur Identifizierung des roten Farbstoffs

Als Ursache für die Rotfärbung der MT02-resistenten Mutante *S. aureus* HG001<sup>R</sup> wurde zunächst eine Überproduktion von Staphyloxanthin angenommen. Dieses Carotinoid, welches für die orange-goldene Färbung von *S. aureus* verantwortlich ist, dient dem Organismus unter anderem als Antioxidans. Aufgrund der höheren Toleranz von *S. aureus* HG001 gegen MT02 unter Anwesenheit von Ascorbinsäure wurde angenommen, dass eine Überproduktion von Staphyloxanthin den gleichen Effekt haben und somit eine deutlich erhöhte Toleranzgrenze gegen MT02 bewirken könnte. Aus diesem Grund wurde Staphyloxanthin wie von Pelz *et al.* 2005 beschrieben aus einer rot gefärbten Kultur von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> isoliert. Dabei ließ sich der rote Farbstoff jedoch nicht wie beschrieben in die organische Phase extrahieren. Zudem ließ er sich nicht dünnschichtchromatographisch auftrennen, weshalb davon ausgegangen wurde, dass es sich bei dem roten Stoff nicht um Staphyloxanthin handelt.

Eine weitere mögliche Ursache für die rote Färbung könnte der Abbau der Substanz MT02 sein. Es war bekannt, dass MT02 im basischen pH-Bereich zersetzt wird, wobei eine ziegelrote Färbung eintritt. Wurde zusätzlich Aceton zugegeben war die resultierende Farbe der der resistenten Kultur sehr ähnlich. Bei Wachstum der resistenten Mutante mit 100 x MHK MT02 änderte sich der pH-Wert des Mediums im gleichen Maße wie beim Wachstum von *S. aureus* HG001 ohne MT02. Deshalb konnte ausgeschlossen werden, dass eine Änderung des pH-Werts zu basischen Werten hin durch die Produktion von Stoffwechselprodukten während des Wachstums der resistenten Mutante zur Zersetzung von MT02 und somit zu einer Rotfärbung führt. Jedoch könnte die MT02-resistente Mutante HG001<sup>R</sup> einen Weg gefunden haben, das für sie schädliche MT02 auf eine ähnliche Art abzubauen.

### 4.3 Erstellung von Transkriptomprofilen von *S. epidermidis* zur Charakterisierung von Wirkungsmechanismen neuer Antibiotika

Die Auswirkung auf das Transkriptom von *S. epidermidis* 567 von Antibiotika mit bekanntem Wirkungsmechanismus sowie den beiden neu synthetisierten antibakteriellen Substanzen MT02 und MT109 wurde mittels Microarray-Studien ermittelt. Die anschließende vergleichende Auswertung der erhaltenen Transkriptionsmuster sollte Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus der neuen Substanzen erlauben. Als Vergleichsantibiotika wurden das  $\beta$ -Lactam Oxacillin, der Proteinbiosyntheseinhibitor Gentamicin sowie der DNA-Gyrase hemmende Stoff Ciprofloxacin eingesetzt. Somit waren drei Hauptgruppen der kommerziell verbreiteten Antibiotika vertreten. Die Bakterienkulturen wurden jeweils für eine Stunde mit 10 x MHK der jeweiligen Substanz inkubiert, bevor die RNA isoliert und anschließend weiterverarbeitet wurde. Tabelle 4.10 zeigt eine Zusammenfassung der Anzahl der durch das jeweilige Antibiotikum deregulierten Gene sowie die Anzahl der jeweils hoch- bzw. herunterregulierten Gene. Dabei wurden nur solche Gene berücksichtigt, die im Vergleich zur Kontrollkultur ohne Antibiotikum mindestens zweifach hoch- bzw. herunterreguliert waren.

**Tabelle 4.10:** Anzahl deregulierter Gene von *S. epidermidis* 567 nach 60minütiger Inkubation mit jeweils 10 x MHK der untersuchten Antibiotika

Antibiotikum	deregulierte Gene		
	gesamt	hoch	herunter
Oxacillin	25	21	4
Gentamicin	39	25	14
Ciprofloxacin	971	628	343
MT02	249	133	116
MT109	601	248	353

Die Zugabe von Oxacillin und Gentamicin führte zur Deregulation von einer relativ geringen Anzahl an Genen, nämlich 28 bzw. 39. Im Gegensatz dazu erzeugte die Zugabe von Ciprofloxacin, MT02 oder MT109 mit 971, 249 bzw. 601 deregulierten Genen eine deutlich größere Veränderung innerhalb des Transkriptoms von *S. epidermidis*. Im Folgenden wird nun etwas genauer auf die erhaltenen Ergebnisse eingegangen. In den Tabellen 4.11 und 4.12 sind dafür alle durch Oxacillin bzw. Gentamicin deregulierten Gene aufgelistet. Aufgrund der großen Anzahl der durch Ciprofloxacin, MT02 und MT109 deregulierten Gene sind diese Ergebnisse nur zusammenfassend dargestellt, die Gesamtheit der hierbei erhaltenen Daten sind in den Tabellen A4, A5 und A6 im Anhang zu finden.

**Tabelle 4.11:** Deregulierte Gene von *S. epidermidis* 567 nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK Oxacillin

ID	Beschreibung	x-fache Änderung
113	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	3,320
187	ClpB (ClpB Chaperon Homolog)	2,112
432	Kupfertransportierende ATPase CopA	3,202
453	Sortase	2,039
693	Hypothetisches Protein sav2529	2,253
746	DNA-3-Methyladenin Glykosidase	2,428
777	Hypothetisches Protein YvqF	2,975
823	SgtB (Hypothetisches Protein sav1874)	2,350
830	ThiD	2,174
1023	Hypothetisches Protein sav1930	0,451
1071	Hypothetisches Protein sav1932	0,314
1111	Zweikomponenten Sensor Histidin-Kinase	3,027
1554	Hypothetisches Protein sav1934	0,355
1564	IcaR	2,775
1581	Beta-Lactamase Repressor	7,614
1589	Hypothetisches Protein sa1215	2,292
1636	Hypothetisches Protein sav1728	2,144
1742	Zweikomponenten Response Regulator	3,062
1781	CtpA (wahrscheinlich carboxyterminal prozessierende Proteinase)	2,117
1790	Hypothetisches Protein orfx	3,018
1834	PrsA (Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase)	2,357
1888	Hypothetisches Protein sav1931	0,412
2015	Hypothetisches Protein sav0579 (VraX)	7,056
2032	Hypothetisches Protein sav1691	2,142
STEP_99	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	3,371

Die 60minütige Inkubation von *S. epidermidis* mit 10 x MHK Oxacillin führte zu 21 hoch- und 7 herunterregulierten Genen. Elf dazugehörigen Proteinen konnte bis jetzt noch keine Funktion zugeordnet werden, weshalb sie als hypothetisch bezeichnet wurden. Dazu gehörten auch alle herunterregulierten Gene. Neben den regulatorischen Komponenten mit den IDs 1111, 1564 und 1742 fielen der Beta-Lactamase-Repressor (ID 1581) auf, welcher mit dem Faktor 7,6 das am höchsten positiv regulierte Gen darstellte. Zudem war das an der Polymerisation des Peptidoglycans beteiligte Gen *sgtB* um den Faktor 2,35 hochreguliert. Diese beiden Gene können direkt mit dem bekannten Wirkungsmechanismus des Zellwand-Antibiotikums Oxacillin in Verbindung gesetzt werden.

**Tabelle 4.12:** Deregulierte Gene von *S. epidermidis* 567 nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK Gentamicin

ID	Beschreibung	x-fache Änderung
5	Aminosäure ABC Transporter (Homolog)	2,196
98	Hypothetisches Protein sav0610	2,013
233	CtaB (Cytochrom Caa3 Oxidase Homolog)	2,211
249	DNA-gerichtete RNA Polymerase Untereinheit beta	0,489
348	Quinolon Resistenz Protein NorA	2,066
417	Hypothetisches Protein sav2362	2,587
515	Hypothetisches Protein sav1555	2,034
572	Riboflavin-spezifische Deaminase	0,436
597	Hypothetisches Protein sav1320	2,329
673	Hypothetisches Protein sav2406	2,104
832	ATP Synthase Untereinheit delta	0,495
849	50s ribosomales Protein L15	0,433
851	30s ribosomales Protein S3	0,473
864	IcaB	2,246
897	30s ribosomales Protein S5	0,374
964	Hypothetische Peptidase	0,423
993	50s ribosomales Protein L18	0,473
1017	Hypothetisches Protein sav1894	2,039
1039	30s ribosomales Protein S11	0,487
1041	50s ribosomales Protein L6	0,434
1060	YomG	0,445
1089	30s ribosomales Protein S8	0,483
1214	Hypothetisches Protein sav2351	2,113
1391	Hypothetisches Protein sav0831	0,442
1395	Acetoin Dehydrogenase Untereinheit E1	0,483
1493	Hypothetisches Protein sav0178	2,528
1572	NirD	0,391
1592	Hypothetisches Protein sav1781	0,358
1620	Hypothetisches Protein 41.4 kDa	0,351
1623	Hypothetisches Protein sav2267	2,037
1775	Hypothetisches Protein sav0293	0,413
1807	Protein mit Prenyl-Bindestelle	0,423
1911	wahrscheinlich: Urease Untereinheit gamma	0,395
1945	Methionyl-tRNA Synthetase	0,459
1955	Ribosephosphat Pyrophosphokinase	0,462
1964	orf122 (Fragment)	0,454
1984	Protein mit Prenyl-Bindestelle	0,476
2024	Hypothetisches Protein tc0114	0,392
2032	Hypothetisches Protein sav1691	3,352

Bei der Untersuchung des Einflusses von Gentamicin auf das Transkriptom von *S. epidermidis* 567 war zunächst auffällig, dass es zu keiner starken Deregulation von Genen kam. Alle erhaltenen Werte lagen zwischen 0,35 und 3,36, so dass kein Gen um mehr als das 3,5-fache über- oder unter-exprimiert wurde. Auch hier waren die Gene vieler hypothetischer Proteine beeinflusst. Mit dem Wirkungsmechanismus von Gentamicin, der Inhibition der Proteinbiosynthese durch Bindung an die 30 S ribosomale Untereinheit, konnte die verminderte Expression von sieben ribosomalen Proteinen (IDs 849, 851, 897, 993, 1039, 1041 und 1089) in Zusammenhang gebracht werden. Zudem erschien die Methionyl-tRNA-Synthetase herunterreguliert (ID 1945). Ein Aminosäure-ABC-Transporter-Homolog (ID 5) hingegen war hochreguliert, was auf einen erhöhten Transport von Aminosäuren in die Bakterienzellen rückschließen lässt und somit auch mit dem Wirkungsmechanismus von Gentamicin in Verbindung stehen kann.

Durch die Zugabe von Ciprofloxacin wurden 40 Gene ribosomaler Proteine beeinflusst. Davon wurden jedoch im Gegensatz zur Behandlung mit Gentamicin 13 hoch- und 27 herunterreguliert. Viele Gene, deren zugehörige Proteine mit dem DNA-Metabolismus der Bakterien in Zusammenhang stehen, wurden durch den Einfluss von Ciprofloxacin hochreguliert. Dazu gehören Excinuklease-Untereinheiten (IDs 25, 73 und 188), Helicasen (IDs 210, 677 und 1164) und Gyrase-Untereinheiten (IDs 1166, 1310, STEP\_2146 und STEP\_2149). Des Weiteren waren Gene für eine Rekombinase (ID 491), ein Chromosom-Segregationsprotein (ID 631), eine Exonuklease (ID 749), eine Primase (ID 1551) sowie für *radC* (ID 650), *recF* (ID 1358), *mutS* (ID 737) und *lexA* (ID 386), welche in DNA-Reparaturmechanismen eine Rolle spielen, hochreguliert. Auch Gene verschiedener DNA-Polymerasen waren von dieser vermehrten Expression betroffen (IDs 92, 541, 1406, 1838, 1974 und 2033). Hinzu kam eine Vielzahl von Transposasen, teilweise von mobilen genetischen Elementen, die wie beispielsweise ID 215 und ID 1871 mitunter sehr stark hochreguliert waren, in diesem Fall welche jeweils um den Faktor 23.294 bzw. 1301,409. Zudem war eine potentielle Invertase des Transposons Tn552 um den Faktor 71,672 hochreguliert. Ebenfalls auffällig waren vier Gene der Riboflavin-Biosynthese (IDs 476, 524, 685 und STEP\_1222), welche um die Faktoren 16,245, 13,384, 6,418 bzw. 12,665 hochreguliert waren. Bezüglich der Zellwand wurden zwei Gene von Teichonsäure Biosynthese Proteinen (IDs 103 und 1187) als überexprimiert gefunden, wohingegen ein Protein dieses Stoffwechselweges (ID 1235) herunterreguliert war. Das Zellteilungsprotein FtsZ (ID 144), das Gen für Drp35 (ID 1155), das an der Zellteilung beteiligte Protein MraZ (ID 1338), sowie drei Autolysine (IDs 174, 1188 und 1236) waren ebenfalls herunterreguliert. Außerdem konnten zwei hochregulierte Gene (IDs 187 und 1030) der allgemeinen Stressantwort von *S. epidermidis* zugeordnet werden. Ersteres kodiert für ein Chaperon-Homolog von ClpB, Letzteres für das generelle Stressprotein 20 U.

Auch durch den Einfluss von MT02 wurde die Transkription von 17 ribosomalen Genen beeinflusst, welche jedoch alle vermehrt exprimiert wurden. Bezüglich des DNA-Metabolismus wurden einige hochregulierte Gene gefunden, wobei eine Excinuklease-Untereinheit (ID 188) mit dem Faktor 5,061 das am Stärksten überexprimierte Gen dieser Gruppe darstellt. LexA (ID 386) war knapp vierfach hochreguliert, zudem wurde ein Replikationsprotein (ID 990), die Helicase PcrA (ID 1067), das Replikations-Initiations Protein DnaA (ID 1454) sowie eine Ligase (ID 1552) jeweils zwischen doppelt und dreifach hochreguliert. Zwei weitere an der DNA-Reparatur beteiligte Enzyme (IDs 650 und 653) waren ebenfalls hochreguliert. Auch hier wurden vier Gene der Riboflavin-Biosynthese als hochreguliert gefunden (IDs 476, 524, 572 und STEP\_1222), drei davon waren auch durch Ciprofloxacin hochreguliert. Das Gen für ein Zellteilungsprotein (ID 286), sowie das für die Zellwandbiosynthese benötigte Gen *mraZ* (ID 1338) waren durch MT02 verringert exprimiert, ebenso wie das an der Oxacillin-Resistenz beteiligte Gen *fmtC* (ID 724). Wie schon bei den Versuchen mit Ciprofloxacin war das generelle Stressprotein 20 U (ID 1030) stark hochreguliert.

Vergleicht man diese Daten mit denen, die bei den Versuchen mit *S. aureus* HG001 erhalten wurden (Tabelle 4.5), fallen gewisse Gemeinsamkeiten auf. So wurden in beiden Organismen durch die Inkubation mit MT02 viele Gene des DNA-Metabolismus hochreguliert. Dazu passend ist bei beiden Arten das *lexA*-Gen vermehrt transkribiert. Außerdem sind sowohl bei *S. aureus* HG001 als auch bei *S. epidermidis* 567 Gene der Zellteilung bzw. Zellwandbiosynthese herunterreguliert.

Die Inkubation von *S. epidermidis* 567 mit MT109 ergab eine Deregulation von Genen ribosomaler Proteine, wobei 15 davon mitunter bis zu 19-fach hochreguliert (ID 105) und zwei herunterreguliert wurden. Bezüglich des DNA-Metabolismus konnten auch hier einige überexprimierte Gene gefunden werden. Darunter befanden sich Excinuklease-Untereinheiten (IDs 25, 73 und 188), zwei Helicase-Proteine (IDs 1067 und 1164) und Gyrase-Untereinheiten (IDs 1166 und 1310). Des Weiteren waren Gene für ein Chromosom-Segregationsprotein (ID 631), eine Exonuklease (ID 749), eine Primase (ID 1551) und eine Ligase (ID 1552) hochreguliert. *recF* (ID 1358) und *lexA* (ID 386) sowie ein weiteres Gen, welches an einem DNA-Reparaturmechanismus beteiligt ist (ID 653), waren ebenfalls hochreguliert. Auch das Replikations-Initiations-Protein DnaA (ID 1454) und zwei Gene von DNA-Polymerasen (IDs 541 und 1406) waren von dieser vermehrten Expression betroffen. Hinzu kamen eine Vielzahl von Transposase-Genen, die ebenfalls hochreguliert waren (IDs 43, 213, 215, 235, 374, 894, 1007, 1079 und 1162). Drei Gene der Riboflavin-Biosynthese (IDs 476, 524 und 572) waren mehr als zehnfach vermehrt exprimiert, welche alle auch bei den Versuchen mit MT02 und zwei bei den Versuchen mit Ciprofloxacin hochreguliert waren. Bezüglich der Zellwand-Biosynthese waren das Protein Drp35 (ID 1155) sowie ein Autolysin (ID 1188) mehr als dreifach überexprimiert. Im Gegensatz dazu waren vier Gene des Teichonsäure-Stoffwechsels herunterreguliert (IDs 6, 54, 102

und 150), ebenso wie *mraZ* (ID 1338) und zwei an der Zellteilung beteiligten Proteine (IDs 286 und 1434). Auch bezüglich der Stressantwort konnten hochregulierte Gene gefunden werden, darunter fünf Chaperone bzw. deren Cofaktoren (IDs 519, 785, 1602, 1839 und 1939) und erneut das generelle Stressprotein 20 U (ID 1030). Dem gegenüber standen das Kälteschock Protein CscC (ID 2006) sowie das Homolog eines Resistenz-Proteins gegen toxische Anionen (ID 314), welche beide mehr als elffach herunterreguliert waren.

Durch einen Vergleich diese Daten mit denen, die durch die Inkubation von *S. aureus* HG001 mit MT109 erhalten wurden (Tabelle 4.6) finden sich ebenfalls Übereinstimmungen. So waren bei beiden Organismen eine Reihe ribosomaler Proteine und eine Vielzahl an Genen des DNA-Metabolismus hochreguliert. Außerdem waren Gene der Riboflavin-Biosynthese und der bakteriellen Stressantwort in beiden Fällen vermehrt transkribiert.

Generell lässt sich also feststellen, dass durch die Inkubation von *S. epidermidis* 567 mit Gentamicin oder Oxacillin jeweils nur eine relativ geringe Änderung des Transkriptom ergibt. Dies erklärt sich dadurch, dass die beiden Wirkstoffe einen definierten Wirkungsmechanismus besitzen, welcher die Bindung funktioneller Proteine beinhaltet und somit zum Stopp gewisser Syntheseprozesse führt. Im Fall von Gentamicin ist dies die Inhibition der Proteinbiosynthese durch Bindung an Proteine der 30 S Untereinheit der Ribosomen, bei Oxacillin die Hemmung der Mureinbiosynthese durch Bindung der D-Alanin Transpeptidase. Die gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass in den Bakterien nur die Transkription gezielter Gene verändert wird, um dem jeweiligen Antibiotikum entgegenwirken zu können. Im Gegensatz dazu haben die Substanzen Ciprofloxacin und MT02 eine enorme Auswirkung auf das Transkriptom. Dies lässt den Schluss zu, dass Substanzen, die den DNA-Metabolismus beeinflussen zu einer relativ undefinierten Reaktion der Bakterien führen. Sowohl der DNA-Gyrase-Hemmer Ciprofloxacin als auch die interkalierende Substanz MT02 haben diese Auswirkungen zur Folge. Aufgrund der großen Anzahl der deregulierten Gene nach der Behandlung mit MT109 dann davon ausgegangen werden, dass der Wirkungsmechanismus dieser Substanz ebenfalls die DNA bzw. den DNA-Metabolismus beinhaltet.

Vergleicht man die Daten der Versuche von *S. aureus* HG001 mit denen von *S. epidermidis* 567 gegen die Antibiotika MT02 und MT109, so erhält man wiederum nur relativ wenige Gemeinsamkeiten. Im Vergleich zu der großen Anzahl an insgesamt durch diese Antibiotika deregulierten Genen stimmen nur Gene aus bestimmten Kategorien aus beiden Bakterienarten überein. Auf diese Weise lassen sich aus der großen Anzahl deregulierter Gene solche herausfiltern, die spezifisch mit dem Wirkungsmechanismus der Substanz zusammenhängen. Im Fall von MT02 sind das die Gene DNA-prozessierender Proteine, sowie solche zur Zellteilung und Zellwandbiosynthese. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine mögliche sekundäre Wirkung von MT02 die

Zellhülle der Bakterien als Ziel hat. Im Fall von MT109 kommen ebenfalls untergeordnete Wirkungsmechanismen in Frage. Allerdings ist hier neben einer DNA-gerichteten Aktivität zusätzlich von einer Beeinträchtigung der Riboflavin-Biosynthese und möglicherweise auch der Proteinbiosynthese auszugehen. Generell eignet sich die Methode der Transkriptomanalyse also durchaus, um eine erste Einordnung neuer antibakterieller Substanzen in Hinsicht auf deren Wirkungsmechanismus zu erlangen. Jedoch muss der dadurch vermutete Wirkungsmechanismus durch weitere Studien verifiziert und bestätigt werden.

## 5. Diskussion

Schwere bakterielle Infektionen werden in der Regel durch den Einsatz von Antibiotika behandelt. Diese töten Bakterien ab oder hemmen ihr Wachstum, so dass sie vom wirtseigenen Immunsystem bekämpft werden können. Jedoch nimmt die Anzahl von Antibiotika-resistenten Erregern immer mehr zu, so dass diese Therapieform mitunter nicht mehr erfolgreich eingesetzt werden kann. Dabei stellen sowohl die rasche Entwicklung von Resistenzmechanismen gegen neue Wirkstoffe als auch die schnelle Verbreitung von Resistenzen unter den Bakterien enorme Probleme dar. Um diesen zu begegnen, ist die Suche nach und die Entwicklung von neuen Antibiotika eine dringend notwendige Maßnahme. In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von antibakteriellen Substanzen der Stoffklasse der Naphthalimide auf Vertreter der Gattung *Staphylococcus* untersucht. Von MT02, einem bisquartären Bisnaphthalimid, wurde der Wirkungsmechanismus gegen *S. aureus* aufgeklärt sowie die Wirkung *in vitro* und *in vivo* studiert. Zudem wurde eine MT02-resistente Mutante von *S. aureus* HG001 erzeugt, welche bei Wachstum mit hohen Konzentrationen an MT02 einen roten Phänotyp entwickelte. Daraufhin wurden mehrere Studien zur Bestimmung des Resistenzmechanismus und zur Aufklärung des produzierten roten Farbstoffs unternommen. Zusätzlich wurden Transkriptomanalysen mit *S. epidermidis* 567 unter dem Einfluss verschiedener Antibiotika durchgeführt. Mit der Erstellung von Transkriptomprofilen sollte eine Einordnung von neuen antibakteriellen Wirkstoffen hinsichtlich des Wirkungsmechanismus ermöglicht werden.

### 5.1 Wirkungsspektrum von MT02

Von allen hier untersuchten Naphthalimiden besaß das bisquartäre Bisnaphthalimid MT02 die größte antibakterielle Aktivität. Diese wurde durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen erfasst. Gegen mehrere *S. aureus*-Stämme ergaben sich dabei MHK-Werte zwischen 0,15 und 5 µg/ml. Gegen *S. epidermidis*-Stämme unterband die Substanz im Bereich zwischen 2,5 und 5 µg/ml das bakterielle Wachstum. Weitere Gram-positive Erreger wie *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* und verschiedene *Streptococcus*-Spezies ließen sich ebenfalls im Wachstum inhibieren, jedoch erst durch höhere Konzentrationen von 5 bis 40 µg/ml. Im Gegensatz dazu war keine Wirksamkeit gegen Gram-negative Bakterien wie *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Salmonella typhimurium* zu erkennen. Jedoch gab es sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien Ausnahmen dieser generellen Feststellung. So war MT02 gegen den Gram-positiven Erreger *Streptococcus mutans* UA159 nicht wirksam, wohingegen eine Aktivität gegen ein enterotoxisches Isolat von *E. coli* mit einem MHK-Wert von 20 µg/ml vorlag. MT02 wirkt also gegen Gram-positive Erreger mit der besten Wirkung gegen Stämme von *S. aureus*. Generell ist das

Wirkungsspektrum von Bisnaphthalimiden jedoch nicht auf Gram-positive Bakterien beschränkt, da auch gegen den Parasiten *Plasmodium falciparum* eine Wirkung mehrerer Bisnaphthalimide nachgewiesen werden konnte (Tischer *et al.*, 2010).

### 5.2 Studien zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Bei *P. falciparum* wurde auch eine Struktur-Wirkungs-Korrelation von unterschiedlich derivatisierten quartären Bisnaphthalimiden gefunden (Tischer *et al.*, 2010). So ergaben bestimmte Modifikationen der untersuchten Substanzen eindeutig einer Verbesserung oder Verschlechterung der biologischen Aktivität. Es zeigte sich beispielsweise, dass für die anti-plasmodiale Wirkung mindestens sieben Methylgruppen in der Linkerregion notwendig sind. Die beste Aktivität wurde mit acht Methylgruppen erreicht und nahm bei größeren Kettenlängen wieder ab. Eine solche Korrelation konnte für *S. aureus* mit den gleichen Substanzen, die hier mit MTFP03 - MTPF12 bezeichnet werden, nicht gefunden werden (Strukturen siehe Abbildung 2.2 und Tabelle 2.6). Lediglich die Bindungsstudien der Substanzen an ein PCR-Produkt ergaben, dass die Interaktion der Substanzen mit sieben, acht bzw. neun Methylgruppen in der Linkerregion am stärksten war und mit kleineren bzw. größeren Kettenlängen abnahm. Eine Ausnahme davon war die Substanz mit drei Methylgruppen, welche eine stärkere Wechselwirkung mit DNA zeigte als die mit vier und fünf Methylgruppen. Jedoch waren die MHK-Werte bei den Substanzen, die eine starke Wechselwirkung mit DNA aufwiesen höher als bei denen, die keine starke Wechselwirkung hatten. Auch die Bisnaphthalimide MT04 und MT109 ergaben höhere MHK-Werte als MT02. MT04 unterscheidet sich von MT02 lediglich durch die verschiedene Stellung der Nitrogruppen an den Aromaten, da die Substanzen sonst strukturell identisch sind. Da der MHK-Wert von MT04 gegen *S. aureus* HG001 um eine Stufe höher ist als der von MT109, scheinen die Methylgruppen in der Linkerregion von keiner großen Bedeutung für die antibakterielle Aktivität zu sein. Zudem führen die Nitrogruppen lediglich beim 3-Nitro-Naphthalimid-Derivat MT02 zu einer Erniedrigung der MHK-Werte und somit zu einer erhöhten biologischen Aktivität und nicht beim 4-Nitro-Naphthalimid-Derivat MT04. Die untersuchten Mononaphthalimide hatten mit Ausnahme von MT03 keine antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* HG001 und mit Ausnahme von MTFP12 hatte neben MT02 kein anderes untersuchtes Bisnaphthalimid eine ähnlich starke Wirkung. Deshalb muss die starke antibakterielle Aktivität von MT02 innerhalb der Gruppe der Bisnaphthalimide als Einzelfall angesehen werden.

### 5.3 Primärer Wirkungsmechanismus von MT02

Der Wirkungsmechanismus von MT02 gegen *S. aureus* wurde in dieser Arbeit durch den Einsatz verschiedener Methoden bestimmt. Durch radioaktive Ganzzellmarkierung konnte zunächst ein Einfluss von MT02 auf die DNA-Synthese bzw. die Aufnahme und den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in Bakterien festgestellt werden. Besonders bemerkenswert ist dabei die starke Abnahme der intrazellulären Menge an radioaktiv markiertem Thymidin nach zwei Stunden, ein Zeitpunkt, zu dem MT02 noch kaum Auswirkungen auf das Wachstum von *S. aureus* HG001 hat, wie aus den Ergebnissen der Killing-Kurven zu erkennen ist. Anschließende Gelretardationsversuche ließen eine starke Wechselwirkung zwischen DNA und MT02 erkennen. Nach Inkubation von DNA mit der Substanz erschienen die Banden auf dem Gel bei einer erhöhten apparenten Größe. Ebenfalls wurde gezeigt, dass MT02 die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA verhindern kann und auch bereits interkaliertes Ethidiumbromid wieder aus der DNA verdrängen kann. Diese Interaktion von DNA und MT02 wurde an doppelsträngigen Oligonukleotiden mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz genauer charakterisiert. Die Bindungsstudien ergaben, dass MT02 direkt an doppelsträngige DNA bindet. Dieser Prozess verläuft konzentrationsabhängig, reversibel und im Bezug auf die untersuchte DNA sequenzunspezifisch. Dies war für das strukturähnliche, tertiäres Bisnaphthalimid Elinafid nicht der Fall. Hierfür wurde eine bevorzugte Interkalation in die Basensequenz 5'-TGCA-3' festgestellt (González-Bulnes, Gallego, 2009). Die errechneten Bindungskonstanten von MT02 liegen im nanomolaren Bereich und bestätigen somit eine sehr starke Bindung von MT02 an DNA. Ähnliche Werte wurden auch bei den Bindungsstudien mit Elinafid gefunden (González-Bulnes, Gallego, 2009). Die Transkriptomanalysen von *S. aureus* HG001 unter dem Einfluss von MT02 ergaben eine Vielzahl an deregulierten Genen. Einige davon waren der Prozessierung von DNA zuzuordnen, was auf einen Einfluss von MT02 auf den DNA-Metabolismus schließen lässt. Die an der Überexpression des *lexA*-Repressors zu erkennende Induktion des SOS-Reparatur-Systems lässt vermuten, dass durch Fehler in der Replikation unter dem Einfluss von MT02 große Schäden an der DNA entstehen. Als Konsequenz daraus kann ebenfalls die hohe Anzahl an hochregulierten Genen von Phagenproteinen angesehen werden. Nach Erkennen der Schäden an der DNA treten die lysogenen Phagen wieder in einen lytischen Lebenszyklus ein, um sich dem DNA-beinträchtigenden Einfluss von MT02 zu entziehen. Dieser Prozess der Aktivierung lysogener Phagen in *S. aureus* wurde auch als Auswirkung des Topoisomerase-Inhibitors Ciprofloxacin und des DNA-quervernetzenden Pyrrolbenzodiazepin-Dimers beobachtet (Goerke *et al.*, 2006; Cirz *et al.*, 2007; Doyle *et al.*, 2010), beides Substanzen, die ebenfalls in den DNA-Metabolismus eingreifen. Auch bei anderen Bakterien wie *P. aeruginosa* wurde diese Wirkung von Ciprofloxacin nachgewiesen (Cirz *et al.*, 2006). Somit scheinen durch die Inkubation mit MT02 möglicherweise während der Replikationsphase erhebliche Schäden wie Doppelstrangbrüche an der bakteriellen DNA aufzutreten,

welche zur Aktivierung von lysogenen Phagen und somit zu hochregulierten Phagengenen führt. Eine andere Gruppe von Genen, die durch den Einfluss von MT02 dereguliert wurden codieren für OpuC-ähnliche Proteine. Diese Transporter spielen eine Rolle in der Virulenz von *S. aureus* und sind unter anderem für die Aufnahme von Glycin, Betain und Carnitin in die Bakterien verantwortlich (Kiran *et al.*, 2009). Diese drei Substanzen enthalten wie MT02 quartäre Amine. Somit könnten die OpuC-ähnlichen Transporter an der Aufnahme von MT02 in die Bakterienzelle beteiligt sein. Die hier beobachtete verringerte Expression dieser Proteine unter Anwesenheit von MT02 könnte somit einen Schutzmechanismus der Bakterien vor der Substanz darstellen.

Neben MT02 wurden auch mit der Substanz MT109 Transkriptomstudien mit *S. aureus* HG001 durchgeführt. Die minimale Hemmkonzentration von MT109 gegen *S. aureus* HG001 lag mit 20 µg/ml um den Faktor 32 höher als die von MT02 und sollte aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit hinsichtlich Übereinstimmungen in der Auswirkung auf das Transkriptom untersucht werden. Ein Vergleich der beiden erhaltenen Datensätze ergab lediglich sechs übereinstimmende Gene mit bekannter Funktion. Fünf davon sind in der Prozessierung von DNA beteiligt, was darauf schließen lässt, dass der Wirkungsmechanismus beider Substanzen ähnlich ist und gegen den DNA-Metabolismus gerichtet ist. Auch unter Einfluss von MT109 sind weitere am DNA-Stoffwechsel beteiligte Proteine deutlich hochreguliert. Gene der Zellwandbiosynthese erscheinen teilweise über- und teilweise herunterreguliert. Dies lässt zwar einen Einfluss der Substanz auf die Zellwandsynthese vermuten, jedoch kann über die genaue Art der Interaktion nur gemutmaßt werden. Drei Gene der Riboflavin-Biosynthese sind sehr stark überexprimiert. Riboflavin dient als Vorstufe für die Flavin-Koenzyme FAD und FMN, welche in Oxidoreduktasen essenziell sind und für die Aufrechterhaltung des oxidativen Gleichgewichts in den Bakterien verantwortlich sind. Die Überexpression von Riboflavin-Synthese-Genen ist somit ein Hinweis darauf, dass auch MT109 in *S. aureus* oxidativen Stress auslöst. Dieser Effekt wurde schon als generelle Auswirkung von Antibiotika auf Bakterien nachgewiesen (Kohanski *et al.*, 2007). Die relativ geringe Übereinstimmung von deregulierten Genen nach Inkubation der Bakterien mit MT02 bzw. MT109 deutet darauf hin, dass trotz der starken strukturellen Ähnlichkeit der Substanzen Unterschiede im Wirkungsmechanismus bestehen. Möglicherweise besitzt MT02 eine so starke Aktivität gegen *S. aureus*, da neben der DNA-Interkalation ein zusätzlicher Wirkungsmechanismus (siehe unten) zum Tragen kommt. Durch die strukturelle Variation von MT109 könnte dieser sekundäre Wirkungsmechanismus verloren gegangen sein, weshalb einerseits der MHK-Wert deutlich höher liegt als bei MT02 und auch das Transkriptionsprofil nach Inkubation mit MT109 von dem von MT02 deutlich abweicht.

## 5.4 Sekundärer Wirkungsmechanismus von MT02

Neben der oben beschriebenen primären Wirkung von MT02 auf die DNA bzw. die DNA-Synthese in *S. aureus* deuten mehrere Ergebnisse auf einen sekundären Wirkungsmechanismus der Substanz hin, welcher die Zellwand bzw. die Zellwand-Biosynthese beinhaltet. Zunächst fiel die deutliche Verdickung der Zellwand nach Inkubation von *S. aureus* mit sehr hohen Konzentrationen wie 50 x und 100 x MHK MT02 auf. Diese war in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten der Bakterien deutlich zu erkennen. Zudem erschien die Oberfläche der Zellen unregelmäßig und aufgeraut, was für einen Einfluss von MT02 auf die Zellwandbiosynthese spricht. Eine Verdickung der Zellwand wurde bereits für den Einfluss von anderen Antibiotika wie Chloramphenicol und Methicillin auf *S. aureus* beschrieben (Reinicke *et al.*, 1983; Yoshida *et al.*, 2003). Nach Behandlung mit Methicillin trat zudem eine raue Zellwand auf (Yoshida *et al.*, 2003). Da das  $\beta$ -Lactam Methicillin in die Zellwandbiosynthese eingreift verwundert eine veränderte Struktur der Zellwand unter Einfluss dieses Antibiotikums nicht. Jedoch überrascht es, dass diese Effekte ebenfalls nach Inkubation mit dem Proteinbiosynthesehemmer Chloramphenicol sowie mit der DNA-aktive Substanz MT02 auftreten. Allerdings zeigt das Beispiel Chloramphenicol schon, dass auch bei anderen antibakteriellen Substanzen neben dem primären Wirkungsmechanismus auch sekundäre Prozesse durch Antibiotika ausgelöst werden können. Neben der verdickten Zellwand wurde durch Lebend-Tot-Färbungen bei hohen Konzentrationen von 50 x MHK MT02 Zellaggregate von toten *S. aureus*-Zellen beobachtet. Ein ähnlicher Effekt trat auch nach Inkubation von Vancomycin-sensitiven *S. aureus* mit subinhibitorischen Konzentrationen des Zellwand-Biosynthese-Blockers Vancomycin auf (Sieradzki, Tomasz, 2006). Die daraus hervorgehenden Stämme hatten einen Vancomycin-intermediären Phänotyp (VISA) entwickelt. Zusätzlich spricht die deutlich verringerte Autolyse von *S. aureus* HG001 unter dem Einfluss von MT02 für einen sekundären Wirkmechanismus der Substanz. So wird durch hohe Konzentrationen von 10 x oder 100 x MHK MT02 die Abnahme der optischen Dichte nach vier Stunden in Autolysepuffer um 20 % bzw. 40 % verringert. Die Ursache hierfür könnte die Verdickung der Zellwand, wie sie bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu sehen ist, sein. Die Lyse der Bakterien durch das im Autolysepuffer enthaltene Detergens Triton X-100 würde aufgrund der dickeren Peptidoglycanschicht zeitlich verzögert. Auch unter dem Einfluss anderer Antibiotika wie der Protein-Biosynthese-Hemmer Tetracyclin und Chloramphenicol oder der Zellwand-Biosynthese-Inhibitoren Vancomycin und Teicoplanin war eine verringerte Autolyse beobachtet worden (Yamada *et al.*, 2001; Reinicke *et al.*, 1983; Sieradzki, Tomasz, 2006; Yoshida *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu wurde die Autolyse durch die vorherige Inkubation von *S. aureus* mit den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika Oxacillin und Methicillin erhöht (Ledala *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2003). Zusammengefasst sprechen die verdickte Zellwand, die Aggregatbildung und die verringerte Autolyse für einen sekundären Wirkungsmechanismus der Substanz MT02 gegen *S. aureus*, welcher

gegen die Zellwand bzw. die Zellwandsynthese gerichtet ist. Andererseits widersprechen auch einige Ergebnisse der direkten Auswirkung von MT02 auf die Zellwand. So wurde beispielsweise für das  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum Methicillin bei einem Methicillin-sensitiven Stamm eine dreifach erhöhte Produktion an Penicillin-bindendem Protein 2 nach Inkubation mit der Substanz beschrieben (Yoshida *et al.*, 2003).  $\beta$ -Lactamasen, welche zur Gruppe der Penicillin-bindenden Proteine gehören, stellen einen Resistenzmechanismus von Bakterien gegen  $\beta$ -Lactame dar, da sie durch Bindung und Hydrolyse des  $\beta$ -Lactam-Rings diese inaktivieren. Jedoch wurde nach Inkubation von *S. aureus* HG001 mit 10 x MHK MT02 das Penicillin-bindende Protein 1 um das Dreifache herunterreguliert. Da aufgrund eines erhöhten Bedarfs von  $\beta$ -Lactamasen nach einer Bindung von MT02 an diese Enzyme mehr davon exprimiert werden sollte, widerspricht eine verringerte Expression von Penicillin-bindendem Protein 1 der Idee einer  $\beta$ -Lactam-ähnlichen Wirkung von MT02. Andererseits waren durch MT02 die an der Zellwandsynthese beteiligten Enzyme MurD und MraY sowie das an der Zellteilung beteiligte Enzym FtsL herunterreguliert, was für eine Interaktion von MT02 mit der Zellwandsynthese spricht. Im Bezug auf die verringerte Autolyse der mit MT02 inkubierten Bakterien fällt auf, dass keine der bekannten Hydrolasen (Giesbrecht *et al.*, 1998), welche für den Abbau der Zellwand verantwortlich sind, dereguliert waren. Dass trotzdem die Autolyserate nach Inkubation mit 10 x MHK MT02 um 20 % erniedrigt war bedeutet, dass MT02 zwar einen Einfluss auf diesen Mechanismus hat, jedoch eher von einer indirekten Wirkung ausgegangen werden kann. Diese indirekte Wirkung wurde durch zwei weitere Ergebnisse unterstützt, auf die nicht im Detail eingegangen wurde: Zum einen fand nach Zugabe von MT02 zu *S. aureus* 133 keine Depolarisation der Zellmembran statt, was von einer Substanz mit lytischer Wirkung erwartet worden wäre. Zum anderen hatte die Zugabe von MT02 keinen Einfluss auf den Einbau von radioaktiv markiertem Glucosamin in *S. aureus* COL, was bedeutet, dass MT02 keinen direkten Einfluss auf die Zellwandsynthese hat. In Anbetracht der Tatsache, dass MT02 die Dicke der Zellwand und das Autolyseverhalten von *S. aureus* HG001 bei höheren Konzentrationen deutlich beeinflusst, jedoch auf die Zellwandsynthese und die Integrität der Zellmembran keinen direkten Einfluss hat, ist davon auszugehen, dass MT02 zwar eine Auswirkung auf die Zellhülle von *S. aureus* besitzt, diese jedoch einen sekundären Wirkungsmechanismus neben der Interkalation in die DNA darstellt. Unterstützt wird diese These des sekundären Wirkmechanismus durch die Tatsache, dass die Effekte auf die Zellwand meist nur bei sehr hohen Konzentrationen ab 10 x MHK beobachtet werden konnten. Zusammenfassend spricht vieles dafür, dass MT02 neben der Interkalation in die DNA einen sekundären Wirkungsmechanismus gegen *S. aureus* hat. Wie unten näher ausgeführt könnte MT02 auf die gleiche Art wie die bivalenten Kationen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  zunächst an die negativ geladenen Teichonsäuren in der Zellwand binden (Rahman, 2009). Dies würde einerseits die Spezifität gegen

Gram-positive Erreger erklären und andererseits einen gewissen Einfluss auf die Zellhülle, wenn auch keinen direkten Einfluss, begründen.

## 5.5 Zytotoxizität und in vivo-Aktivität von MT02

Die MHK-Werte von MT02 gegen verschiedene Stämme und klinische Isolate von *S. aureus* lagen mit 0,15 bis 5 µg/ml in einem niedrigen Bereich. Vergleichbare Konzentrationen werden auch gegen klinische *S. aureus*-Isolate von den in der Therapie eingesetzten Wirkstoffen Linezolid und Vancomycin benötigt (Biedenbach *et al.*, 2010; Pitz *et al.*, 2011). Zudem ergaben sich keine Kreuzresistenzen mit Methicillin-, Fosfomycin- oder Ciprofloxacin-resistenten Isolaten. Eine wesentliche Eigenschaft von MT02 ist die geringe Zytotoxizität gegen verschiedene hier untersuchte Zelllinien, welche zwischen 73 und mehr als 152 µg/ml lag. Da MT02 an DNA eukaryotischer Zellen ebenso wie an bakterielle DNA bindet und Ethidiumbromid verdrängen kann, wurde vermutet, dass dieser große Unterschied auf verschiedene intrazelluläre Konzentrationen der Substanz zurückzuführen ist. Das würde bedeuten, dass entweder die eukaryotischen Zellen über einen Mechanismus verfügen, MT02 zu detoxifizieren, was beispielsweise durch den Abbau oder die Modifikation des Moleküls erreicht werden könnte. Die zweite Erklärung wäre, dass aufgrund der Unterschiede in dem Aufbau der Zellhüllen die Aufnahme von MT02 in eukaryotische Zellen im Vergleich zu Bakterien deutlich schlechter bzw. verringert ist und somit nur geringere Mengen an MT02 in die Zellen gelangen. Ursache hierfür könnte die durch Teichonsäuren stark negativ geladene Peptidoglycanschicht der Gram-positiven Bakterien sein. Bereits 1973 wurde für *Bacillus licheniformis* als eine Funktion der Teichonsäuren als Bestandteil der Zellhülle die Homöostase bivalenter Kationen identifiziert (Hughes *et al.*, 1973). So führt die elektrostatische Wechselwirkung zur Bindung von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  in der Zellhülle und stellt eine Strategie dar, um möglichst jederzeit ausreichende Mengen dieser Ionen für zelluläre Prozesse zur Verfügung zu stellen (Neuhaus, Baddiley, 2003). Durch ebendiese Wechselwirkungen kann jedoch auch das Kation MT02 angezogen werden, was somit die Grundlage für eine vermehrte Aufnahme der Substanz in die Zellen darstellt. Das würde auch die ausbleibende Wirkung auf Gram-negative Bakterien erklären, welche auf der Zelloberfläche durch eine zweite Membran und nicht durch eine Mureinschicht mit eingelagerten Teichonsäuren abgegrenzt sind. Die große Spanne zwischen MHK-Werten gegen *S. aureus* und Zytotoxizitätswerten gegen die getesteten Zelllinien ließe genügend Spielraum für einen möglichen therapeutischen Einsatz von MT02. Jedoch stehen die Ergebnisse der in vivo-Untersuchungen mit MT02 im Nierenabszessmodell in der Maus diesen Daten entgegen. Die mit MT02 behandelten Tiere hatten nach Versuchsende ebenso viele Bakterien in den Nieren wie die Kontrollgruppe, welche mit Kochsalz-Lösung behandelt wurde. Dabei ergab es keinen deutlichen Unterschied, ob MT02

intraperitoneal oder intravenös verabreicht wurde. Auch eine Steigerung der Dosis beim zweiten Tierversuch hatte keine Verringerung der Bakterienanzahl in den Nieren der mit MT02 behandelten Mäuse zur Folge. Interessanterweise ist das bei einigen Mäusen auch nach der Behandlung mit Vancomycin der Fall. Dieses Kontrollantibiotikum wurde gewählt, da es in der Klinik als gut wirksames Mittel gegen Infektionen mit *S. aureus* beim Menschen Einsatz findet und auch gegen Methicillin-resistente Stämme wirksam ist (Caffrey *et al.*, 2010). Dies deutet schon die Schwierigkeiten der Untersuchung potenzieller neuer Antibiotika im Tiermodell an. Generell kann das Ausbleiben einer therapeutischen Wirkung von Substanzen, die eine gute antibakterielle Wirkung *in vitro* zeigen mehrere Ursachen haben. Eine wesentliche Eigenschaft, die eine Substanz dafür benötigt ist die Bioverfügbarkeit, das heißt, inwiefern die Substanz sich im Organismus verteilt und auch am Ort der Infektion zur Verfügung steht. So kann es beispielsweise vorkommen, dass Substanzen, die über den Blutkreislauf verabreicht werden in der Leber modifiziert bzw. abgebaut werden und somit nicht mehr wirksam sein können. Ebenso können Substanzen über die Nieren sehr schnell nach der Verabreichung wieder ausgeschieden werden. Aus diesen Gründen ist es neben der Untersuchung der Wirksamkeit im Infektionsmodell auch immer erforderlich, pharmakokinetische bzw. pharmakodynamische Studien anzufertigen, die Aussagen über die Verweildauer der administrierten Substanzen im Blutkreislauf zulassen. In ersten Analysen war es nicht möglich, MT02 aus Mäuseserumproben mittels Kapillarelektrophorese zu identifizieren, da es zu starken Überlagerungen des MT02-spezifischen Signals mit Serumproteinen bzw. wahrscheinlich zusätzlich zu einer Zersetzung der Substanz während der standardisierten Probenvorbereitung für die Kapillarelektrophorese kam. Hinzu kommt ein Problem, das am Beispiel von Vancomycin ungewollt bestätigt wurde: Das Wirkungsspektrum von antibakteriellen Substanzen *in vivo* kann selten im Voraus abgeschätzt werden. Wie oben bereits erwähnt, gilt Vancomycin als ein effektives Antibiotikum zur Behandlung von *S. aureus*-Infektionen im Menschen. Diese Wirkung wurde auch für das Nierenabszessmodell in der Maus erwartet, da Vancomycin in der hier verwendeten Dosierung von 30 mg/kg/d in anderen Tierversuchen als Positivkontrolle gute Wirkung erbrachte (Kokain-Kun *et al.*, 2007). Interessanterweise konnten jedoch nicht alle Mäuse erfolgreich behandelt werden. Dies allein bedeutet bereits, dass auch Standard-Antibiotika nicht zwangsläufig den gewünschten therapeutischen Erfolg bringen und es immer von Fall zu Fall Unterschiede geben kann. Offensichtlich sollte Vancomycin im Nierenabszessmodell in der Maus nicht als Positivkontrolle zur Behandlung in Betracht gezogen werden, da die auftretenden Schwankungen im Behandlungserfolg dies nicht rechtfertigen. Neben der ausbleibenden therapeutischen Wirkung von MT02 in diesem Modell ist die zytotoxische Wirkung von höheren Konzentrationen auf die Maus ein weiterer relevanter Punkt. Wie oben bereits diskutiert stammt die Gruppe der Naphthalimide aus der Anti-Krebs-Therapie. Quartäre Derivate wurden speziell hergestellt, um durch die positiven Ladungen die

bekannte Zytotoxizität zu umgehen und die Substanzen somit zu möglichen antibakteriellen Wirkstoffen entwickeln zu können. Jedoch ergab sich bei zu hohen Dosen an MT02 ein deutlicher toxischer Effekt auf die Mäuse, am drastischsten im Fall der Gabe von einmalig 2,5 mg/kg intravenös, was den Tod des Versuchstieres innerhalb von 15 Sekunden zur Folge hatte. Eine solch schnelle tödliche Wirkung könnte durch Störung des zentralen Nervensystems hervorgerufen werden. Diese Vermutung deckt sich mit den in früheren klinischen Studien aufgetretenen toxischen Nebenwirkungen des Mononaphthalimids Mitonafid auf das zentrale Nervensystem (Díaz-Rubio *et al.*, 1994). Als Ursache für diesen Effekt wurde die erhöhte Konzentration der Substanz in der zerebrospinalen Flüssigkeit angesehen, welche aufgrund der hohen Plasmakonzentrationen und erhöhter Passage durch die Blut-Hirn-Schranke ermöglicht wurde. Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben wurde postuliert, dass unter anderem MT02 durch die Quarternisierung der Stickstoffatome die bei den tertiären Verbindungen nachgewiesenen toxischen Eigenschaften verliert. Diese postulierte, nicht vorhandene Zytotoxizität von bisquartären Bisnaphthalimiden konnte im Tierversuch somit nicht bestätigt werden. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die durchgeführten Studien mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Auswertung der erhaltenen Daten zeigt, dass MT02 durchaus auch in der Lage ist, in eukaryotische Zellen einzudringen und sich im Zellkern anzusammeln. Dies geht einerseits daraus hervor, dass die blaue Fluoreszenz des Farbstoffs Hoechst 33342 nicht mehr detektiert werden konnte und dieser somit aus der DNA verdrängt wurde. Andererseits ging bei alleiniger Inkubation der Zellen mit MT02 ein deutliches gelbes Signal von den Zellen aus, welches in den Zellkernen am stärksten war. Da zudem nachgewiesen wurde, dass MT02 *in silico* an DNA aus eukaryotischen Zellen binden kann, ist davon auszugehen, dass dies auch in der Zelle der Fall ist. Somit scheint es, dass MT02 eine stärkere Wirkung auf Bakterien als auf eukaryotische Zellen hat, weil weniger MT02 die DNA in eukaryotischen Zellen erreicht, da vergleichsweise weniger Moleküle der Substanz in die Zellen gelangen. Da nicht davon auszugehen ist, dass eukaryotische Zellen MT02 abbauen, wäre der geringere MT02-Gehalt in eukaryotischen Zellen wiederum alleinig auf oben beschriebene Unterschiede im Aufbau der Zellhülle zurückzuführen.

## 5.6 Resistenzmechanismus von *S. aureus* HG001<sup>R</sup>

Es gibt mehrere Mechanismen von *S. aureus*, um Resistenzen gegen antibakterielle Substanzen zu erwerben. Eine Möglichkeit ist die Modifikation der Zielstruktur des Antibiotikums, wie es beispielsweise bei der Resistenz gegen Rifampicin der Fall ist. Hier haben Mutationen in Untereinheiten der RNA-Polymerase einen Aminosäureaustausch im Enzym zur Folge, so dass die Bindungsaffinität des Antibiotikums an die Polymerase stark verringert wird und es somit seine

Wirksamkeit verliert (Aubry-Damon *et al.*, 1998). Ein anderer Mechanismus ist die Zerstörung der antibakteriellen Substanz, wie es bei den Zellwandbiosynthesehemmern der Gruppe der  $\beta$ -Lactame der Fall ist. Hier spalten  $\beta$ -Lactamasen den  $\beta$ -Lactam-Ring der Antibiotika und zerstören somit deren biologisch aktiven Bestandteil (Zygmunt *et al.*, 1992). Eine dritte Möglichkeit, um antibakteriellen Substanzen zu entgehen ist die Verringerung der Aufnahme bzw. das schnelle Ausschleusen der Moleküle, bevor sie ihr Ziel innerhalb der Bakterien erreichen können. Bei *S. aureus* ist dieser Mechanismus vor allem gegen Quinolone und Fluorquinolone verbreitet (Jacoby, 2005; Nakaminami *et al.*, 2010).

Nach mehrwöchigem Passagieren von *S. aureus* HG001 in Medium mit ansteigenden Konzentrationen an MT02 konnte eine MT02-resistente Mutante erhalten werden, welche mit *S. aureus* HG001<sup>R</sup> bezeichnet wurde. Diese entwickelte ab einer Konzentration von ca. 30 x MHK MT02 einen roten Phänotyp und war schließlich in der Lage auch mit 100 x MHK MT02 zu wachsen. Der rote Phänotyp trat nur nach Zugabe von hohen Konzentrationen an MT02 und während des Wachstums von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> auf. Bezüglich des Resistenzmechanismus von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> gegen MT02 kann mit großer Sicherheit die Modifikation der primären Zielstruktur als Möglichkeit ausgeschlossen werden. Die DNA kann als Makromolekül zur Informationsspeicherung nicht in seiner Gesamtheit strukturell verändert werden, ohne dass ihre Funktion und Integrität beeinträchtigt wird. Wahrscheinlich aus diesem Grund konnten auch keine spontanen, gegen MT02 resistenten Mutanten durch die Inkubation von *S. aureus* mit hohen Konzentrationen an MT02 über Nacht erhalten werden, sondern war die Inkubation über einen so großen Zeitraum wie elf Wochen mit jeweils ansteigenden MT02-Konzentrationen nötig. Dieser Umstand spricht deutlich gegen einen Resistenzmechanismus der durch einfache Mutationen entsteht, sondern für eine langfristige Anpassung und globale Umstellung des Stoffwechsels oder einzelner Komponenten der Bakterien. Allerdings könnte der Resistenzmechanismus gegen MT02 mit einer Veränderung der Zellwandstruktur zusammenhängen. Wie oben beschrieben gibt es viele Hinweise darauf, dass die Zellwand bzw. Zellwand-Synthese neben der DNA ebenfalls ein Target von MT02 darstellt. Beispielsweise wurde durch die Inkubation mit MT02 eine große Anzahl an Genen herunterreguliert, deren zugehörige Proteine am Zellwandaufbau beteiligt sind. Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Teichonsäuren der Zellwand und dem Kation MT02 könnte der Teichonsäure-Gehalt in direktem Zusammenhang mit der Aufnahme von MT02 in die Bakterien stehen. Durch eine Verringerung des Teichonsäure-Gehalts in der Zellwand wäre somit auch weniger MT02 in der direkten Umgebung der Zellen gebunden und es würde in weniger großen Konzentrationen in die Bakterien aufgenommen werden, wo es schließlich durch die Bindung an DNA antibakteriell wirksam wird. Im Transkriptionsprofil der MT02-resistenten Mutante erschienen zudem drei Efflux-Proteine als teilweise stark hochreguliert. Diese können natürlich an der Resistenz

gegen MT02 beteiligt sein, indem die Substanz aktiv aus dem Zytoplasma in die Umgebung transportiert wird. Da die Interkalation von MT02 in die DNA als primärer Wirkungsmechanismus bestätigt wurde, wäre dies auch ein effektiver Resistenzmechanismus, da die Substanz dann ihr Target, in diesem Fall die DNA, nicht mehr erreichen und an dieses binden könnte. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass die antibakterielle Wirkung von Fluorquinolonen, deren Wirkmechanismus indirekt ebenfalls die DNA-Synthese beeinflusst, hauptsächlich durch Efflux dieser Substanzen umgangen wird (Nakaminami *et al.*, 2010).

Im Vergleich zum Wildtyp-Stamm *S. aureus* HG001 ergaben die durchgeführten Experimente eine erhöhte Autolyse von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> nach vorheriger Inkubation mit 10 x und 100 x MHK MT02. Nach vier Stunden waren die OD-Werte von HG001<sup>R</sup> im Durchschnitt um ca. 10 % bzw. 25 % niedriger als die Vergleichswerte von HG001. Zudem ergaben die Transkriptom-Analysen, dass die beiden globalen Regulatoren *sarA* und *sarV* (SACOL0672 und SACOL2258) in der resistenten Mutante nach Inkubation mit MT02 um das Doppelte hochreguliert waren. *SarA* ein negativer Regulator von *sarV* (Manna *et al.*, 2004). Ebenfalls von Manna *et al.* wurde entdeckt, dass *sarV*-Deletionsmutanten unempfindlicher auf Autolyse durch Triton X-100 reagieren, eine Überexpression von *sarV* jedoch zu einer erhöhten Autolyse von *S. aureus* führt. Zudem wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von *sarV* eine verringerte extrazelluläre Murein-Hydrolase Aktivität zu Folge hat. Dies würde bedeuten, dass die vermehrte Expression von *sarV* nach Inkubation mit MT02 ebenfalls die Hydrolase-Aktivität von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> steigert, was die erhöhte Autolyse in Autolysepuffer mit Triton X-100 erklärt. In einer weiterführenden Studie wurde gefunden, dass MRSA *mgrA/sarA*-Doppelmutanten in einem Kaninchen-Endokarditis-Modell deutlich sensitiver gegenüber den Antibiotika Oxacillin und Vancomycin reagierten als die entsprechenden Wildtyp-Stämme COL und MW2 (Trotonda *et al.*, 2009). *mgrA* ist ebenfalls ein globaler Regulator in *S. aureus* und reprimiert wie *sarA* die Expression von *sarV* (Manna *et al.*, 2004). Der MT02-resistente Stamm *S. aureus* HG001<sup>R</sup> war bei in-vitro-Studien um den Faktor vier sensitiver als der Ursprungstamm HG001. Diese Beobachtung deckt sich somit mit den in-vivo-Ergebnissen von Manna *et al.*. Die erhöhte Sensibilität gegenüber einem Antibiotikum war jedoch ausschließlich bei dem Zellwand-aktiven Oxacillin zu finden, alle anderen getesteten Antibiotika zeigten erhöhte bzw. gleichbleibende MHK-Werte im Vergleich zu *S. aureus* HG001. Sowohl bei den *mgrA/sarA*-Deletionsmutanten als auch bei der Inkubation mit MT02 kommt es also zu einer erhöhten Produktion von *SarV* in den Bakterien, was eine erhöhte Autolyse zur Folge hat. Somit würde die Zellwand-aktive Substanz Oxacillin mit der erhöhten Autolyse einen synergistischen Effekt erzielen, was sich in einer Verringerung des MHK-Werts von Oxacillin äußert. Eine weitere Studie ergab, dass *S. aureus*-Isolate, welche durch eine anhaltende Behandlung mit Daptomycin zunehmend resistenter gegen dieses Antibiotikum wurden, eine zunehmend verminderte Autolyse aufwiesen (Jones *et al.*, 2008). Diese verringerte Autolyse ging einher mit

einem höheren Gehalt an kationischem Lysyl-Phosphatidylglycerol in der äußeren Schicht der Zellmembran, wodurch sich der positive Ladungsanteil an der Zelloberfläche erhöht. Interessanterweise ist für die Aktivität von Daptomycin – dessen Wirkungsmechanismus noch nicht genau verstanden ist – die vorherige Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  nötig. Kalzium ist wiederum wie oben beschrieben durch die negativ geladenen Teichonsäuren in die Zellwand eingelagert. Wird nun durch den höheren Gehalt an kationischem Lysyl-Phosphatidylglycerol in der äußeren Schicht der Zellmembran die negative Ladung der Lipoteichonsäuren teilweise kompensiert, wäre weniger zur Aktivierung von Daptomycin notwendiges  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zellhülle vorhanden, was die Aktivität von Daptomycin verringern würde. Ebenfalls für diese Theorie spricht die gefundene Kreuzresistenz der untersuchten Daptomycin-resistenten Isolate gegen humane kationische antibakterielle Peptide (Jones *et al.*, 2008). Obwohl der Resistenzmechanismus gegen Daptomycin noch nicht vollständig verstanden ist, wurde die Erhöhung der positiven Ladung an der Bakterienoberfläche als Teil dieses Mechanismus beschrieben (Yang *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich vermuten, dass sich die Resistenzmechanismen von *S. aureus* gegen MT02 und Daptomycin zumindest teilweise ähneln.

Das auffälligste Merkmal der MT02-resistenten Stämme von *S. aureus* war der während des Wachstums mit MT02 produzierte rote Farbstoff. Zunächst wurde aufgrund der Färbung vermutet, dass es sich dabei um eine Überproduktion von Staphyloxanthin handelt, ein von *S. aureus* produziertes Carotinoid, welches den Kulturen die für sie charakteristische orange Farbe verleiht (Pelz *et al.*, 2005). Die Microarray-Studien mit *S. aureus* HG001<sup>R</sup> ergaben zudem zwei hochregulierte Gene der Staphyloxanthin-Biosynthese. Da viele Antibiotika zusätzlich zu einem zielgerichteten Wirkungsmechanismus auch oxidativen Stress in Bakterien erzeugen (Kohanski *et al.*, 2007), wurde angenommen, dass eine Überproduktion des als Antioxidans fungierenden Staphyloxanthins diesem Stress entgegenwirken und somit die Wirkung von MT02 gegen *S. aureus* abschwächen kann. Jedoch konnte der rote Farbstoff aus MT02-resistenten Kulturen nicht wie für Staphyloxanthin beschrieben in eine organische Phase extrahiert werden und ebenfalls nicht wie beschrieben dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt werden. Da bei der Durchführung dieser Extraktion jedoch durchaus gelb-orange Farbstoffe in der organischen Phase erhalten wurden, also unter anderem das von *S. aureus* produzierte Staphyloxanthin, wurde deutlich, dass die rote Färbung nicht aus einer Überproduktion des Carotinoids resultiert. Zwischenzeitlich wurde jedoch festgestellt, dass die üblicherweise leicht bräunliche MT02-Lösung im basischen pH-Bereich nach Zugabe von Aceton ebenfalls eine starke rote Farbe annimmt, ähnlich derer, wie sie von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> erzeugt wird. Dies spricht für eine Umsetzung bzw. einen Abbau von MT02 unter diesen Bedingungen. Leider konnte das Produkt dieser Umsetzung noch nicht genauer identifiziert bzw. dessen Struktur aufgeklärt werden. Die farbliche Übereinstimmung spricht jedoch stark dafür, dass es sich sowohl bei

der Umsetzung mit Aceton als auch bei Wachstum von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> mit MT02 um das gleiche Produkt handelt. Da sich der pH-Wert der MT02-resistenten Kulturen während des Wachstums nicht von dem der MT02-sensiblen Kulturen unterscheidet, muss bei der in silico-Untersuchung und dem Wachstum von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> ein unterschiedlicher Mechanismus die Umsetzung von MT02 bewirken.

Generell lässt sich zur MT02-Resistenz anmerken, dass diese wie oben diskutiert nicht durch Veränderungen der DNA als primärem Target hervorgerufen werden kann, jedoch möglicherweise durch Modifikation der Zellwandstruktur als sekundärem Target. Die Ergebnisse sprechen auch eindeutig gegen eine spontane Regulation als Ursache für die Resistenz, da diese erst nach langer Inkubationsdauer mit ansteigenden Konzentrationen an MT02 auftrat und sich zudem für längere Zeit manifestiert hat. Wurden Kulturen von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> über vier Tage ohne MT02 inkubiert und anschließend wieder mit der Substanz versetzt, so waren die Kulturen immer noch resistent und produzierten während des Wachstums einen roten Farbstoff. Dieser trat bei der zwischenzeitlichen Inkubation ohne MT02 nicht auf, was im Umkehrschluss bedeutet, dass MT02 direkt mit der Produktion des roten Farbstoffs in Zusammenhang steht. Dies spricht für eine genetische Manifestation des Resistenzmechanismus. Zudem trat der rote Phänotyp der Kulturen erst ab einer Konzentration von ca. 30 x MHK MT02 auf. Eine mögliche Erklärung wäre, dass *S. aureus* HG001 geringere Konzentrationen an MT02 tolerieren kann, indem der Teichonsäure-Gehalt in der Zellwand reduziert wird und somit weniger MT02 in die Zellwand eingelagert wird. Übersteigt die MT02-Konzentration im Medium jedoch einen bestimmten Grenzwert reicht dies als Schutz nicht mehr aus, weshalb ein zweiter Mechanismus – möglicherweise eine enzymatische Umsetzung und somit Inaktivierung von MT02 – zusätzlich benötigt wird, um die antibakterielle Wirkung der Substanz abzuwehren. Andere Bakterien wie beispielsweise *E. coli*, gegen die MT02 keine Wirkung hatte, oder bestimmt *Streptococcus*-Stämme, deren MHK-Wert gegen MT02 höher lag als der gegen *S. aureus*, produzierten bei Wachstum mit hohen MT02-Konzentrationen keinen roten Phänotyp. Zudem konnten von *S. epidermidis* 567 und *B. subtilis* 168 keine MT02-resistenten Stämme erhalten werden. Diese Bakterien konnten auch bei sehr langsamer Steigerung der MT02-Konzentration im Medium nicht weiter als bis zu dem jeweils bestimmten MHK-Wert wachsen. Dies spricht für die Entwicklung eines neuen, spezifischen Resistenzmechanismus von *S. aureus* gegen MT02 und bestätigt die enorme genetische Variabilität dieses Erregers (McCallum *et al.*, 2010).

## 5.7 Vergleichende Transkriptomstudien mit *S. epidermidis*

Im Rahmen von vergleichenden Transkriptionsstudien mit *Staphylococcus epidermidis* sollte eine Einordnung potentieller neuer Antibiotika hinsichtlich ihres Wirkungsmechanismus erreicht werden. Dazu wurde das Transkriptionsprofil von Vertretern aus bekannten Antibiotika-Klassen erstellt, um damit die Ergebnisse von Hemmstoffen mit unbekanntem Mechanismus vergleichen zu können und eine erste Klassifizierung bezüglich der Wirkungsmechanismen der neuen Substanz zu erhalten. Als Vergleichsantibiotika wurden das  $\beta$ -Lactam Oxacillin, das Aminoglykosid Gentamicin und das Fluorquinolon Ciprofloxacin verwendet. Da diese Antibiotika die Zellwandbiosynthese, die Proteinbiosynthese bzw. die DNA-Replikation inhibieren, waren die drei Gruppen von Antibiotika mit den geläufigsten Wirkungsmechanismen einbezogen. Als neue Substanzen mit unbekanntem Wirkungsmechanismus dienten MT02 und MT109. Die Zugabe von Oxacillin zu *S. epidermidis* 567 führte zur Deregulation von insgesamt 25 Genen. Davon konnten zwei Gene direkt mit dem Wirkungsmechanismus in Verbindung gebracht werden. Gentamicin hatte die Deregulation von 39 Genen zur Folge, davon sieben die für ribosomale Proteine codieren und somit den erwarteten Folgen der Wirkung von Gentamicin entsprechen. Die Zugabe von Ciprofloxacin führte hingegen zur Deregulation von 971 Genen. Darunter waren viele, die mit dem Metabolismus von DNA in Verbindung stehen sowie einige Gene von mobilen genetischen Elementen und Gene der Riboflavin-Biosynthese. Gene dieser Funktion waren auch viele unter den 249 bzw. 601 durch MT02 bzw. MT109 deregulierten zu finden. Dies lässt die Rückschlüsse zu, dass sowohl MT02 als auch MT109 ebenso wie Ciprofloxacin einen DNA-bezogenen Wirkungsmechanismus haben. Allein die Tatsache, dass die gegen die Zellwandsynthese bzw. Proteinsynthese gerichteten Antibiotika Oxacillin bzw. Gentamicin jeweils zur Deregulation von weniger als 50 Genen führten, nach der Zugabe von Ciprofloxacin, MT02 und MT109 jedoch jeweils weit über 200 Gene betroffen sind zeigt, dass DNA-aktive Substanzen bzw. solche, die den DNA-Metabolismus stören zur Deregulation von einer sehr großen Anzahl an Genen führt. Zumindest im Fall von MT02 wurde nachgewiesen, dass der primäre Wirkungsmechanismus die Bindung an DNA darstellt, womit die nach den Transkriptionsstudien aufgestellte Vermutung, dass MT02 wie Ciprofloxacin den DNA-Metabolismus beeinflusst, bestätigt wurde. Da viele durch MT109 deregulierte Gene ebenfalls für Proteine des DNA-Metabolismus codieren und auch weitere Übereinstimmungen in der Funktion deregulierter Gene mit den MT02- bzw. Ciprofloxacin-Daten gefunden wurden, kann daraus geschlossen werden, dass auch der Wirkungsmechanismus von MT109 die Bindung an DNA beinhaltet.

Generell lässt sich feststellen, dass das Vergleichen von Transkriptionsprofilen mittels Microarray-Analysen zu einer ersten Einordnung neuer antibakterieller Substanzen durchaus geeignet ist. Jedoch reicht diese Methode zur genauen Bestimmung des Wirkungsmechanismus meist nicht aus. Zunächst

besteht immer die Möglichkeit neue Substanzen zu finden, deren Wirkmechanismus noch durch keine bekannte Substanz vertreten ist. Somit fehlen Vergleichsdaten, auf die man sich beziehen könnte. Ein weiterer Punkt, der die genaue Festlegung eines Mechanismus erschwert ist die noch relativ große Anzahl an hypothetischen Proteinen, deren Funktion noch nicht aufgeklärt ist wodurch wichtige Informationen verloren gehen können. In diesem speziellen Fall kommt zusätzlich das Problem von unterschiedlichen Stammhintergründen bei der Untersuchung hinzu. Die Microarray-Chips waren mit Genen des sequenzierten Stammes *S. epidermidis* RP62A bestückt, jedoch wurde aus technischen Gründen die RNA von *S. epidermidis* 567 isoliert und untersucht. Mögliche Sequenzunterschiede der orthologen Gene könnten zu einer verminderten bzw. unspezifischen Hybridisierung der cDNA an den Chips führen, was teilweise falsch-positiven Ergebnisse zur Folge haben kann. Ein weiteres allgemeines Problem stellen die Konzentration und der Zeitpunkt der RNA-Isolierung nach Zugabe des Antibiotikums dar. So wurden zwar alle hier beschriebenen Untersuchungen mit jeweils 10 x MHK des Antibiotikums durchgeführt und die Gesamt-RNA nach 60minütiger Inkubation isoliert. Jedoch werden beispielsweise nach 10minütiger Inkubation mit einer antibakteriellen Substanz teilweise andere Gene dereguliert als nach 60minütiger Inkubation. Aus diesem Grund müssten deshalb für jedes Vergleichsantibiotikum individuelle Konzentrationen und Isolationszeitpunkte festgelegt werden, wie dies beispielsweise auch bei einer Studie zur Aufklärung von Markergenen nach Antibiotikaeinsatz mittels 2D-Gelelektrophorese umgesetzt wurde (Bandow *et al.*, 2003). Dies erschwert jedoch die Einordnung neuer Substanzen wesentlich, da deren Transkriptionsprofil dann zum Vergleich unter den jeweiligen Bedingungen jeder einzelnen Vergleichssubstanz untersucht werden müsste.

Generell stellt die Methode der Transkriptomanalyse eine gute Möglichkeit dar, um die Auswirkung von antibiotischen Substanzen auf Bakterien zu untersuchen. Dieses Verfahren wurde zugänglich, nachdem bakterielle Genomsequenzen verfügbar waren und somit die entsprechenden DNA-Sonden auf den Chips synthetisiert und entsprechenden Genen des untersuchten Organismus zugeordnet werden konnten (Gray, Keck, 1999). Durch die Untersuchung der allgemeinen Auswirkung von neuen antibakteriellen Substanzen auf das Transkriptom eines Bakteriums kann man somit Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus ziehen. So haben solche Studien beispielsweise im Fall von Chitosan und Daptomycin wesentlich zur Aufklärung des Wirkmechanismus beitragen (Raafat *et al.*, 2008; Muthaiyan *et al.*, 2008). Zusätzlich können die Wirkmechanismen neuer Substanzen mit bereits therapeutisch angewandten Substanzen verglichen werden (Sass *et al.*, 2008). Dies hilft, sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede im Wirkmechanismus zu erkennen, was in Hinsicht auf die später mögliche Resistenzbildung von Bakterien eine wichtige, zusätzliche Information darstellt. Auch für die Untersuchung neu auftretender Resistenzmechanismen können Transkriptomstudien herangezogen werden. Dies wurde beispielsweise im Fall von Dermcidin und anderen

antimikrobiellen Peptiden gegen *S. aureus* erfolgreich angewandt (Lai *et al.*, 2007; Pietiäinen *et al.*, 2009). Mit der Zeit ergab sich zusätzlich zur Untersuchung des Wirkmechanismus neuer Substanzen die Möglichkeit, den Einfluss der Substanzen zu spezifizieren und gezielt die Auswirkung auf bestimmte Targets zu beobachten (Freiberg, Brötz-Oesterheld, 2005). Diese Informationen ermöglichen wiederum die gezielte Modifikation der Substanzen, um aktiverer bzw. spezifischerer Wirkstoffe entwickeln zu können. Die Betrachtung der Auswirkung von Antibiotika auf bestimmte Targets vermeidet auch einen Aspekt, der die Analyse des teilweise komplexen Wirkmechanismus neuer Substanzen erschweren kann. So wirken die meisten Antibiotika nicht auf lediglich ein bakterielles Target, sondern auf mehrere zugleich. Diese Eigenschaft hat dergestalt Auswirkungen auf das Transkriptom, dass deutlich mehr deregulierte Gene gefunden werden als die Folgen der Inhibition des primären Targets vermuten lassen (Brazas, Hancock, 2005).

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Methode der vergleichenden Transkriptomanalyse zur Einordnung von neuen Substanzen in bekannte Antibiotikaklassen durchaus nützlich ist, jedoch zur genauen Bestimmung des Wirkungsmechanismus keinesfalls ausreicht und somit durch weitere Methoden ergänzt werden muss. Die Kombination mit der ebenfalls in dieser Arbeit angewendeten Methode der radioaktiven Ganzzellmarkierung, welche relativ leicht auch auf andere als die drei hier untersuchten bakteriellen Biosynthesewege erweitert werden kann, stellt hierfür eine sehr gute Möglichkeit dar.

## 5.8 Ausblick

Die hier erhaltenen Ergebnisse ergaben eine sehr gute in-vitro-Wirksamkeit von MT02 gegen *S. aureus* und eine geringe Zytotoxizität gegen eukaryotische Zelllinien. Jedoch musste festgestellt werden, dass die Substanz trotz der geringen Aktivität gegen eukaryotische Zellen sehr wohl in diese einzudringen vermag, was ursprünglich von den quarternisierten Bisnaphthalimid-Derivaten nicht erwartet wurde. Zudem war MT02 im Nieren-Abszess-Modell in der Maus nicht wirksam gegen *S. aureus*. Aus diesen Gründen sind die Chancen für eine zukünftige klinische Anwendung von MT02 eher gering. Auch eine Derivatisierung von MT02 mit dem Ziel das Eindringen in eukaryotische Zellen zu verhindern, jedoch die Aktivität gegen Gram-positive Erreger beizubehalten könnte sich schwierig gestalten, da keines der hier bereits getesteten Derivate von MT02 eine ähnlich starke biologische Aktivität besaß. Jedoch bestehen nach diesen Arbeiten noch einige offene Fragen, welche durch weiterführende Studien behandelt und geklärt werden sollten.

Da MT02 im Nierenabszessmodell in der Maus nicht wirksam war, also nicht zur Behandlung einer systemischen Infektion geeignet scheint, könnte man die Substanz in einem weiteren Infektionsmodell auf dessen Wirksamkeit testen. Dies sollte an einer lokalen Infektion wie beispielsweise am Muskelabszessmodell durchgeführt werden, da MT02 bei der Behandlung einer lokal begrenzten Infektion durchaus wirksam sein könnte. In diesem Zusammenhang wären Daten zur Bioverfügbarkeit von MT02 unbedingt erforderlich. Durch pharmakokinetische und pharmakodynamische Studien müsste festgestellt werden, ob die Substanz nach der intravenösen bzw. intraperitonealen Verabreichung im lebenden System zur Verfügung steht und überhaupt zu den Infektionsherden transportiert wird. Vor allem nach der intravenösen Applikation der Substanz könnte MT02 beim Passieren der Leber oder der Nieren abgebaut bzw. aus dem Blutkreislauf gefiltert und ausgeschieden werden. Des Weiteren sollte die Ursache des deutlichen Unterschieds zwischen den MHK-Werten gegen Bakterien und den Zytotoxizitätswerten gegen eukaryotische Zellen genauer untersucht werden. Um mögliche Unterschiede in der Gesamtmenge an in die Zellen aufgenommenem MT02 aufzuklären wäre eine radioaktive Markierung von MT02 denkbar. Nach Inkubation von Bakterien und Zellen mit der markierten Substanz könnte im Anschluss die tatsächliche intrazelluläre Menge von MT02 gemessen werden. Diese Methode könnte auch weitere Aufschlüsse über den Resistenzmechanismus gegen, falls die MT02-resistente Mutante Efflux-Systeme benutzt um die intrazelluläre Konzentration an MT02 zu verringern. Zudem sollte bezüglich der Resistenzentwicklung von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> der Theorie nachgegangen werden, ob eine Veränderung in der Zusammensetzung der Zellwand der resistenten Mutante einen Beitrag zur Resistenz liefert. Dazu könnte man den Anteil an in der Zellwand eingelagerten Teichonsäuren von *S. aureus* HG001 mit dem von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> vergleichen. Eine Verringerung des

Teichonsäuregehalts in der Mutante würde für die Beteiligung der Teichonsäuren und somit der Zellwand am Wirkungsmechanismus von MT02 sprechen. In diesem Zusammenhang könnten MHK-Untersuchungen an *S. aureus*-Mutanten mit defekter Teichonsäuresynthese weiteren Aufschluss geben. Um die Möglichkeit einer genetischen Manifestation der MT02-Resistenz zu überprüfen, könnte das Genom von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> sequenziert und mit dem des Stamms HG001 verglichen werden.

Des Weiteren sollte die Natur des roten Farbstoffes geklärt werden, welcher bei Wachstum von MT02-resistenten Mutanten bei Anwesenheit hoher Konzentrationen an MT02 produziert wird. Dazu wäre es sinnvoll, zunächst die Struktur des Produktes der Umsetzung von MT02 in basischem Aceton aufzuklären, welches farblich dem Produkt der resistenten Bakterien sehr ähnlich ist. Dies könnte mittels NMR-Analysen durchgeführt werden. Anschließend könnte der rote Farbstoff aus den resistenten Kulturen isoliert bzw. extrahiert und aufgereinigt sowie ebenfalls mittels NMR analysiert werden. Ein Vergleich der erhaltenen Spektren würde zeigen, ob es sich bei dem Umsetzungsprodukt von MT02 in Aceton und dem durch *S. aureus* HG001<sup>R</sup> produzierten roten Farbstoffs um identische Moleküle handelt. Eine sich anschließende Frage wäre, wie die resistenten Bakterien MT02 umsetzen und damit unschädlich machen können. Eine Möglichkeit dies aufzuklären wäre, mittels Transposonmutagenese eine Mutanten-Bibliothek des resistenten Stamms HG001<sup>R</sup> herzustellen. Diese könnte auf Insertionsmutanten gescreent werden, welche nicht mehr in der Lage sind in Anwesenheit hoher Konzentrationen von MT02 zu wachsen bzw. roten Farbstoff zu produzieren. Durch Sequenzierung kann dann bestimmt werden, welche Gene durch die Insertion verändert wurden. Die zugehörigen Proteine sind folglich an der Umsetzung von MT02 und somit am Resistenzmechanismus gegen diese Substanz beteiligt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abraham E. P. et al.** 1992. Further observations on penicillin. 1941. Eur J Clin Pharmacol. **42**(1):3-9.
- Aldridge K. E. & Ashcraft D. S.** 1997. Comparison of the in vitro activities of Bay 12-8039, a new quinolone, and other antimicrobials against clinically important anaerobes. Antimicrob Agents Chemother. **41**(3):709-11
- Aubry-Damon H. et al.** 1998. Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confers rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **42**(10):2590-94
- Awada A. et al.** 2003. An EORTC-ECSG phase I study of LU 79553 administered every 21 or 42 days in patients with solid tumors. European Journal of Cancer. **39**:742-7
- Baba T. et al.** 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet. **359**:1819-27
- Bailly C. et al.** 1996. Sequence-selective intercalation of antitumor bis-naphthalimides into DNA. Eur J Biochem. **240**:195-208
- Bandow J. et al.** 2003. Proteomic approach to understanding antibiotic action. Antimicrob Agents Chemother. **47**:948-55
- Biedenbach D. J. et al.** 2010. Stability of linezolid activity in an era of mobile oxazolidinone resistance determinants: results from the 2009 Zyvox® annual appraisal of potency and spectrum program. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. **68**:459-67
- Bondi D. Jr & Dietz C. C.** 1946. The susceptibility of penicillinase-producing bacteria to penicillin. J Bacteriol. **51**:581
- Bousquet P. F. et al.** 1995. Preclinical evaluation of LU 79553: A novel bis-naphthalimide with potent antitumor activity. Cancer Research. **55**:1176-80
- Brakstad O. G. et al.** 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. J Clin Microbiol. **30**(7):1654-60
- Brazas M. D. & Hancock R. E. W.** 2005. Using microarray gene signatures to elucidate mechanisms of antibiotic action and resistance. Drug Discovery Today. **10**(18):1245-52
- Bringman G. et al.** 2008. Antitumoral and antileishmanial dioncoquinones and ancistroquinones from cell cultures of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and *Ancistrocladus abbreviatus* (Ancistrocladaceae). Phytochemistry. **69**:2501-9
- Brown G. M.** 1962. The biosynthesis of folic acid. J Bio Chem. **237**:536-40
- Bugg T. D. H. et al.** 1991. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: Biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. Biochemistry. **30**:10408-15
- Bush K.** 2004. Antibacterial drug discovery in the 21st century. Clin Microbiol Infect. **10**(Suppl. 4):10-7

- Caffrey A. R. et al.** 2010. Comparative effectiveness of linezolid and vancomycin among a national cohort of patients infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **54**(10):4394-400
- Chambers H. F.** 1997. Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. **10**(4):781-91
- Cirz R. T. et al.** 2006. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. J Bacteriol. **188**(20):7101-10
- Cirz R. T. et al.** 2007. Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin. J Bacteriol. **189**(2):531-9
- Clemett D. & Markham A.** 2000. Linezolid. Drugs. **59**(4):815-27
- David M. Z. & Daum R. S.** 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev. **23**(3):616-87
- Davis A. et al.** 1958. Resistant Staphylococcal puerperal septicaemia susceptible to vancomycin. British Medical Journal. **6**:1394
- Davis B.** 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. Microbiol Rev. **51**(3):341-50
- Davis B.** 1988. The lethal action of aminoglycosides. J Antimicrob Chemother. **22**:1-3
- del Ponzo et al.** 2009a. Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. **53**(1):35-40
- del Ponzo et al.** 2009b. The electricidal effect: Reduction of *Staphylococcus* and *Pseudomonas* biofilms by prolonged exposure to low-intensity electricidal current. Antimicrob Agents Chemother. **53**(1):41-5
- Díaz-Rubio E. et al.** 1994. Phase I study of mitonafide with a 3-day administration schedule: Early interruption due to severe central nervous system toxicity. Investigational New Drugs. **12**:277-81
- Diep B. A. et al.** 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. **367**:731-9
- DiMasi J. A. et al.** 2003. The price of innovation: new estimates of drug development costs. J Health Econ. **22**:151-85
- Doyle M. et al.** 2009. Response of *Staphylococcus aureus* to subinhibitory concentrations of a sequence-selective, DNA minor groove cross-linking pyrrolobenzodiazepine dimer. J Antimicrob Chemother. **64**(5):949-59
- Dryden M. S.** 2010. Complicated skin and soft tissue infection. J Antimicrob Chemother. **65**(Suppl. 3):iii35-44
- Ehrlich P.** 1913. Address in pathology, ON CHEMOTHERAPY: Delivered before the seventeenth international congress of medicine. Br Med J. **2**(2746):353-9

- Epstein I. G. et al.** 1956. The treatment of human pulmonary tuberculosis with cycloserine: Progress report. Dis Chest. **29**(3):241-57
- Fleming A.** 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Br J Exp Pathol. **10**:226-36
- Florey H. W. et al.** 1946. Mycophenolic acid; an antibiotic from *Penicillium brevicompactum* Dierckx. Lancet. **1**(6385):46-9
- Freiberg C. & Brötz-Oesterhelt H.** 2005. Functional genomics in antibacterial drug discovery. Drug Discovery Today. **10**(13):927-35
- Giesbrecht P. et al.** 1998. Staphylococcal cell wall: Morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. Microbiol Mol Biol Rev. **62**(4):1371-414
- Gill S. R. et al.** 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. J Bacteriol. **187**(7):2426-38
- Goerke C. et al.** 2006. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **50**(1):171-7
- Goldman R. A. et al.** 1983. Photoincorporation of tetracycline into *Escherichia coli* ribosomes. Identification of the major proteins photolabeled by native tetracycline and tetracycline photoproducts and implications for the inhibitory action of tetracycline on protein synthesis. Biochemistry. **22**(2):359-68
- González-Bulnes L. & Gallego J.** 2009. Indirect effects modulating the interaction between DNA and a cytotoxic bisnaphthalimide reveal a two-step binding process. J Am Chem Soc. **131**(22):7781-91
- Gray C. P. & Keck W.** 1999. Bacterial targets and antibiotics: Genome-based drug discovery. Cell Mol Life Sci. **56**(9-10):779-87
- Holden M. T. G. et al.** 2004. Complete genome of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proc Natl Acad Sci U S A. **101**(26):9786-91
- Hughes A. H. et al.** 1973. The function of teichoic acids in cation control in bacterial membranes. Biochem J. **132**(1):83-93
- Izaki K. et al.** 1966. Glycopeptide transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: Penicillin-sensitive enzymatic reactions. Proc Natl Acad Sci U S A. **55**(3):656-63
- Jacoby G. A.** 2005. Mechanism of resistance to quinolones. Clin Infect Dis. **41**(Suppl 2):120-6
- Jones T. et al.** 2008. Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding. Antimicrob Agents Chemother. **52**(1):369-78
- Kaatz G. W. et al.** 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **37**(5):1086-94

- Kahan F. M. et al.** 1974. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). Ann N Y Acad Sci. **235**(0):364-86
- Kiran M. D. et al.** 2009. OpuC - an ABC transporter that is associated with *Staphylococcus aureus* pathogenesis. Int J Artif Organs. **32**(9):600-10
- Kirby C. P.** 1984. Treatment of simple urinary tract infections in general practice with a 3-day course of norfloxacin. J Antimicrob Chemother. **13**(Suppl B):107-12
- Kohanski M. A. et al.** 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell. **130**:797-810
- Kokain-Kun J. F. et al.** 2007. Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model. . J Antimicrob Chemother. **60**:1051-9
- Kuroda M. et al.** 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. **357**:1225-40
- Lacey R. W.** 1975. Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. Bacteriol Rev. **39**(1):1-32
- Lai Y. et al.** 2007. The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. Mol Microbiol. **63**(2):497-506
- Lauderdale K. J. et al.** 2010. Biofilm dispersal of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. J Orthop Res. **28**(1):55-61
- Ledala N. et al.** 2006. Effects of oxacillin and tetracyclin on autolysis, autolysin processing and *atl* transcription in *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents. **27**(6):518-24
- Lorenz U. et al.** 2011. Functional antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy. Antimicrob Agents Chemother. **55**(1):165-73
- Lowy F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. **339**(8):520-32
- Mani N. et al.** 1993. Isolation and characterization of autolysis-defective mutants of *Staphylococcus aureus* created by Tn917-*lacZ* mutagenesis. J Bacteriol. **175**(5):1493-9
- Manna A. C. et al.** 2004. Identification of *sarV* (SA2062), an new transcriptional regulator, is repressed by SarA and MgrA (SA0641) and involved in the regulation of autolysis in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **186**(16):5267-80
- McCallum N. et al.** 2010. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol. **300**(2-3):118-29
- Montgomery D. W.** 1911. A few notes on the new remedy for syphilis, "Ehrlich, 606". Cal State J Med. **9**(1):8-9
- Morris M.** 1912. A case of late syphilitic glossitis treated by salvarsan (Ehrlich-Hata). Br Med J. **1**(2674):712-712.1

- Muth M. et al.** 2007. Antitrypanosomal activity of quaternary naphthalimide derivatives. Bioorg Med Chem Lett. **17**(6):1590-3
- Muthaiyan A. et al.** 2008. Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization. Antimicrob Agents Chemother. **52**(3):980-90
- Nakaminami H. et al.** 2010. Fluoroquinolone efflux by the plasmid-mediated multidrug efflux pump QacB variant QacBIII in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **54**(10):4107-11
- Neuhaus F. C. & Baddiley J.** 2003. A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. **67**(4):686-723
- Nickel J. et al.** 2005. A single residue of GDF-5 defines binding specificity to BMP receptor IB. J Mol Biol. **349**(5):933-47
- Ohlsen K.** 2009. Novel antibiotics for the treatment of *Staphylococcus aureus*. Expert Rev Clin Pharmacol. **2**(6):661-72
- Onishi H. R. et al.** 1996. Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. Science. **264**(5289):980-2
- Pappas G. et al.** 2009. Trimethoprim-sulfamethoxazole for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A forgotten alternative?. J Chemother. **21**(2):115-26
- Park J. T. & Strominger J. L.** 1957. Mode of action of penicillin. Science. **125**(3238):99-101
- Pelz A. et al.** 2005. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. **280**(37):32493-8
- Perkins H. R.** 1969. Specificity of combination between mucopeptide precursors and vancomycin or ristocetin. Biochem J. **111**(2):195-205
- Pietiäinen M. et al.** 2009. Transcriptome analysis of the responses of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial peptides and characterization of the roles of vraDE and vraSR in antimicrobial resistance. BMC Genomics. **10**:429
- Pitz A. M. et al.** 2011. Vancomycin susceptibility trends and prevalence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in clinical methicillin-resistant *S. aureus* isolates. J Clin Microbiol. **49**(1):269-74
- Plummer N. & Ensworth H.** 1939. Preliminary report of the use of sulfapyridine in the treatment of pneumonia. Bull N Y Acad Med. **15**(4):241-8
- Ponte-Sucre A. et al.** 2006. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. Antimicrob Agents Chemother. **50**(7):2439-47
- Projan S. J. & Shlaes D. M.** 2004. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here?. Clin Microbiol Infect. **10**(Suppl. 4):18-22
- Projan S. J. & Bradford P. A.** 2007. Late stage antibacterial drugs in the clinical pipeline. Curr Opin Microbiol. **10**(5):441-6

- Raafat D. et al.** 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. Appl Environ Microbiol. **74**(12):3764-73
- Rahman O. et al.** 2009. Lipoteichoic acid biosynthesis: two steps forwards, one step sideways?. Trends Microbiol. **17**(6):219-25
- Reinicke B. et al.** 1983. Reduced degradability by lysozyme of staphylococcal cell walls after chloramphenicol treatment. Arch Microbiol. **135**:120-4
- Robertson G. T. et al.** 2008. In vitro evaluation of CBR-2092, a novel rifamycin-quinolone hybrid antibiotic: Studies of the mode of action in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **52**(7):2313-23
- Rosenbach A. J.** 1884. Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden, J. F. Bergmann. Seite 18
- Rossolini G. M. et al.** 2010. Epidemiology and clinical relevance of microbial resistance determinants versus anti-Gram-positive agents. Curr Opin Microbiol. **13**:582-8
- Sass P. et al.** 2008. The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol. **8**:186
- Sieradzki K. & Tomasz A.** 2006. Inhibition of the autolytic system by vancomycin causes mimicry of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*-type resistance, cell concentration dependence of the MIC, and antibiotic tolerance in vancomycin-susceptible *S. aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **50**(2):527-33
- Silver L. L.** 2011. Challenges of antibacterial discovery. Clin Microbiol Rev. **24**(1):71-109
- Silverman J. A. et al.** 2003. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **47**(8):2538-44
- Singh B. K. & Macdonald C. A.** 2010. Drug discovery from uncultivable microorganisms. Drug Discov Today. **15**(17-18):792-9
- Speer B. S. et al.** 1992. Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, transfer, and clinical significance. Clin Microbiol Rev. **5**(4):387-99
- Spížek J. et al.** 2010. Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds. J Ind Microbiol Biotechnol. **37**:1241-8
- Stein R. A. et al.** 2009. Ceftobiprole: A new beta-lactam antibiotic. Int J Clin Pract. **63**(6):930-43
- Tabares P. et al.** 2011. Anti-protease and immunomodulatory activities of bacteria associated with caribbean sponges. Mar Biotechnol (NY). *in press*
- Tischer M. et al.** 2010. The bisnaphthalimides as new active lead compounds against *Plasmodium falciparum*. Bioorg Med Chem. **18**(9):2998-3003
- Trotonda M. P. et al.** 2009. Role of *mgrA* and *sarA* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* autolysis and resistance to cell wall-active antibiotics. J Infect Dis. **199**(2):209-18

- Tsubakishita S. et al.** 2010. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. **54**(10):4352-9
- Villalona-Calero M. A. et al.** 2001. Phase I and pharmacokinetic study of LU79553, a DNA intercalating bisnaphthalimide, in patients with solid malignancies. J Clin Oncol. **19**(3):857-69
- Waksman S. A. et al.** 2010. Production of antibiotic substances by actinomycetes. Ann N Y Acad Sci. **1213**:112-24
- Waring M. J. et al.** 1979. Intercalative binding to DNA of antitumour drugs derived from 3-nitro-1,8-naphthalic acid. Nucleic Acids Res. **7**(1):217-30
- White R. J. et al.** 1971. Mechanism of action of rifampin on *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol. **108**(2):737-41
- Witte W.** 2004. Glycopeptide resistant *Staphylococcus*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. **51**(8-9):370-3
- Wolfson J. S. & Hooper D. C.** 1989. Fluoroquinolone antimicrobial agents. . Clin Microbiol Rev. **2**(4):378-424
- Yamada S. et al.** 2001. Suppressed localization of a major autolysin on *Staphylococcus aureus* treated with tetracycline. J Electron Microsc (Tokyo). **50**(4):359-64
- Yang S.-J. et al.** 2010. Cell wall thickening is not a universal accompaniment of the daptomycin nonsusceptibility phenotype in *Staphylococcus aureus*: Evidence for multiple resistance mechanisms. Antimicrob Agents Chemother. **54**(8):3079-85
- Yoshida R. et al.** 2003. Physiological and molecular analysis of a *mecA*-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance. J Antimicrob Chemother. **51**(2):247-55
- Zander J. et al.** 2010. Synergistic antimicrobial activities of folic acid antagonists and nucleoside analogs. Antimicrob Agents Chemother. **54**(3):1226-31
- Zeiler H.-J. & Grohe K.** 1984. The in vitro and in vivo activity of ciprofloxacin. Eur J Clin Microbiol. **3**(4):339-43
- Zhang K. et al.** 2009. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **53**(2):531-40
- Zygmunt D. J. et al.** 1992. Characterization of four beta-lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **36**(2):440-5



## 7. Anhang

### 7.1 Datensätze der Microarray-Analysen

**Tabelle A1:** Deregulierte Gene von *S. aureus* HG001 nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK MT02

ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung
SACOL0001	<i>dnaA</i>	Chromosomales Replikations-Initiations-Protein	2,656
SACOL0001	<i>dnaA</i>	Chromosomales Replikations-Initiations-Protein	2,377
SACOL0002	<i>dnaN</i>	DNA Polymerase III Untereinheit beta	2,444
SACOL0003		Hypothetisches Protein	2,75
SACOL0004	<i>recF</i>	Rekombinations-Protein F	2,69
SACOL0004	<i>recF</i>	Rekombinations-Protein F	2,511
SACOL0005	<i>gyrB</i>	DNA Gyrase Untereinheit B	2,33
SACOL0005	<i>gyrB</i>	DNA Gyrase Untereinheit B	2,155
SACOL0007		Hypothetisches Protein	2,504
SACOL0008	<i>hutH</i>	Histidin-Ammoniak-Lyase	2,054
SACOL0009	<i>serS</i>	Seryl-tRNA Synthetase	2,249
SACOL0009	<i>serS</i>	Seryl-tRNA Synthetase	2,053
SACOL0015	<i>rplI</i>	50S ribosomales Protein L9	2,189
SACOL0023		Hypothetisches Protein	2,649
SACOL0037		Hypothetisches Protein	211,7
SACOL0056		Hypothetisches Protein	2,355
SACOL0057		Hypothetisches Protein	2,256
SACOL0058		Hypothetisches Protein	3,175
SACOL0063		Hypothetisches Protein	2,157
SACOL0068		Hypothetisches Protein	2,248
SACOL0068		Hypothetisches Protein	2,153
SACOL0069		Hypothetisches Protein	2,02
SACOL0070		Hypothetisches Protein	2,071
SACOL0071		Hypothetisches Protein	3,178
SACOL0072		Hypothetisches Protein	2,372
SACOL0072		Hypothetisches Protein	2,203
SACOL0073		Hypothetisches Protein	4,565
SACOL0073		Hypothetisches Protein	4,338
SACOL0074		Hypothetisches Protein	2,529
SACOL0079		Hypothetisches Protein	0,435
SACOL0093	<i>lctP</i>	Hypothetisches Protein	2,045
SACOL0096	<i>sarH1</i>	Hypothetisches Protein	4,367
SACOL0096	<i>sarH1</i>	Hypothetisches Protein	4,335
SACOL0096	<i>sarS</i>	staphylococcal accessory regulator S	4,269
SACOL0100		Hypothetisches Protein	7,87
SACOL0100		Hypothetisches Protein	6,032
SACOL0101		Hypothetisches Protein	4,197

SACOL0102		Hypothetisches Protein	4,391
SACOL0102		Hypothetisches Protein	2,65
SACOL0102		Hypothetisches Protein	2,086
SACOL0103		Hypothetisches Protein	2,155
SACOL0104		Hypothetisches Protein	2,231
SACOL0105		Siderophorbiosynthese-Protein, <i>lucC</i> Familie	2,298
SACOL0108		Hypothetisches Protein	2,28
SACOL0120		Hypothetisches Protein	2,032
SACOL0173		Hypothetisches Protein	2,081
SACOL0190	<i>acpD</i>	Azoreduktase	4,638
SACOL0190	<i>acpD</i>	Azoreduktase	3,504
SACOL0211		Acetyl-CoA Acetyltransferase	0,234
SACOL0212		Hypothetisches Protein	0,203
SACOL0212		Hypothetisches Protein	0,198
SACOL0213		Hypothetisches Protein	0,255
SACOL0214		CoA Ligase für langkettige Fettsäuren, hypothetisch	0,36
SACOL0215		Hypothetisches Protein	0,446
SACOL0215		Hypothetisches Protein	0,421
SACOL0215		Hypothetisches Protein	0,393
SACOL0222	<i>lctE</i>	L-Lactatdehydrogenase	2,522
SACOL0237		Hypothetisches Protein	0,498
SACOL0237		Zink-enthaltende Alkoholdehydrogenase	0,49
SACOL0238		Hypothetisches Protein	0,491
SACOL0270		Hypothetisches Protein	0,436
SACOL0271		Hypothetisches Protein	0,452
SACOL0272		Hypothetisches Protein	0,268
SACOL0274		Hypothetisches Protein	0,258
SACOL0275		Hypothetisches Protein	0,41
SACOL0275		Hypothetisches Protein	0,291
SACOL0277		Hypothetisches Protein	0,329
SACOL0279		Hypothetisches Protein	0,349
SACOL0318	<i>int</i>	Prophage L54a, Integrase	5,008
SACOL0320		Hypothetisches Protein	2,654
SACOL0321		Prophage L54a, Repressorprotein, hypothetisch	4,266
SACOL0321		Prophage L54a, Repressorprotein, hypothetisch	2,64
SACOL0323		Hypothetisches Protein	21,65
SACOL0324		Hypothetisches Protein	161,7
SACOL0325		Prophage L54a, Antirepressor, hypothetisch	48,05
SACOL0326		Hypothetisches Protein	36,65
SACOL0326		Hypothetisches Protein	36,48
SACOL0327		Hypothetisches Protein	7,73
SACOL0333		Hypothetisches Protein	7,497
SACOL0334		Hypothetisches Protein	12,17
SACOL0335		Hypothetisches Protein	32,51
SACOL0335		Hypothetisches Protein	26,55
SACOL0336		Hypothetisches Protein	30,53
SACOL0336		Hypothetisches Protein	27,02

SACOL0337		Hypothetisches Protein	11,53
SACOL0340		Hypothetisches Protein	19,56
SACOL0341		Hypothetisches Protein	25,34
SACOL0342		Hypothetisches Protein	15,06
SACOL0343		Prophage L54a, replikative DNA Helikase, hypothetisch	21,63
SACOL0344		Hypothetisches Protein	12,72
SACOL0345		Hypothetisches Protein	18,14
SACOL0347		Hypothetisches Protein	15,64
SACOL0348		Hypothetisches Protein	12,03
SACOL0351		Hypothetisches Protein	11,66
SACOL0356		Hypothetisches Protein	9,777
SACOL0357	<i>dut</i>	Prophage L54a, Deoxyuridin-5'-Triphosphat- Nukleotidhydrolase	7,313
SACOL0358		Hypothetisches Protein	6,669
SACOL0358		Hypothetisches Protein	6,431
SACOL0361		Hypothetisches Protein	5,333
SACOL0369		Prophage L54a, Clp Protease, hypothetisch	4,289
SACOL0402		Hypothetisches Protein	2,117
SACOL0436		Hypothetisches Protein	24,31
SACOL0436		Hypothetisches Protein	18,02
SACOL0455		Hypothetisches Protein	2,006
SACOL0455		Hypothetisches Protein	2,282
SACOL0480		Hypothetisches Protein	0,454
SACOL0487		Hypothetisches Protein	0,452
SACOL0488		Hypothetisches Protein	0,487
SACOL0489		Hypothetisches Protein	0,461
SACOL0489		Hypothetisches Protein	0,459
SACOL0502	<i>cysM</i>	Hypothetisches Protein	0,302
SACOL0503	<i>metB</i>	Cystathionin gamma-Synthase	0,484
		Serin-Asparagin-reiches Fibrinogen-bindendes, Knochen-	
SACOL0609	<i>sdrD</i>	Sialoprotein-bindendes Protein	0,156
SACOL0625		Hypothetisches Protein	2,05
SACOL0640		Hypothetisches Protein	2,216
SACOL0641		Hypothetisches Protein	2,451
SACOL0641		Hypothetisches Protein	2,346
SACOL0682		Monovalenter Kation/H+ Antiporter Untereinheit D, hypothetisch	0,452
SACOL0684		Monovalenter Kation/H+ Antiporter Untereinheit E, hypothetisch	0,46
SACOL0768		Hypothetisches Protein	0,311
SACOL0791	<i>nrdI</i>	Ribonukleotidreduktase stimulierendes Protein	5,898
SACOL0792	<i>nrdE</i>	Ribonukleotiddiphosphat-Reduktase Untereinheit alpha	5,882
SACOL0792	<i>nrdE</i>	Ribonukleotiddiphosphat-Reduktase Untereinheit alpha	5,485
SACOL0792	<i>nrdE</i>	Ribonukleotiddiphosphat-Reduktase Untereinheit alpha	5,154
SACOL0793	<i>nrdF</i>	Ribonukleotiddiphosphat-Reduktase Untereinheit beta	5,025
SACOL0793	<i>nrdF</i>	Ribonukleotiddiphosphat-Reduktase Untereinheit beta	4,576
SACOL0823	<i>uvrB</i>	Excinuklease ABC Untereinheit B	4,515
SACOL0823	<i>uvrB</i>	Excinuklease ABC Untereinheit B	4,325
SACOL0823	<i>uvrB</i>	Excinuklease ABC Untereinheit B	4,26
SACOL0824	<i>uvrA</i>	Excinuklease ABC Untereinheit A	4,152

SACOL0824	<i>uvrA</i>	Excinuklease ABC Untereinheit A	3,184
SACOL0849		Hypothetisches Protein	0,36
SACOL0851		Hypothetisches Protein	0,364
SACOL0991	<i>oppB</i>	Oligopeptidtransportsystem Permease Protein	0,301
SACOL0992		Hypothetisches Protein	0,348
SACOL0992		Hypothetisches Protein	0,332
SACOL0993	<i>oppD</i>	Hypothetisches Protein	0,272
SACOL0993	<i>oppD</i>	Hypothetisches Protein	0,26
SACOL0994	<i>oppF</i>	Hypothetisches Protein	0,328
SACOL0994	<i>oppF</i>	Hypothetisches Protein	0,323
SACOL0995		Hypothetisches Protein	0,326
SACOL1041		Hypothetisches Protein	0,381
SACOL1041		Hypothetisches Protein	0,294
SACOL1042		Hypothetisches Protein	0,477
SACOL1043		Glycosyltransferase, Protein der Gruppe 1 Familie	0,487
SACOL1043		Glycosyltransferase, Protein der Gruppe 1 Familie	0,453
SACOL1044		Hypothetisches Protein	0,0317
SACOL1164		Hypothetisches Protein	0,363
SACOL1165		Hypothetisches Protein	0,382
SACOL1168		Hypothetisches Protein	0,136
SACOL1169		Hypothetisches Protein	0,186
SACOL1169		Hypothetisches Protein	0,142
SACOL1173		Alpha-Hämolysin Vorstufe	0,411
SACOL1191		Hypothetisches Protein	0,25
SACOL1191		Hypothetisches Protein	0,226
SACOL1192		Hypothetisches Protein	0,247
SACOL1193	<i>ftsL</i>	Zellteilungsprotein	0,33
SACOL1193	<i>ftsL</i>	Zellteilungsprotein	0,328
SACOL1194	<i>pbpA</i>	Penicillin-Bindeprotein 1	0,344
SACOL1194	<i>pbpA</i>	Penicillin-Bindeprotein 1	0,292
SACOL1195	<i>mraY</i>	Phospho-N-Muraminsäurepentapeptid Translocase	0,358
SACOL1196	<i>murD</i>	UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamat Synthetase	0,435
SACOL1196	<i>murD</i>	UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamat Synthetase	0,382
SACOL1304	<i>recA</i>	Rekombinase A	4,798
SACOL1319	<i>glpF</i>	Glycerolaufnahme vermittelndes Protein	0,454
SACOL1320	<i>glpK</i>	Glycerolkinase	0,495
SACOL1331		Hypothetisches Protein	2,629
SACOL1332		Hypothetisches Protein	0,413
SACOL1374	<i>lexA</i>	LexA Repressor	6,857
SACOL1375	<i>SA1175</i>	Hypothetisches Protein	57,47
SACOL1381		Hypothetisches Protein	4,955
SACOL1381		Hypothetisches Protein	4,076
SACOL1382	<i>sbcC</i>	Exonuklease	4,961
SACOL1400		Hypothetisches Protein	25,41
SACOL1400		Hypothetisches Protein	18,05
SACOL1432	<i>dapD</i>	Tetrahydrodipicolinat Acetyltransferase	0,5
SACOL1432	<i>dapD</i>	Tetrahydrodipicolinat Acetyltransferase	0,499

SACOL1661		Hypothetisches Protein	0,449
SACOL1664		Hypothetisches Protein	0,458
SACOL1738		Hypothetisches Protein	0,449
SACOL1738		Hypothetisches Protein	0,438
SACOL1738		Hypothetisches Protein	0,445
SACOL1846		Hypothetisches Protein	0,354
SACOL1846		Hypothetisches Protein	0,295
SACOL1847		Hypothetisches Protein	0,248
SACOL1848		Hypothetisches Protein	0,337
SACOL1849		Hypothetisches Protein	0,402
SACOL1850		Hypothetisches Protein	0,413
SACOL1850		Hypothetisches Protein	0,413
SACOL1935		Hypothetisches Protein	4,249
SACOL1952		Hypothetisches Protein	2,061
SACOL1979		Hypothetisches Protein	0,49
SACOL1986		Hypothetisches Protein	17,21
SACOL1986		Hypothetisches Protein	16,84
SACOL2003	<i>hlb</i>	Verkürztes Beta-Hämolsin	3,749
SACOL2003	<i>hlb</i>	Verkürztes Beta-Hämolsin	3,178
SACOL2023	<i>agrB</i>	accessory gene regulator Protein B	0,375
SACOL2023	<i>agrB</i>	accessory gene regulator Protein B	0,351
SACOL2025	<i>argC2</i>	accessory gene regulator Protein C	0,351
SACOL2026	<i>agrA</i>	accessory gene regulator A	0,334
SACOL2026	<i>agrA</i>	accessory gene regulator A	0,322
SACOL2037		Hypothetisches Protein	0,452
SACOL2089		Hypothetisches Protein	2,185
SACOL2124		Hypothetisches Protein	0,358
SACOL2125	<i>hmrA</i>	Hypothetisches Protein	0,454
SACOL2131	<i>dps</i>	Allgemeines Stressprotein 20U	2,131
SACOL2153		Konserviertes hypothetisches Protein	0,499
SACOL2162		Hypothetisches Protein	3,883
SACOL2176		Hypothetisches Protein	0,37
SACOL2180	<i>lacG</i>	6-Phospho-beta-Galactosidase	0,401
SACOL2180	<i>lacG</i>	6-Phospho-beta-Galactosidase	0,381
SACOL2181	<i>lacE</i>	PTS System, Lactose-spezifischer IIBC Bestandteil	0,376
SACOL2183	<i>lacD</i>	Tagatose 1,6-Diphosphat-Aldolase	0,424
SACOL2186	<i>lacA</i>	Galactose-6-Phosphat-Isomerase Untereinheit	0,485
SACOL2270	<i>modC</i>	Molybdäntransport ATP-bindendes Protein	0,432
SACOL2270	<i>modC</i>	Molybdäntransport ATP-bindendes Protein	0,41
SACOL2271	<i>modB</i>	Mögliche Molybdändtransport Permease	0,487
SACOL2281	<i>ureB</i>	Urease Untereinheit beta	0,244
SACOL2282	<i>ureC</i>	Urease Untereinheit alpha	0,458
SACOL2323	<i>hutI</i>	Imidazoln-Propionase	2,291
SACOL2323	<i>hutI</i>	Imidazoln-Propionase	2,095
SACOL2324	<i>hutU</i>	Urocanat Hydratase	2,028
SACOL2325		Hypothetisches Protein	2,52
SACOL2326	<i>fosB</i>	Fosfomycin Resistenzprotein	2,664

SACOL2326	<i>fosB</i>	Fosfomycin Resistenzprotein	2,358
SACOL2334		Hypothetisches Protein	0,471
SACOL2376	<i>scrA</i>	PTS System, Sucrose-spezifischer IIBC Bestandteil	4,251
SACOL2415		Hypothetisches Protein	2,722
SACOL2418	<i>sbi</i>	IgG-bindendes Protein	0,36
SACOL2430		Hypothetisches Protein	0,461
SACOL2450	<i>opuCD</i>	Möglicher Glycin/Betain/Carnitin/Cholin ABC Transporter	0,438
SACOL2450	<i>opuCD</i>	Möglicher Glycin/Betain/Carnitin/Cholin ABC Transporter	0,386
SACOL2452	<i>opuCB</i>	Möglicher Glycin/Betain/Carnitin/Cholin ABC Transporter	0,251
SACOL2452	<i>opuCB</i>	Möglicher Glycin/Betain/Carnitin/Cholin ABC Transporter	0,145
SACOL2453	<i>opuCA</i>	Glycin/Betain/Carnitin/Cholin ABC Transporter	0,21
SACOL2458		Hypothetisches Protein	0,365
SACOL2458		Hypothetisches Protein	0,299
SACOL2475		Peptid ABC Transporter, Permease, hypothetisch	0,34
SACOL2507	<i>sarH2</i>	Hypothetisches Protein	2,359
SACOL2515	<i>gntK</i>	Gluconokinase	2,164
SACOL2516	<i>gntR</i>	Transkriptionsrepressor des Gluconat-Operons	2,503
SACOL2517		Hypothetisches Protein	2,601
SACOL2517		Transkriptionsregulator, MerR Familie	2,489
SACOL2518		Hypothetisches Protein	2,665
SACOL2518		Hypothetisches Protein	2,617
SACOL2518		Hypothetisches Protein	2,455
SACOL2525		ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	4,27
SACOL2536		Hypothetisches Protein	3,929
SACOL2536		Hypothetisches Protein	3,829
SACOL2547		Hypothetisches Protein	2,917
SACOL2547		Hypothetisches Protein	2,309
SACOL2587		Hypothetisches Protein	2,117
SACOL2590		Hypothetisches Protein	3,758
SACOL2590		Protein der Glyoxalase Familie	3,949
SACOL2591		Hypothetisches Protein	3,601
SACOL2592		Hypothetisches Protein	3,996
SACOL2593		Hypothetisches Protein	5,287
SACOL2593		Hypothetisches Protein	4,171
SACOL2594		Hypothetisches Protein	3,187
SACOL2596		Hypothetisches Protein	2,236
SACOL2597		Hypothetisches Protein	2,28
SACOL2597		Hypothetisches Protein	2,153
SACOL2605		Hypothetisches Protein	2,026
SACOL2606		Dihydroorotat-Dehydrogenase 2	2,52
SACOL2606		Dihydroorotat-Dehydrogenase 2	2,372
SACOL2612		Hydrolase, CocE/NonD Familie	2,052
SACOL2616		2-Dehydropantoat-Reduktase	2,21
SACOL2617		Hypothetisches Protein	2,271
SACOL2620		4-Aminobutyrat Aminotransferase	2,23
SACOL2621		Hypothetisches Protein	2,047
SACOL2622		Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase	2,524

SACOL2622		Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase	2,517
SACOL2622		Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase	2,277
SACOL2623	<i>mgo2</i>	Malat:Quinon Oxidoreduktase	2,128
SACOL2625		Hypothetisches Protein	3,534
SACOL2626		Hypothetisches Protein	2,891
SACOL2638		Precorrin-2 Dehydrogenase	2,06
SACOL2639		Sulfitreduktase Flavoprotein (NADPH)	2,623
SACOL2650		Hypothetisches Protein	2,549
SACOL2651		Hypothetisches Protein	2,459
SACOL2651		Tributyryl-esterase EstA, hypothetisch	2,29
SACOL2664	<i>pmi</i>	Mannose-6-Phosphat Isomerase	2,001
SACOL2666		N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase	3,189
SACOL2667		Hypothetisches Protein	2,648
SACOL2668		Hypothetisches Protein	3,08
SACOL2668		Hypothetisches Protein	2,796
SACOL2678		Hypothetisches Protein	5,039
SACOL2678		Hypothetisches Protein	3,903
SACOL2681		Hypothetisches Protein	2,48
SACOL2682		Hypothetisches Protein	2,319
SACOL2684		Hypothetisches Protein	2,109
SACOL2688	<i>icaR</i>	Transkriptionsregulator des ica Operons	3,108
SACOL2688	<i>icaR</i>	Transkriptionsregulator des ica Operons	3,081
SACOL2688	<i>icaR</i>	Transkriptionsregulator des ica Operons	2,708
SACOL2691	<i>icaB</i>	Interzelluläres Adhäsionsprotein B	3,254
SACOL2700	<i>hisB</i>	Imidazolglycerolphosphat Dehydratase	2,429
SACOL2706		Hypothetisches Protein	2,08
SACOL2707		Hypothetisches Protein	2,035
SACOL2712	<i>drp35</i>		2,678
SACOL2712	<i>drp35</i>		2,424
SACOL2713		Hypothetisches Protein	2,533
SACOL2714	<i>pcp</i>	Pyrrolidoncarboxylat Peptidase	4,345
SACOL2717		Hypothetisches Protein	2,159
SACOL2727		Integrase/Rekombinase	2,068
SACOL2728		Hypothetisches Protein	2,369
SACOL2731	<i>cspB</i>	Kälteschockprotein	2,739
SACOL2733		Hypothetisches Protein	2,081
SACOL2735		Hypothetisches Protein	2,396

**Tabelle A2:** Deregulierte Gene von *S. aureus* HG001 nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK MT109

ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung
SACOL0001	<i>dnaA</i>	Chromosomales Replikationsinitiationsprotein	2,92
SACOL0003		Hypothetisches Protein	14,81
SACOL0004	<i>recF</i>	Rekombinationsprotein F	14,03
SACOL0005	<i>gyrB</i>	DNA Gyrase Untereinheit B	17,51
SACOL0006	<i>gyrA</i>	DNA Gyrase Untereinheit A	16,60
SACOL0009	<i>serS</i>	Seryl-tRNA Synthetase	0,16
SACOL0012		Hypothetisches Protein	19,01
SACOL0013		Hypothetisches Protein	7,73
SACOL0014		Hypothetisches Protein	7,46
SACOL0018	<i>purA</i>	Adenylosuccinat Synthase	4,05
SACOL0019	<i>vicR</i>	Response Regulator	6,79
SACOL0021	<i>yycH</i>		6,53
SACOL0022		Hypothetisches Protein	6,08
SACOL0065		Hypothetisches Protein	53,31
SACOL0085		Hypothetisches Protein	4,41
SACOL0093	<i>lctP</i>	Hypothetisches Protein	0,29
SACOL0096	<i>sarH1</i>	Hypothetisches Protein	0,12
SACOL0096	<i>sarS</i>	Staphylococcal Accessory Regulator S	0,13
SACOL0115		Hypothetisches Protein	43,44
SACOL0118	<i>sodM</i>	Superoxid Dismutase	3,97
SACOL0130		Hypothetisches Protein	3,35
SACOL0153		Hypothetisches Protein	0,23
SACOL0154	<i>aldA</i>	Hypothetisches Protein	0,15
SACOL0167		Hypothetisches Protein	3,37
SACOL0171		Hypothetisches Protein	0,28
SACOL0177	<i>murQ</i>	N-Acetylmuraminsäure-6-Phosphat Etherase	0,10
SACOL0180	<i>hsdR</i>	wahrscheinlich Typ I Restriktionsenzym	0,21
SACOL0217		Hypothetisches Protein	9,13
SACOL0233		Sorbitol Dehydrogenase	3,19
SACOL0240	<i>ispD</i>	2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphat Cytidyltransferase	0,29
SACOL0272		Hypothetisches Protein	0,15
SACOL0276		Hypothetisches Protein	5,91
SACOL0303		Hypothetisches Protein	0,06
SACOL0311		Hypothetisches Protein	0,02
SACOL0312	<i>nanA</i>	N-Acetylneuraminat Lyase	0,02
SACOL0317	<i>geh</i>	Glycerol ester Hydrolase	0,13
SACOL0421		Hypothetisches Protein	3,74
SACOL0422		Hypothetisches Protein	2,37
SACOL0456		Hypothetisches Protein	2,64
SACOL0464		wahrscheinlich Transposase	18,64
SACOL0499		Hypothetisches Protein	2,40
SACOL0515	<i>gltD</i>	Glutamat Synthase Untereinheit beta	5,93

SACOL0528		DNA Replikationsinitiationskontrollprotein YabA	6,04
SACOL0529		Hypothetisches Protein	4,63
SACOL0530		Hypothetisches Protein	3,53
SACOL0531		Hypothetisches Protein	3,85
SACOL0538	<i>ipk</i>	4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol Kinase	3,16
SACOL0563		Hypothetisches Protein	0,08
SACOL0567	<i>ctsR</i>	Hypothetisches Protein	18,53
SACOL0569		ATP:Guanido Phosphotransferase	18,56
SACOL0581	<i>secE</i>	Präprotein Translokase Untereinheit SecE	0,40
SACOL0587		Hypothetisches Protein	9,81
SACOL0615		Hypothetisches Protein	3,72
SACOL0620	<i>proP</i>	Hypothetisches Protein	3,29
SACOL0641		Hypothetisches Protein	24,89
SACOL0679		Möglicher monovalenter Kation/H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit A	3,44
SACOL0682		Möglicher monovalenter Kation/H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit D	5,03
SACOL0686		Möglicher monovalenter Kation/H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit G	4,40
SACOL0690		Hypothetisches Protein	0,13
SACOL0695	<i>tagG</i>	Teichonsäure Translokationspermease Protein	0,32
SACOL0697	<i>tagX</i>	Teichonsäure Biosyntheseprotein X	2,36
SACOL0698	<i>tagD</i>	Teichonsäure Biosyntheseprotein D	3,00
SACOL0705	<i>fhuB</i>	Eisen/Chrom Transportpermease	6,09
SACOL0706	<i>fhuG</i>	Eisen/Chrom Transportpermease	17,15
SACOL0707		Hypothetisches Protein	0,16
SACOL0708		Hypothetisches Protein	0,16
SACOL0709		Hypothetisches Protein	0,16
SACOL0714		Hypothetisches Protein	0,09
SACOL0716		Hypothetisches Protein	4,03
SACOL0717		Hypothetisches Protein	4,18
SACOL0718	<i>vraF</i>	ABC Transporter ATP-bindendes Protein	7,50
SACOL0720	<i>vraG</i>	ABC Transporter Permease	8,91
SACOL0727		Hypothetisches Protein	0,29
SACOL0734		Hypothetisches Protein	2,93
SACOL0743	<i>uppP</i>	Undecaprenyl Pyrophosphat Phosphatase	0,27
SACOL0763		Hypothetisches Protein	4,12
SACOL0764		Hypothetisches Protein	3,48
SACOL0765	<i>saeS</i>	Histidin Protein Kinase	0,17
SACOL0766	<i>saeR</i>	Response Regulator	0,18
SACOL0767		Hypothetisches Protein	0,20
SACOL0789		7-Cyano-7-Deazaguanin Reduktase	0,26
SACOL0805		Hypothetisches Protein	0,43
SACOL0809		Hypothetisches Protein	0,37
SACOL0811		Hypothetisches Protein	12,27
SACOL0813		Hypothetisches Protein	2,70
SACOL0823	<i>uvrB</i>	Excinuklease ABC Untereinheit B	7,30
SACOL0824	<i>uvrA</i>	Excinuklease ABC Untereinheit A	11,00
SACOL0832		Hypothetisches Protein	2,59
SACOL0837	<i>gapR</i>	Regulator des glycolytischen Operons	4,72

SACOL0845		Hypothetisches Protein	4,07
SACOL0846	<i>rnr</i>	Ribonuklease R	3,81
SACOL0847	<i>smpB</i>	SsrA-bindendes Protein	2,96
SACOL0854		Hypothetisches Protein	2,78
SACOL0855		Hypothetisches Protein	3,38
SACOL0856	<i>clfA</i>	Fibrinogen-bindendes Protein A, Clumping Faktor	6,83
SACOL0882		Hypothetisches Protein	3,62
SACOL0884		Hypothetisches Protein	2,84
SACOL0915		Hypothetisches Protein	16,67
SACOL0917		Hypothetisches Protein	19,77
SACOL0924		Hypothetisches Protein	0,15
SACOL0934		Hypothetisches Protein	2,85
SACOL0936	<i>dltB</i>	DltB Membran Protein	4,27
SACOL0937	<i>dltC</i>	D-Alanine--Poly(Phosphoribitol) Ligase Untereinheit 2	4,16
SACOL0945	<i>ampA</i>	Mögliche Cytosol Aminopeptidase	0,41
SACOL0955	<i>mnhA</i>	Möglicher monovalenter Kation/H+ Antiporter Untereinheit A	0,26
SACOL0956		Hypothetisches Protein	0,16
SACOL0964	<i>argG</i>	Argininosuccinat Synthase	35,94
SACOL0970		Hypothetisches Protein	5,68
SACOL0971		Hypothetisches Protein	5,78
SACOL0979	<i>clpB</i>	Hypothetisches Protein	5,11
SACOL0992		Hypothetisches Protein	0,07
SACOL0993	<i>oppD</i>	Hypothetisches Protein	0,17
SACOL1012		Hypothetisches Protein	6,24
SACOL1013		Hypothetisches Protein	4,82
SACOL1017		Hypothetisches Protein	0,27
SACOL1031		Hypothetisches Protein	4,03
SACOL1050		Hypothetisches Protein	3,21
SACOL1052	<i>menD</i>	Menaquinon Biosyntheseprotein	2,86
SACOL1055	<i>sspC</i>	Cystein Protease	15,76
SACOL1057	<i>sspA</i>	Serine Protease; V8 Protease; Glutamyl Endopeptidase	15,55
SACOL1064		Hypothetisches Protein	0,32
SACOL1066	<i>fmtA</i>	FmtA, beteiligt an Autolyse und Methicillinresistenz	0,37
SACOL1088		Hypothetisches Protein	0,25
SACOL1118		Hypothetisches Protein	6,02
SACOL1123	<i>pycA</i>	Pyruvat Carboxylase	4,34
SACOL1142	<i>isdD</i>	Hypothetisches Protein	0,20
SACOL1145	<i>srtB</i>	NPQTN spezifische Sortase B	0,22
SACOL1147		Hypothetisches Protein	0,16
SACOL1153		Hypothetisches Protein	3,38
SACOL1154	<i>mutS2</i>	Rekombinationsprotein und DNA-Strangaustausch Inhibitor	4,57
SACOL1164		Hypothetisches Protein	0,12
SACOL1169		Hypothetisches Protein	0,11
SACOL1175		Hypothetisches Protein	0,23
SACOL1200		Hypothetisches Protein	2,67
SACOL1203		Hypothetisches Protein	3,48
SACOL1221	<i>gmk</i>	Guanylat Kinase	0,24

SACOL1251		Signal Recognition Particle	4,59
SACOL1252		Hypothetisches Protein	3,53
SACOL1260	<i>rbgA</i>	Ribosomale Biogenese GTPase	3,26
SACOL1261	<i>rnhB</i>	RNase HII	3,24
SACOL1264	<i>lytN</i>	Wahrscheinlich Zellwandhydrolase	3,21
SACOL1280	<i>cdsA</i>	Phosphatidat Cytidylyltransferase	3,17
SACOL1282	<i>proS</i>	Prolyl-tRNA Synthetase	2,32
SACOL1284		Hypothetisches Protein	6,27
SACOL1285	<i>nusA</i>	Transkriptionselongationsfaktor NusA	8,31
SACOL1288	<i>infB</i>	Translationsinitiationsfaktor IF-2	13,28
SACOL1315	<i>mutS</i>	DNA mismatch Reparaturprotein	3,00
SACOL1351		Hypothetisches Protein	0,39
SACOL1363	<i>thrC</i>	Threonin Synthase	4,17
SACOL1373		Hypothetisches Protein	0,41
SACOL1382	<i>sbcC</i>	Exonuklease SbcC	4,21
SACOL1393	<i>glcT</i>	Transkriptionsantiterminator	0,12
SACOL1395		Hypothetisches Protein	0,31
SACOL1396	<i>fmtC</i>	Beteiligt an Oxacillin Resistenz	0,33
SACOL1400		Hypothetisches Protein	18,48
SACOL1412		Hypothetisches Protein	0,19
SACOL1421	<i>pstB</i>	Phosphat ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	3,76
SACOL1422		Hypothetisches Protein	3,62
SACOL1441		Hypothetisches Protein	0,43
SACOL1443	<i>braB</i>	Aminosäureträger Protein	3,54
SACOL1444		Hypothetisches Protein	12,69
SACOL1445		Hypothetisches Protein	10,05
SACOL1445		CbbQ/NirQ/NorQ/GpvN Familie Protein	15,13
SACOL1450	<i>arlS</i>	Mögliche Protein-Histidin Kinase ArlS	2,05
SACOL1465		Hypothetisches Protein	10,55
SACOL1466		Hypothetisches Protein	6,52
SACOL1468		Hypothetisches Protein	5,19
SACOL1492	<i>nth</i>	Endonuklease-ähnliches Protein	2,66
SACOL1495	<i>dinG</i>	Wahrscheinliche ATP-abhängige DNA Helicase dinG	0,25
SACOL1510	<i>gerCC</i>	Heptaprenyl Diphosphat Syntase Komponente II	0,24
SACOL1511	<i>ubiE</i>	Ubiquinon/Menaquinon Biosynthese Methyltransferase	0,26
SACOL1523	<i>recQ2</i>	ATP-abhängige DNA Helicase RecQ	4,14
SACOL1524		Hypothetisches Protein	3,82
SACOL1543		Hypothetisches Protein	0,08
SACOL1544		Hypothetisches Protein	0,24
SACOL1546		Hypothetisches Protein	0,04
SACOL1549	<i>zwf</i>	Glucose-6-Phosphat 1-Dehydrogenase	0,10
SACOL1560	<i>bmfBB</i>	Alpha-Ketosäure Dehydrogenase E2	7,60
SACOL1561	<i>bfmBAB</i>	Alpha-Ketosäure Dehydrogenase E1	8,82
SACOL1563		Dihydrolipoamid Dehydrogenase	10,35
SACOL1564	<i>recN</i>	DNA Reparaturprotein	2,86
SACOL1566	<i>ispA</i>	Geranyltranstransferase	2,21
SACOL1567		Hypothetisches Protein	2,33

SACOL1568	<i>xseA</i>	Exodeoxyribonuklease VII große Untereinheit	2,67
SACOL1571	<i>accC</i>	Acetyl-CoA Carboxylase Biotin Carboxylase Untereinheit	8,26
SACOL1572	<i>accB</i>	Acetyl-CoA Carboxylase Biotin Carboxylträger Untereinheit	5,68
SACOL1605		Hypothetisches Protein	0,33
SACOL1607		Hypothetisches Protein	0,17
SACOL1612		Hypothetisches Protein	2,66
SACOL1616		Hypothetisches Protein	11,82
SACOL1617		Hypothetisches Protein	10,70
SACOL1618	<i>sigA</i>	RNA Polymerase Sigmafaktor RpoD	10,69
SACOL1620		Hypothetisches Protein	3,68
SACOL1621		Hypothetisches Protein	3,03
SACOL1635		Hypothetisches Protein	14,45
SACOL1636	<i>dnaJ</i>	DnaJ Protein	25,96
SACOL1638	<i>grpE</i>	GrpE Protein	15,32
SACOL1646	<i>comEA</i>	comE Operon Protein 1-verwandtes Protein	4,89
SACOL1646		Hypothetisches Protein	4,94
SACOL1648		Hypothetisches Protein	2,97
SACOL1649		Hypothetisches Protein	5,28
SACOL1650	<i>nadD</i>	Nicotinat (Nicotinamid) Nukleotid Adenyltransferase	6,08
SACOL1652	<i>aroE</i>	Shikimat Dehydrogenase	6,87
SACOL1653		Hypothetisches Protein	7,73
SACOL1655	<i>pfs</i>	5'-Methylthioadenosin/S-Adenosylhomocystein Nukleosidase	6,15
SACOL1667		Hypothetisches Protein	6,95
SACOL1675		Hypothetisches Protein	2,74
SACOL1676	<i>mnmA</i>	(5-Methylaminomethyl-2-Thiouridylat)-Methyltransferase	9,19
SACOL1690	<i>apt</i>	Adenin Phosphoribosyltransferase	9,07
SACOL1692	<i>secF</i>	Bifunktionales Präprotein Translokase Untereinheit SecD/SecF	2,63
SACOL1704		Hypothetisches Protein	0,24
SACOL1705		Hypothetisches Protein	3,83
SACOL1715	<i>hemB</i>	Delta-Aminolevulininsäure Dehydratase	3,76
SACOL1716	<i>hemD</i>	Uroporphyrinogen III Synthase	3,89
SACOL1737	<i>polA</i>	DNA Polymerase I	2,90
SACOL1738		Hypothetisches Protein	0,20
SACOL1743	<i>aapA</i>	D-Serin/D-Alanin/Glycine Transporter	0,11
SACOL1748		Acetyl-CoA Carboxylase Untereinheit beta	5,16
SACOL1798		Hypothetisches Protein	2,55
SACOL1807		Hypothetisches Protein	0,27
SACOL1810		Hypothetisches Protein	5,52
SACOL1811		Hypothetisches Protein	4,22
SACOL1818	<i>ribA</i>	Riboflavin Biosynthese Protein	21,93
SACOL1819	<i>ribB</i>	Riboflavin Synthase Untereinheit alpha	24,54
SACOL1820	<i>ribD</i>	Riboflavin-spezifische Deaminase	15,78
SACOL1827		Hypothetisches Protein	47,11
SACOL1831		Mögliche Translaldolase	0,18
SACOL1837	<i>metK</i>	S-Adenosylmethionin Synthetase	5,96
SACOL1845		Hypothetisches Protein	9,60
SACOL1846		Hypothetisches Protein	0,18

SACOL1921		Hypothetisches Protein	0,27
SACOL1924		Hypothetisches Protein	11,24
SACOL1936		Hypothetisches Protein	0,39
SACOL1938		Hypothetisches Protein	0,25
SACOL1939		Hypothetisches Protein	0,28
SACOL1941		Hypothetisches Protein	0,30
SACOL1960	<i>gatB</i>	Aspartyl/Glutamyl-tRNA Amidotransferase Untereinheit B	4,80
SACOL1961	<i>gatA</i>	Glutamyl-tRNA <sup>Gln</sup> Amidotransferase Untereinheit A	5,11
SACOL1964		Hypothetisches Protein	4,42
SACOL1966	<i>pcrA</i>	ATP-abhängige DNA Helicase	9,64
SACOL1981		Hypothetisches Protein	0,17
SACOL1984	<i>aldH</i>	Aldehyd Dehydrogenase	3,02
SACOL1991		Hypothetisches Protein	0,28
SACOL2000		Hypothetisches Protein	0,39
SACOL2003	<i>hly</i>	Flankiertes beta-Hämolysin	3,36
SACOL2017	<i>groES</i>	Co-Chaperonin GroES	20,39
SACOL2042	<i>ilvD</i>	Dihydroxysäure Dehydratase	12,79
SACOL2044		Hypothetisches Protein	9,33
SACOL2045	<i>ilvC</i>	Ketolsäure Reduktoisomerase	7,22
SACOL2070	<i>kdpD</i>	Sensorprotein KdpD	0,04
SACOL2071	<i>kdpE</i>	DNA-bindender Response Regulator KdpE	0,03
SACOL2073	<i>murF</i>	UDP-N-Acetylmuramoylalanyl-D-Glutamyl-2, 6-Diaminopimelat-D-Alanyl-D-Alanyl Ligase	6,54
SACOL2074	<i>ddl</i>	D-Alanyl-Alanin Synthetase A	4,88
SACOL2084	<i>thiM</i>	Hydroxyethylthiazol Kinase	5,86
SACOL2085	<i>thiD2</i>	Phosphomethylpyrimidin Kinase	6,65
SACOL2086		Hypothetisches Protein	5,84
SACOL2090	<i>ywpF</i>	ywpF Protein	0,17
SACOL2092	<i>murA</i>	UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase	2,94
SACOL2093		Hypothetisches Protein	2,73
SACOL2115		Hypothetisches Protein	6,35
SACOL2116	<i>murZ</i>	UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase	4,78
SACOL2118		Hypothetisches Protein	0,12
SACOL2125	<i>hmrA</i>	Hypothetisches Protein	2,83
SACOL2132		Hypothetisches Protein	3,45
SACOL2148	<i>mtIA</i>	PTS System, Mannitol spezifische IIA Komponente	3,02
SACOL2157		Hypothetisches Protein	8,88
SACOL2159		Hypothetisches Protein	3,37
SACOL2160		Hypothetisches Protein	2,39
SACOL2161		Hypothetisches Protein	3,46
SACOL2162		Hypothetisches Protein	4,54
SACOL2165		Hypothetisches Protein	7,62
SACOL2166		Hypothetisches Protein	7,07
SACOL2169		Hypothetisches Protein	3,13
SACOL2176		Hypothetisches Protein	5,66
SACOL2212	<i>rplQ</i>	50S ribosomales Protein L17	4,33
SACOL2214	<i>rpsK</i>	30S ribosomales Protein S11	5,16

SACOL2217	<i>infA</i>	Translationsinitiationsfaktor IF-1	5,11
SACOL2218	<i>adk</i>	Adenylatkinase	5,08
SACOL2220	<i>rplO</i>	50S ribosomales Protein L15	4,16
SACOL2223	<i>rplR</i>	50S ribosomales Protein L18	7,37
SACOL2224	<i>rplF</i>	50S ribosomales Protein L6	8,62
SACOL2225	<i>rpsH</i>	30S ribosomales Protein S8	8,38
SACOL2229	<i>rplN</i>	50S ribosomales Protein L14	8,81
SACOL2232	<i>rplP</i>	50S ribosomales Protein L16	9,68
SACOL2234	<i>rplV</i>	50S ribosomales Protein L22	5,87
SACOL2241		Hypothetisches Protein	0,27
SACOL2273	<i>fdhD</i>	Format Dehydrogenase Accessory Protein	5,11
SACOL2277		Hypothetisches Protein	0,19
SACOL2280	<i>ureA</i>	Urease Untereinheit gamma	15,53
SACOL2282	<i>ureC</i>	Urease Untereinheit alpha	14,09
SACOL2295		Hypothetisches Protein	9,80
SACOL2300		Hypothetisches Protein	7,60
SACOL2308		Hypothetisches Protein	0,18
SACOL2333		Hypothetisches Protein	0,45
SACOL2379		Hypothetisches Protein	3,86
SACOL2382	<i>gltT</i>	Proton/Natriumglutamat Symport Protein	3,50
SACOL2407		Hypothetisches Protein	0,09
SACOL2409	<i>fmhA</i>	fmhA Protein	18,60
SACOL2415		Hypothetisches Protein	3,45
SACOL2423		Hypothetisches Protein	7,31
SACOL2424		6-Carboxyhexanoat--CoA Ligase	12,55
SACOL2425		Hypothetisches Protein	19,46
SACOL2426	<i>bioB</i>	Biotin Synthase	17,77
SACOL2428	<i>bioD</i>	Dethiobiotin Synthetase	112,49
SACOL2446		Hypothetisches Protein	9,89
SACOL2456		Hypothetisches Protein	0,40
SACOL2463		Hypothetisches Protein	5,30
SACOL2478		Hypothetisches Protein	6,60
SACOL2484		Hypothetisches Protein	3,91
SACOL2489		Hypothetisches Protein	0,37
SACOL2493		Hypothetisches Protein	6,84
SACOL2498		Hypothetisches Protein	2,69
SACOL2517		Hypothetisches Protein	0,18
SACOL2518		Hypothetisches Protein	0,14
SACOL2533		Hypothetisches Protein	10,29
SACOL2536		Hypothetisches Protein	0,27
SACOL2547		Hypothetisches Protein	8,45
SACOL2557		Hypothetisches Protein	2,09
SACOL2572	<i>copA</i>	Kupfer-transportierende ATPase copA	0,32
SACOL2576	<i>crtN</i>	Squalen Desaturase	3,77
SACOL2577	<i>crtM</i>	Squalen Synthase	4,03
SACOL2578		Hypothetisches Protein	5,40
SACOL2579		Hypothetisches Protein	4,72

SACOL2585		Hypothetisches Protein	7,81
SACOL2590		Hypothetisches Protein	7,90
SACOL2591		Hypothetisches Protein	7,85
SACOL2593		Hypothetisches Protein	2,60
SACOL2598		Hypothetisches Protein	2,60
SACOL2605		Hypothetisches Protein	4,63
SACOL2618		L-Lactat Dehydrogenase	0,13
SACOL2621		Hypothetisches Protein	25,49
SACOL2628	<i>betB</i>	Betalinaldehyd Dehydrogenase	52,37
SACOL2635	<i>nrdD</i>	Anaerobe Ribonukleosidtriphosphat Reduktase	3,38
SACOL2636		Hypothetisches Protein	6,93
SACOL2645		Hypothetisches Protein	0,28
SACOL2646		Hypothetisches Protein	0,32
SACOL2647		Hypothetisches Protein	0,29
SACOL2669		Hypothetisches Protein	6,46
SACOL2670		Hypothetisches Protein	5,63
SACOL2671		Präprotein Translokase Untereinheit SecA	5,91
SACOL2672		Hypothetisches Protein	21,26
SACOL2673		Hypothetisches Protein	27,21
SACOL2674		Hypothetisches Protein	18,92
SACOL2675	<i>secY</i>	Präprotein Translokase Untereinheit SecY	9,20
SACOL2676		Hypothetisches Protein	11,67
SACOL2696	<i>hisI</i>	Histidin Biosynthese bifunktionelles Protein HisIE	6,53
SACOL2697	<i>hisF</i>	Cyclase-ähnliches Protein hisF	7,60
SACOL2698		Hypothetisches Protein	11,29
SACOL2721	<i>nixA</i>	Hochaffinitäts Nickel-Transport Protein	7,14
SACOL2724	<i>vraD</i>	Hypothetisches Protein	3,67
SACOL2736	<i>gidB</i>	Glucose-inhibiertes Teilungsprotein B	3,60
SACOL2737	<i>gidA</i>	tRNA Uridin 5-Carboxymethylaminomethyl Modifikationsenzym GidA	4,42
SACOL2738	<i>trmE</i>	tRNA Modifikations-GTPase TrmE	3,37
	<i>gbsA</i>	Glycin/Betaine Aldehyd Dehydrogenase gbsA	46,86
	<i>orfX</i>	konserviertes Hypothetisches Protein orfX	12,45
		Hypothetisches Protein	3,90
		Hypothetisches Protein	0,18
		Succinyl-Diaminopimelat Desuccinylase	0,30

**Tabelle A3:** Deregulierte Gene von *S. aureus* HG001<sup>R</sup> nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK MT02

ORF	Gen	Beschreibung	x-fache Änderung
SACOL0018	<i>purA</i>	Adenylosuccinatsynthetase	2,60
SACOL0095	<i>spa</i>	Immunoglobulin G bindendes Protein A, Vorstufe	2,71
SACOL0096	<i>sarS</i>	staphylococcal accessory regulator S	2,78
SACOL0099	<i>sirA</i>	EisenTransporter (ABC Transporter), eisenbindendes Protein	2,42
SACOL0100		Pyridoxalphosphat abhängiges Enzym	2,61
SACOL0102		lucC Familie Siderophor Biosynthese Protein	2,27
SACOL0111		Acetoinreduktase	0,18
SACOL0118	<i>sodA1</i>	Superoxiddismutase	0,44
SACOL0121	<i>deoD1</i>	Purin Nukleosid Phosphorylase	0,47
SACOL0135		Bifunktionale Acetaldehyd-CoA/Alkohol Dehydrogenase	0,44
SACOL0136	<i>cap5A</i>	Kapselpolysaccharid Biosyntheseprotein	0,21
SACOL0137	<i>cap5B</i>	Kapselpolysaccharid Biosyntheseprotein	0,12
SACOL0138	<i>cap5C</i>	Kapselpolysaccharid Biosyntheseprotein	0,38
SACOL0139	<i>cap5D</i>	Kapselpolysaccharid Biosyntheseprotein	0,25
SACOL0140	<i>cap5E</i>	Kapselpolysaccharid Biosyntheseprotein	0,36
SACOL0141	<i>cap5F</i>	Kapselpolysaccharid Biosyntheseprotein	0,35
SACOL0142	<i>cap5G</i>	Kapselpolysaccharid Biosyntheseprotein	0,35
SACOL0164		Gramicidin S Synthetase 2 verwandtes Protein	0,45
SACOL0175		Glucose-spezifischer PTS Transporter, IIBC Komponente	4,54
SACOL0176		Hypothetisches Protein	0,31
SACOL0177	<i>murQ</i>	N-Acetylmuraminsäure-6-Phosphat Etherase	0,23
SACOL0178		Sucrose-spezifischer PTS Transporter	0,30
SACOL0179		RpiR Familie Phosphozucker-bindender Transkriptionsregulator	0,33
SACOL0191		M23/M37 Peptidasedomäne-enthaltendes Protein	0,47
SACOL0197		Gfo/Idh/MocA Familie Oxidoreduktase	0,46
SACOL0199		Hypothetisches Protein	2,39
SACOL0200	<i>uhpT</i>	Zuckerphosphat Antiporter	0,06
SACOL0204	<i>pflB</i>	Format Acetyltransferase	0,15
SACOL0205	<i>pflA</i>	Pyruvat Format Lyase aktivierendes Enzym, hypothetisch	0,21
SACOL0211		Thiolase, hypothetisch	0,09
SACOL0212		3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase	0,11
SACOL0213		Acyl-CoA Dehydrogenase Familie Protein	0,05
SACOL0214		CoA Ligase für langkettige Fettsäuren, hypothetisch	0,23
SACOL0215		Propionat CoA-Transferase, hypothetisch	0,15
SACOL0218		Hypothetisches Protein	0,26
SACOL0219		Hypothetisches Protein	0,20
SACOL0220		Flavohämoprotein	0,20
SACOL0222	<i>ldh1</i>	L-Lactat Dehydrogenase	0,09
SACOL0224		PTS System, IIBC Komponente	0,23
SACOL0244	<i>scdA</i>	Zellwandbiosyntheseprotein	0,32
SACOL0247	<i>lrgA</i>	Mureinhydrolase Regulator	5,47
SACOL0248	<i>lrgB</i>	Antiholin-ähnliches Protein	4,95

SACOL0264		ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	2,02
SACOL0267		Hypothetisches Protein	2,35
SACOL0270		Staphyloxanthin Biosyntheseprotein	2,17
SACOL0272		Hypothetisches Protein	2,12
SACOL0273		Hypothetisches Protein	2,12
SACOL0276		Hypothetisches Protein	0,48
SACOL0308		PfkB Familie Carbohydrat Kinase	0,41
SACOL0309		Hypothetisches Protein	0,39
SACOL0310		Nukleosid Permease NupC, hypothetisch	0,32
SACOL0311		Natrium-abhängiges Symporterfamilienprotein	0,13
SACOL0312	<i>nanA</i>	N-Acetylneuraminat Lyase	0,08
SACOL0313		ROK Familie protein	0,23
SACOL0315		N-Acetylmannosamin-6-Phosphat 2-Epimerase	0,31
SACOL0316		Hypothetisches Protein	0,15
SACOL0317		Lipase Vorstufe, N-terminal unterbrochen	0,11
SACOL0390		Lipase Vorstufe, C-terminal unterbrochen	0,09
SACOL0391		Hypothetisches Protein	2,16
SACOL0400	<i>ulaA</i>	Ascorbat-spezifisches PTS System Enzym IIC	0,07
SACOL0401		PTS Transportsystemprotein, hypothetisch	0,12
SACOL0402		PTS Transportsystem IIA Komponente, hypothetisch	0,10
SACOL0403		BglG Familie Transkriptionsantiterminator	0,11
SACOL0418		mttA/Hcf106 Familie Protein	2,50
SACOL0425		Hypothetisches Protein	3,61
SACOL0437	<i>rpsF</i>	30S ribosomales Protein S6	2,98
SACOL0438	<i>ssb2</i>	Einzelstrang DNA-bindendes Protein	2,41
SACOL0439	<i>rpsR</i>	30S ribosomales Protein S18	2,65
SACOL0470		Superantigen-ähnliches Protein	0,38
SACOL0480		Hypothetisches Protein	0,39
SACOL0494	<i>nuoF</i>	NADH Dehydrogenase Untereinheit 5	0,30
SACOL0495		Hypothetisches Protein	0,26
SACOL0507		LysM Domäne-enthaltendes Protein	2,51
SACOL0512		Hypothetisches Protein	2,14
SACOL0516		Zucker-spezifisches PTS Transportsystem, IIBC Komponente	3,08
SACOL0517		Alpha-Amylase Familie Protein	2,49
SACOL0518		GntR Familie Transkriptionsregulator	2,03
SACOL0583	<i>rplK</i>	50S ribosomales Protein L11	2,29
SACOL0584	<i>rplA</i>	50S ribosomales Protein L1	3,26
SACOL0585	<i>rplJ</i>	50S ribosomales Protein L10	3,62
SACOL0586	<i>rplL</i>	50S ribosomales Protein L7/L12	3,61
SACOL0592	<i>rpsG</i>	30S ribosomales Protein S7	2,29
SACOL0593	<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G	2,29
SACOL0595		Peptidase, hypothetisch	2,02
SACOL0603		Deoxyadenosinkinase, hypothetisch	2,75
SACOL0604		Deoxynukleosidkinase Familie Protein	2,90
SACOL0608	<i>sdrC</i>	<i>sdrC</i> Protein	2,11
SACOL0609	<i>sdrD</i>	<i>sdrD</i> Protein	5,57
SACOL0625		Hypothetisches Protein	0,04

SACOL0631		Hypothetisches Protein	2,09
SACOL0632		Hypothetisches Protein	2,35
SACOL0639		Hypothetisches Protein	2,17
SACOL0670		Hypothetisches Protein	2,25
SACOL0672	<i>sarA</i>	staphylococcal accessory regulator A	2,01
SACOL0679		Monovalenter Kation/H+ Antiporter Untereinheit A, hypothetisch	0,48
SACOL0680		Monovalenter Kation/H+ Antiporter Untereinheit B, hypothetisch	0,48
SACOL0681		Monovalenter Kation/H+ Antiporter Untereinheit C, hypothetisch	0,47
SACOL0682		Monovalenter Kation/H+ Antiporter Untereinheit D, hypothetisch	0,50
SACOL0688		ABC Transporter extrazelluläres Bindeprotein	2,88
SACOL0689		ABC Transporter Permeaseprotein	2,65
SACOL0690		ABC Transporter ATP-bindendes protein	2,83
SACOL0692		Hypothetisches Protein	0,48
SACOL0699	<i>pbp4</i>	Penicillin-bindendes Protein 4	2,80
SACOL0707		Dihydroxyaceton Kinase, hypothetisch	0,46
SACOL0712		Esterase, hypothetisch	2,24
SACOL0714		Hypothetisches Protein	2,16
SACOL0722		PhosphatTransporter Familie Protein	2,01
SACOL0725		AraC Familie Transkriptionsregulator	2,88
SACOL0726	<i>sarX</i>	staphylococcal accessory regulator X	3,23
SACOL0735		Hypothetisches Protein	3,24
SACOL0752		Hypothetisches Protein	2,15
SACOL0753		Hypothetisches Protein	2,05
SACOL0755		Hypothetisches Protein	2,56
SACOL0767		Hypothetisches Protein	0,26
SACOL0768		Hypothetisches Protein	0,20
SACOL0769		Hypothetisches Protein	2,56
SACOL0789		7-Cyano-7-Deazaguanin Reduktase	2,42
SACOL0790		Integrales Membrandomäne-enthaltendes Protein	2,53
SACOL0796		FecCD Familie Transportprotein	3,24
SACOL0797		EisenTransporter (ABC Transporter), Permease	4,07
SACOL0798		EisenTransporter (ABC Transporter), hypothetisch	3,33
SACOL0799		Transferrinrezeptor	5,28
SACOL0802		Hypothetisches Protein	3,88
SACOL0804		Hypothetisches Protein	2,15
SACOL0809		GGDEF Domäne-enthaltendes Protein	2,11
SACOL0823	<i>uvrB</i>	Excinuklease ABC Untereinheit B	0,42
SACOL0824	<i>uvrA</i>	Excinuklease ABC Untereinheit A	0,48
SACOL0833		ATP-abhängige Clp Protease proteolytische Untereinheit, hypothetisch	2,07
SACOL0837	<i>gapR</i>	Regulator des Glycolyseoperons	2,65
SACOL0872		OsmC/Ohr Familie Protein	0,43
SACOL0920		Hypothetisches Protein	2,26
SACOL0934		Hypothetisches Protein	2,20
SACOL0959		NADH:Flavin Oxidoreduktase / NADH Oxidase Familie Protein	0,04
SACOL0960	<i>rocD</i>	Ornithin-oxo-Säure Transaminase	0,28
SACOL0976		HAD Superfamilie Hydrolase	2,08

SACOL0980		LysR Familie Transkriptionsregulator	2,10
SACOL0987	<i>fabH</i>	3-Oxoacyl-(Acyl Trägerprotein) Synthase III	5,85
SACOL0988	<i>fabF</i>	3-Oxoacyl-(Acyl Trägerprotein) Synthase II	2,77
SACOL0991	<i>oppB</i>	Oligopeptidtransport System Permease, hypothetisch	0,24
SACOL0992	<i>oppC</i>	Oligopeptidtransport System Permease, hypothetisch	0,26
SACOL0993	<i>oppD</i>	Oligopeptid ABC Transporter	0,24
SACOL0994	<i>oppF</i>	Oligopeptidtransport ATP-bindendes Protein, hypothetisch	0,29
SACOL0995		Tansportsystem extrazellulär bindendes Lipoprotein	0,27
SACOL1036		Protease, hypothetisch	2,24
SACOL1043		Glycosyltransferase, Gruppe 1 Familie Protein	3,01
SACOL1049	<i>menA</i>	1,4-Dihydroxy-2-Naphthoat-Octaprenyltransferase	2,33
SACOL1059		Hypothetisches Protein	3,41
SACOL1060		MarR Familie Transkriptionsregulator	3,11
SACOL1063		Acetyltransferase (GNAT) Familie Protein	2,71
SACOL1065		Hypothetisches Protein	2,62
SACOL1071		Hypothetisches Protein	0,33
SACOL1077	<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamide Synthase I	0,45
SACOL1078	<i>purL</i>	phosphoribosylformylglycinamide Synthase II	0,45
SACOL1079	<i>purF</i>	Amidophosphoribosyltransferase	0,40
SACOL1080	<i>purM</i>	Phosphoribosylaminoimidazol Synthetase	0,43
SACOL1084		Cobalt Transportprotein, hypothetisch	0,25
SACOL1085		ABC Transporter	0,20
SACOL1086		Hypothetisches Protein	0,17
SACOL1093		Glutaredoxin, hypothetisch	3,05
SACOL1094	<i>cydA</i>	Cytochrom d Ubiquinol Oxidase, Untereinheit I	0,37
SACOL1095	<i>cydB</i>	Cytochrom d Ubiquinol Oxidase, Untereinheit II	0,42
SACOL1107		Cro/CI Familie Transkriptionsregulator	2,06
SACOL1118	<i>typA</i>	GTP-bindendes Protein	3,29
SACOL1123	<i>pyc</i>	Pyruvatcarboxylase	0,45
SACOL1132		Hypothetisches Protein	2,71
SACOL1140	<i>isdA</i>	Eisen-reguliertes Häm-Eisen bindendes Protein	2,91
SACOL1142	<i>isdD</i>	Hypothetisches Protein	2,23
SACOL1145	<i>srtB</i>	Sortase B	2,20
SACOL1173	<i>hly</i>	Alpha-Hämolysin Vorstufe	0,24
SACOL1175		Hypothetisches Protein	2,46
SACOL1181	<i>arcB1</i>	Ornithin Carbamoyltransferase	0,29
SACOL1182	<i>arcC1</i>	Carbamat Kinase	0,27
SACOL1204	<i>ylmH</i>	YlmH Protein	2,31
SACOL1208	<i>lspA</i>	Lipoprotein Signalpeptidase bifunktionales Pyrimidin Regulator Protein, Uracil	2,14
SACOL1210	<i>pyrR</i>	Phosphoribosyltransferase	2,25
SACOL1211	<i>uraA</i>	Uracil Permease	2,34
SACOL1212	<i>pyrB</i>	Aspartat Carbamoyltransferase, katalytische Untereinheit	4,72
SACOL1213	<i>pyrC</i>	Dihydroorotase	4,99
SACOL1214	<i>carA</i>	Carbamoylphosphat Synthase, kleine Untereinheit	5,40
SACOL1215	<i>carB</i>	Carbamoylphosphat Synthase, große Untereinheit	7,65
SACOL1216	<i>pyrF</i>	Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase	11,92

SACOL1217	<i>pyrE</i>	Orotat Phosphoribosyltransferase	12,52
SACOL1218		Hypothetisches Protein	9,66
SACOL1242		Transkriptionsregulator der Fettsäurebiosynthese	2,71
SACOL1243	<i>plsX</i>	Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase, hypothetisch	2,45
SACOL1244	<i>fabD</i>	Malonyl CoA-Acyl Trägerprotein Transacylase	2,45
SACOL1245	<i>fabG1</i>	3-Oxoacyl-(Acyl Trägerprotein) Reduktase	2,13
SACOL1254	<i>rpsP</i>	30S ribosomales Protein S16	2,67
SACOL1264	<i>lytN</i>	Zellwand Hydrolase	2,12
SACOL1267	<i>topA</i>	DNA Topoisomerase I	2,19
SACOL1268	<i>gid</i>	tRNA (Uracil-5-)-Methyltransferase	2,14
SACOL1274	<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	2,62
SACOL1292	<i>rpsO</i>	30S ribosomales Protein S15	2,43
SACOL1319	<i>glpF</i>	Glycerolaufnahme unterstützendes Protein	0,31
SACOL1320	<i>glpK</i>	Glycerol Kinase	0,30
SACOL1321	<i>glpD</i>	Aerobe Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase	0,11
SACOL1328	<i>glnR</i>	Glutamin Synthetase Repressor	3,30
SACOL1329	<i>femC</i>	Glutamin Synthetase	2,29
SACOL1338		Hypothetisches Protein	2,25
SACOL1352		ABC Transporter	0,20
SACOL1353		ABC Transporter, Permease, hypothetisch	0,45
SACOL1357		Thermonuklease	2,47
SACOL1367		Aminosäure Permease	2,89
SACOL1368	<i>kataA</i>	Katalase	0,29
SACOL1371	<i>guaC</i>	Guanosin-5'-Monophosphat Oxidoreduktase	3,06
SACOL1375		Hypothetisches Protein	0,37
SACOL1378		Hypothetisches Protein	2,04
SACOL1390	<i>parC</i>	DNA Topoisomerase IV Untereinheit A	2,16
SACOL1392		Natrium:Alanin Symporter	2,14
SACOL1400		ImpB/MucB/SamB Familie Protein	0,28
SACOL1403	<i>trpE</i>	Anthranilat Synthase Komponente I	2,54
SACOL1404	<i>trpG</i>	Anthranilat Synthase Komponente II	2,06
SACOL1412		Hydrolase-ähnliches Protein	2,10
SACOL1427		ABC Transporter	2,15
SACOL1428	<i>lysC</i>	Aspartat Kinase	0,35
SACOL1429	<i>asd</i>	Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase	0,34
SACOL1430	<i>dapA</i>	Dihydrodipicolinat Synthase	0,36
SACOL1431	<i>dapB</i>	Dihydrodipicolinat Reductase	0,44
SACOL1432	<i>dapD</i>	2,3,4,5-Tetrahydropyridin-2,6-Dicarboxylat N-Succinyltransferase	0,44
SACOL1443	<i>brnQ3</i>	Aminosäure Transport System II Trägerprotein	3,36
SACOL1457		PTS System, Glucose-spezifische IIA Komponente	0,47
SACOL1468		Hypothetisches Protein	4,14
SACOL1518	<i>cmk</i>	Cytidylate Kinase	2,16
SACOL1532		Hypothetisches Protein	0,42
SACOL1551	<i>malA</i>	Alpha-D-1,4-Glucosidase	0,41
SACOL1572	<i>accB1</i>	Biotin Carboxyl Trägerprotein der Acetyl-CoA Carboxylase	2,12
SACOL1608	<i>rpmG</i>	50S ribosomales Protein L33	2,35
SACOL1635	<i>prmA</i>	Ribosomales Protein L11 Methyltransferase	2,34

SACOL1636	<i>dnaJ</i>		2,83
SACOL1637	<i>dnaK</i>	Molekulares Chaperon	3,10
SACOL1638	<i>grpE</i>	Hsp-70 Cofaktor	3,08
SACOL1639	<i>hrcA</i>	Hitzeinduzierbarer Transkriptionsrepressor	3,04
SACOL1642	<i>rpsT</i>	30S ribosomales Protein S20	2,51
SACOL1659		Hypothetisches Protein	0,47
SACOL1660		LamB/YcsF Familie Protein	0,43
SACOL1661	<i>accB2</i>	Acetyl-CoA Carboxylase, Biotin Carboxyl Trägerprotein	0,44
SACOL1664		Hypothetisches Protein	0,50
SACOL1669		O-Methyltransferase Familie Protein	2,22
SACOL1700	<i>rpmA</i>	50S ribosomales Protein L27	2,26
SACOL1702	<i>rplU</i>	50S ribosomales Protein L21	2,82
SACOL1705		Hypothetisches Protein	0,27
SACOL1725	<i>rplT</i>	50S ribosomales Protein L20	3,88
SACOL1726	<i>rplM</i>	50S ribosomales Protein L35	2,70
SACOL1727	<i>infC</i>	Translationsinitiationsfaktor IF-3	2,20
SACOL1734	<i>gapA2</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase 2	0,15
SACOL1745	<i>pyk</i>	Pyruvat Kinase	0,49
SACOL1759		Universelles Stressprotein	0,26
SACOL1765		Aminotransferase Klasse V Protein	3,18
SACOL1769	<i>rpsD</i>	30S ribosomales Protein S4	3,08
SACOL1779		Transglycosylasedomäne-enthaltendes Protein	2,06
SACOL1783	<i>acs</i>	Acetyl-CoA Synthetase	0,10
SACOL1784	<i>acuA</i>	Acetoin umsetzendes Protein AcuA	0,13
SACOL1785	<i>acuC</i>	Acetoin umsetzendes Protein AcuC	0,25
SACOL1816	<i>putA</i>	Prolin Dehydrogenase	0,17
SACOL1827		RNA Polymerase Sigma-70 Familie Protein	0,31
SACOL1833		crcB Familie Protein	2,00
SACOL1835		Aldo/Keto Reduktase Familie Oxidoreduktase	0,48
SACOL1838	<i>pckA</i>	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase	0,26
SACOL1845		Lipoprotein, hypothetisch	2,92
SACOL1846		Hypothetisches Protein	2,81
SACOL1848		Lipoprotein, hypothetisch	6,13
SACOL1850		Hypothetisches Protein	3,77
SACOL1878	<i>epiA</i>	Lantibiotische Epidermin Vorstufe	0,34
SACOL1897		Exportprotein PrsA, hypothetisch	0,48
SACOL1903		Hypothetisches Protein	2,13
SACOL1904		Transkriptionsregulator, hypothetisch	2,89
SACOL1932		Glycosyltransferase	0,47
SACOL1952		Ferritin Familie Protein	0,49
SACOL1956		Hypothetisches Protein	0,49
SACOL1963		Hochaffinitäts-Prolin Permease	0,44
SACOL1986		Hypothetisches Protein	0,35
SACOL1999		Hypothetisches Protein	0,15
SACOL2003	<i>hly</i>	Phospholipase C	0,17
SACOL2016	<i>groEL</i>	Chaperonin	2,56
SACOL2017	<i>groES</i>	Co-Chaperonin	3,05

SACOL2020		Hypothetisches Protein	2,36
SACOL2044		Acetolactate Synthase 1 regulatorische Untereinheit	0,46
SACOL2045	<i>ilvC</i>	Ketol-Säure Reduktoisomerase	0,50
SACOL2046	<i>leuA</i>	2-Isopropylmalat Synthase	0,46
SACOL2066	<i>kdpC</i>	Kalium-transportierende ATPase Untereinheit C	0,16
SACOL2067	<i>kdpB</i>	Kalium-transportierende ATPase Untereinheit B	0,10
SACOL2068	<i>kdpA</i>	Kalium-transportierende ATPase Untereinheit A	0,09
SACOL2070	<i>kdpD</i>	Sensor Histidinkinase	0,42
SACOL2071	<i>kdpE</i>	DNA-bindender Responseregulator	0,44
SACOL2072		DEAD-box ATP abhängige DNA Helikase	2,97
SACOL2083	<i>thiE</i>	Thiaminphosphate Pyrophosphorylase	0,11
SACOL2084	<i>thiM</i>	Hydroxyethylthiazol Kinase	0,08
SACOL2085	<i>thiD2</i>	Phosphomethylpyrimidin Kinase	0,09
SACOL2086		TenA Familie Transkriptionsregulator	0,09
SACOL2109		HemK Familie Modifikationsmethylase	2,32
SACOL2118		Hypothetisches Protein	2,72
SACOL2119	<i>pyrG</i>	CTP Synthetase	2,72
SACOL2120	<i>rpoE</i>	DNA-gerichtete RNA Polymerase Untereinheit delta	2,57
SACOL2131		Dps Familie Protein	0,48
SACOL2145	<i>glmS</i>	Glucosamin-Fructose-6-Phosphat Aminotransferase	0,27
SACOL2146		PTS System, Mannitol-spezifische IIBC Komponente	0,11
SACOL2147		BglG Familie Transkriptionsantiterminator	0,29
SACOL2148		PTS System, Mannitol-spezifische IIA Komponente	0,32
SACOL2149	<i>mtlD</i>	Mannitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase	0,46
SACOL2165		Eisen Transporter (ABC Transporter), Permease	2,08
SACOL2166		Eisen Transporter (ABC Transporter)	2,07
SACOL2168		Hypothetisches Protein	2,05
SACOL2170		Transporter, hypothetisch	2,14
SACOL2176	<i>opuD2</i>	BCCT Familie Osmoprotektans Transporter	2,01
SACOL2197		Oberflächenprotein, hypothetisch	0,27
SACOL2206	<i>rpsI</i>	30S ribosomales Protein S9	2,82
SACOL2207	<i>rplM</i>	50S ribosomales Protein L13	2,29
SACOL2212	<i>rplQ</i>	50S ribosomales Protein L17	3,26
SACOL2213	<i>rpoA</i>	DNA-gerichtete RNA Polymerase Untereinheit alpha	3,51
SACOL2214	<i>rpsK</i>	30S ribosomales Protein S11	3,04
SACOL2215	<i>rpsM</i>	30S ribosomales Protein S13	2,67
SACOL2217	<i>infA</i>	Translationsinitiationsfaktor IF-1	2,24
SACOL2218	<i>adk</i>	Adenylat Kinase	2,29
SACOL2219	<i>secY</i>	Präprotein Translocase Untereinheit	2,52
SACOL2220	<i>rplO</i>	50S ribosomales Protein L15	2,53
SACOL2221	<i>rpmD</i>	50S ribosomales Protein L30	2,74
SACOL2222	<i>rpsE</i>	30S ribosomales Protein S5	2,46
SACOL2223	<i>rplR</i>	50S ribosomales Protein L18	2,09
SACOL2224	<i>rplF</i>	50S ribosomales Protein L6	2,87
SACOL2225	<i>rpsH</i>	30S ribosomales Protein S8	3,20
SACOL2226	<i>rpsN</i>	30S ribosomales Protein S14	2,52
SACOL2227	<i>rplE</i>	50S ribosomales Protein L5	3,33

SACOL2228	<i>rplX</i>	50S ribosomales Protein L24	3,14
SACOL2229	<i>rplN</i>	50S ribosomales Protein L14	2,32
SACOL2230	<i>rpsQ</i>	30S ribosomales Protein S17	3,11
SACOL2231	<i>rpmC</i>	50S ribosomales Protein L29	3,21
SACOL2232	<i>rplP</i>	50S ribosomales Protein L16	3,25
SACOL2233	<i>rpsC</i>	30S ribosomales Protein S3	3,03
SACOL2234	<i>rplV</i>	50S ribosomales Protein L22	2,29
SACOL2235	<i>rpsS</i>	30S ribosomales Protein S19	2,50
SACOL2236	<i>rplB</i>	50S ribosomales Protein L2	3,34
SACOL2237	<i>rplW</i>	50S ribosomales Protein L23	3,58
SACOL2238	<i>rplD</i>	50S ribosomales Protein L4	3,20
SACOL2239	<i>rplC</i>	50S ribosomales Protein L3	3,42
SACOL2240	<i>rpsJ</i>	30S ribosomales Protein S10	3,03
SACOL2246		Glucoseaufnahme Protein	2,58
SACOL2252		AcrB/AcrD/AcrF Familie Protein	2,04
SACOL2256		MarR Familie Transkriptionsregulator	2,07
SACOL2258	<i>sarV</i>	staphylococcal accessory regulator V	2,06
SACOL2277	<i>sirA</i>	Eisen Transporter (ABC Transporter)	3,97
SACOL2278		Acyl-CoA Dehydrogenase-ähnliches protein	0,43
SACOL2281	<i>ureB</i>	Urease Untereinheit beta	2,44
SACOL2282	<i>ureC</i>	Urease Untereinheit alpha	2,13
SACOL2291		Staphyloxanthin Biosyntheseprotein	5,77
SACOL2302		Transkriptionsregulator, hypothetisch	0,41
SACOL2306		Hypothetisches Protein	2,11
SACOL2307		Hypothetisches Protein	2,16
SACOL2308		RpiR Familie Phosphozucker-bindender Transkriptionsregulator	2,08
SACOL2317		Phosphozucker-bindender Transkriptionsregulator	3,51
SACOL2321		Dehydrogenase, hypothetisch	0,33
SACOL2322		M20/M25/M40 Familie Peptidase	0,47
SACOL2323	<i>hutI</i>	Imidazoln Propionase	0,13
SACOL2324	<i>hutU</i>	Urocanat Hydratase	0,11
SACOL2327	<i>hutG</i>	Formimidoyl Glutamase	0,43
SACOL2340	<i>gltS</i>	Natrium:Glutamat Symporter	2,69
SACOL2346		Hypothetisches Protein	2,14
SACOL2347		EmrB/QacA Familie Wirkstoffresistenz Transporter	3,91
SACOL2348		Hypothetisches Protein	5,41
SACOL2363		L-Lactat Permease 2, hypothetisch	0,04
SACOL2394	<i>narH</i>	Respiratorische Nitratreduktase, Untereinheit beta	0,36
SACOL2399	<i>nirR</i>	Transkriptionsregulator	0,43
SACOL2401		Format/Nitrit Transporter Familie Protein	2,05
SACOL2407		Lipoprotein, hypothetisch	2,20
SACOL2419	<i>hlgA</i>	Gamma-Hämolsin, Komponente A	0,33
SACOL2422	<i>hlgB</i>	Gamma-Hämolsin, Komponente B	0,42
SACOL2442		Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter, hypothetisch	2,38
SACOL2456		Hypothetisches Protein	2,16
SACOL2458		Aminosäure Permease	3,92
SACOL2459	<i>pnbA</i>	Para-Nitrobenzyl Esterase	0,47

SACOL2462		ABC Transporter	0,49
SACOL2470		Hypothetisches Protein	2,53
SACOL2479		Hypothetisches Protein	0,49
SACOL2491		Hypothetisches Protein	0,28
SACOL2514	<i>gntP</i>	Gluconat Permease, hypothetisch	0,12
SACOL2515	<i>gntK</i>	Gluconokinase, hypothetisch	0,07
SACOL2516	<i>gntR</i>	Transkriptionsrepressor des Gluconat-Operons	0,11
SACOL2517		MerR Familie Transkriptionsregulator	0,26
SACOL2518		Hypothetisches Protein	0,23
SACOL2525		ABC Transporter	0,36
SACOL2541		Acetyltransferase (GNAT) Familie protein	2,24
SACOL2550		Hypothetisches Protein	0,47
SACOL2552		PTS System, IIABC Komponent	8,73
SACOL2557		Hypothetisches Protein	2,31
SACOL2562	<i>ogt</i>	6-O-Methylguanine DNA Methyltransferase, hypothetisch	0,44
SACOL2563		ATP-abhängige Clp Protease, hypothetisch	0,22
SACOL2564	<i>feoB</i>	Eisentransportprotein B, hypothetisch	2,26
SACOL2565		EisenTransporter (ABC Transporter), Permease	2,43
SACOL2566		MmpL Effluxpumpe, hypothetisch	7,77
SACOL2569		1-Pyrrolin-5-Carboxylat Dehydrogenase	0,39
SACOL2572		Kupfer-transportierende P-Typ ATPase	0,47
SACOL2575		Aminotransferase, hypothetisch	0,42
SACOL2576	<i>crtN</i>	Squalen Synthase	0,48
SACOL2577	<i>crtM</i>	Dehydrosqualen Synthase	0,46
SACOL2578		Glycosyltransferase, Gruppe 2 Familie Protein	0,41
SACOL2579		Phytoen Dehydrogenase verwandtes Protein, hypothetisch	0,41
SACOL2580		Hypothetisches Protein	0,45
SACOL2581		Sekretorisches Antigen, Vorstufe	2,94
SACOL2582		Hypothetisches Protein	2,21
SACOL2606	<i>pyrD</i>	Dihydroorotat Dehydrogenase 2	2,19
SACOL2618	<i>ldh2</i>	L-Lactat Dehydrogenase	0,28
SACOL2621		Hypothetisches Protein	0,48
SACOL2635	<i>nrdD</i>	Anaerobe Ribonucleosid Triphosphat Reductase	0,50
SACOL2652	<i>clfB</i>	Clumping factor B	5,40
SACOL2678		Hypothetisches Protein	0,27
SACOL2694	<i>geh</i>	Lipase, Vorstufe	0,21
SACOL2712	<i>drp35</i>		0,26
SACOL2722		N-Acetyltransferase, hypothetisch	0,42
SACOL2731		CSD Familie Kälteschockprotein	2,23
SACOL2733		Hypothetisches Protein	0,45
SACOL2734		Hypothetisches Protein	0,44

**Tabelle A4:** Deregulierte Gene von *S. epidermidis* 567 nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK Ciprofloxacin

id	Beschreibung	x-fache Änderung
10	Hypothetisches Protein cpe1916	0,372
11	30S ribosomales Protein S7	0,119
13	IlvE (Aminotransferase Homolog)	0,274
16	Hypothetisches Protein sav0707	0,074
17	Hypothetisches Protein sav0572	5,940
20	Hypothetisches Protein sav0725	0,424
21	Phosphomevalonat Kinase	6,865
23	Hypothetisches Protein alr1286	0,477
24	Hypothetisches Protein sa0704	3,702
25	Excinuklease ABC Untereinheit B	3,173
29	Enolase (2-Phosphoglycerat Dehydratase)	0,456
30	Naphthoat Synthase	0,184
31	Hypothetisches Protein sav0828	2,696
32	Quinol Oxidase Polypeptid GoxC	0,066
34	Phosphoribosylformyl-Glycinamidin Synthase	0,487
36	Hypothetisches Protein sav1082	2,000
38	PotA (Spermidin/Putrescin ABC Transporter )	16,044
39	wahrscheinlich MnhB (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit)	0,285
41	NAD-spezifische Glutamat Dehydrogenase	0,313
42	Hypothetisches Protein sav1121	0,444
43	Transposase	21,713
44	Hypothetisches Protein sav1142	8,315
45	OppF (OligopeptidTransporter)	8,837
46	Ham1 Homolog	2,236
47	Hypothetisches Protein sav1004	0,222
49	EmrB-ähnliches Protein	3,755
53	Hypothetisches Protein tc0114	0,098
56	Hypothetisches Protein sav0660	2,392
59	Hypothetisches Protein sav2443	0,334
60	Hypothetisches Protein sav0684	4,678
61	Konserviertes Hypothetisches Protein sav0255	6,127
65	VraA	11,929
66	Hypothetisches Protein 30.9 kDa	22,769
68	Alkohol-Acetaldehyd Dehydrogenase	3,866
69	sa0551 (Quecksilber Reduktase Homolog)	6,364
71	Uncharakterisiertes konserviertes Protein	0,495
73	Excinuklease ABC Untereinheit A	3,131
74	Hypothetisches Protein sav1014	7,528
76	Hypothetisches Protein sav1030	0,266
77	Ribonuclease	2,850
80	Quinol Oxidase Polypeptid GoxB	0,044
82	Phosphoribosyl-Pyrophosphat Amidotransferase PurF	0,444

---

84	sa0938 (Cytochrom D Ubiquinol Oxidase Untereinheit II Homolog)	8,312
86	PotC (Spermidin/Putrescin ABC Transporter Homolog)	5,291
87	wahrscheinlich: OrfA (hypothetisches Protein sa0814)	0,392
88	Hypothetisches Protein sav1113	2,995
89	Glycerophosphoryldiester Phosphodiesterase	6,685
91	Coenzym A Disulfid Reduktase	0,227
92	DNA-abhängige DNA-Polymerase Untereinheit beta	9,647
93	Hypothetisches Protein sav0990	7,606
94	Hypothetisches Protein sav1153	2,554
96	Hypothetisches Protein sav2517	3,574
98	Hypothetisches Protein sav0610	2,294
100	Acetylazetoin Reduktase	0,237
101	Hypothetisches Protein sav0519	0,264
103	wahrscheinlich: Teichonsäure Biosynthese Protein B	2,320
104	Glutamyl-tRNA Synthetase GluRS	3,549
106	Hypothetisches Protein sav0672	0,376
107	Elongationsfaktor G	0,102
108	Hypothetisches Protein sav0685	7,291
109	Hypothetisches Protein sav0555	0,261
110	Fructose-1-Phosphat Kinase	0,334
113	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	4,753
114	Hypothetisches Protein lin0435	3,943
116	Hypothetisches Protein sav0726	0,248
118	Hypothetisches Protein sav0739	2,377
119	Alkohol Dehydrogenase	0,327
122	Hypothetisches Protein sav1015	0,372
124	YdaT	2,112
125	Hypothetisches Protein sav2478	0,265
127	Hypothetisches Protein sav2490	0,354
134	PotD (Spermidin/Putrescin-bindendes Protein Vorstufe Homolog)	4,309
136	Pyruvat Carboxylase	2,366
137	Argininosuccinat Synthase	17,675
140	Muts2 protein	3,895
141	wahrscheinlich: Esterase/Lipase /Thioesterase	3,713
144	Zellteilungsprotein FtsZ	0,389
149	Pyrimidin Nukleosid Transportprotein	0,349
155	Translationselongationsfaktor Tu	0,062
159	Hypothetisches Protein sav0566	0,403
161	Hypothetisches Protein sav0580	0,284
162	Hypothetisches Protein sav0720	2,525
163	Hypothetisches Protein sav0587	0,417
168	Preprotein Translocase SecA Untereinheit	2,070
171	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	0,233
172	Hypothetisches Protein sa2299	2,202
174	Fibronectin bindendes Autolysin	0,206
176	FoID	0,138
180	Glycin Oxidase	4,439

---

182	Hypothetisches Protein sa0956	9,670
183	Hypothetisches Protein sav0955	2,577
184	vermutete h�m A Synthase	4,540
185	Glucose-6-Phosphat Isomerase	0,093
186	Hypothetisches Protein sav1127	4,199
187	ClpB (ClpB Chaperon Homolog)	2,153
188	Excinuklease ABC Untereinheit C	3,219
200	Hypothetisches Protein sa0619	0,428
201	Hypothetisches Protein sav0541	10,931
202	Hypothetisches Protein sav0673	0,328
203	Hypothetisches Protein sav0549	0,271
206	NagA (wahrscheinlich N-Acetylglucosamin-6-Phosphate Deacetylase)	0,500
207	Hypothetisches Protein sav0567	0,383
208	Hypothetisches Protein sav2459	2,180
210	RecQ (wahrscheinlich DNA Helicase)	7,059
212	Hypothetisches Protein sav0729	0,296
213	Transposase	2,334
215	Transposase	23,294
216	Peptid Release Faktor 2	4,778
221	Hypothetisches Protein sav0181	3,328
222	Hypothetisches Protein sav1056	0,361
223	sa0769 (ABC Transporter Homolog)	4,700
227	D-Alanin-D-Alanyl Proteinligase DltA	0,265
229	Hypothetisches Protein sav0945	29,599
234	Fructose-Bisphosphatase	0,214
235	Transposase	20,769
237	Hypothetisches Protein sav0997	4,085
239	Hypothetisches Protein sav1008	2,024
240	YlmF	0,310
242	Hypothetisches Protein sav0614	6,889
243	orf122 (Fragment)	0,045
244	Membranprotein	5,234
246	ATP-bindender Transporter A	3,001
248	sa0620 (sekretorisches Antigen SsaA Homolog)	0,469
250	Hypothetisches Protein sav0679	4,366
258	Hypothetisches Protein sav0722	0,351
264	Hypothetisches Protein sav0755	18,338
267	Phosphoglycerat Kinase	0,263
269	YndL	7,147
271	Hypothetisches Protein sav0838	3,687
272	Hypothetisches Protein sav2512	0,064
274	Hypothetisches Protein sav1075	12,237
275	Hypothetischer MembranTransporter (DltB Membranprotein)	0,238
279	Gluconat Operon Transkriptionsrepressor	4,482
281	Signalpeptidase	0,447
283	FabH (3-Oxoacyl-Synthase)	0,418
285	Hypothetisches Protein 30.9 kDa	22,266

---

291	Hypothetisches Protein tc0114	0,085
292	ATP-bindendes Protein	8,251
296	Bmr-ähnliches Protein (sa2241)	2,870
300	Hypothetisches Protein sav0693	23,030
302	Hypothetisches Protein sav2460	2,307
314	sa0878 (Resistenzprotein toxische Anionen, Homolog)	0,284
317	Hypothetisches Protein sav0824	5,043
318	Hypothetisches Protein YaaF	0,414
319	Hypothetisches Protein sav0841	3,000
322	Hypothetisches Protein sav1077	8,150
324	Pyruvat Dehydrogenase Komplex Untereinheit E2	0,370
325	MnhE (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit)	0,267
326	sa0959 (GTP-bindender Elongationsfaktor, Homolog)	2,320
327	Hypothetisches Protein 30.9 kDa	18,974
329	Hypothetisches Protein sav0966	0,407
331	3-Oxoacyl-Synthase (Hypothetisches Protein sav0984)	0,318
332	Glutamat Racemase	3,142
333	sa0859 (Thimet Oligopeptidase, Homolog)	0,335
335	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	11,569
339	orf122 (Fragment)	0,050
340	Hypothetisches Protein sav0635	10,686
344	Hypothetisches Protein lin0388	0,237
345	30S ribosomales Protein S12	0,148
347	Hypothetisches Protein sav2444	0,335
350	Histidin Protein Kinase	0,114
355	Mevalonat Kinase	3,426
358	Lipophiles Protein	0,464
359	wahrscheinlich: Transkriptionsregulator, MerR Familie	4,424
365	Hypothetisches Protein sav2488	0,482
366	Hypothetisches Protein sav1058	0,210
373	MnhD (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter Untereinheit)	0,258
374	Transposase	23,627
375	Ornithin Aminotransferase	0,208
377	Hypothetisches Protein sav0968	0,098
383	wahrscheinlich: UvrA-ähnliches Protein	0,410
386	LexA	2,944
388	Hypothetisches Protein sav2530	0,103
391	Hypothetisches Protein sav2522	2,429
397	Uridylat Kinase	3,960
398	Hypothetisches Protein sav1409	2,775
399	Sporulationsprotein, Homolog	7,601
400	Konserviertes Hypothetisches Protein sav1417	0,408
403	Glycerolaufnahmesystem	0,282
404	Hypothetisches Protein sav1444	9,907
405	Glutamin Synthetase	0,249
406	Hypothetisches Protein sav1460	0,179
410	Hypothetisches Protein sav1650	4,435

---

412	Hypothetisches Protein sav1665	15,962
414	ATP-abhängige Clp Protease	3,415
415	Acetyl-CoA Carboxylase AccC	2,011
417	Hypothetisches Protein sav2362	5,624
418	Transposase für Insertionselement IS256 in Transposon Tn4001	2,306
419	Alkohol Dehydrogenase, Zink-enthaltend	6,539
420	Hypothetisches Protein sav1706	0,295
422	30S ribosomales Protein S4	8,264
423	Hypothetisches Protein sav1576	2,674
426	mögliche Peptidase (sa1572)	0,391
428	sa1585 (Prolin Dehydrogenase Homolog)	0,318
437	Hypothetisches Protein 33.9 kDa	3,868
438	Hypothetisches Protein sav2360	8,615
440	Tryptophan Synthase alpha-Kette	4,626
442	Hypothetisches Protein sa1220	10,031
443	Glucose-inhibiertes Teilungsprotein Gid	2,325
445	Ribosom release Faktor Rrf	3,528
446	Xylose Kinase	0,356
447	Hypothetisches Protein sav1277	9,689
452	Konserviertes hypothetisches Protein	2,168
455	Homoserin Dehydrogenase	11,446
457	SrrB	3,858
459	Hypothetisches Protein sav1502	2,378
460	Hypothetisches Protein sav2544	4,887
462	Trigger Faktor	2,447
463	Acetyl-CoA Carboxylase	3,015
465	sa1365 (Glycin Dehydrogenase Untereinheit 2 Homolog)	0,350
466	D-Serin/D-Alanin/Glycin Transporter	0,120
472	wahrscheinlich Katabolit Kontrollprotein A	0,212
475	Hypothetisches Protein sav1612	3,614
476	Riboflavin Biosyntheseprotein	16,245
477	Hypothetisches Protein sav2365	0,445
480	Hypothetisches Protein sav1793	2,271
482	Transposase für Insertionselement IS256 in Transposon Tn4001	2,397
484	Hypothetisches Protein sav1353	4,046
485	CfxE (Ribulose-5-Phosphat 3-Epimerase Homolog)	2,934
486	Hypothetisches Protein sav2531	0,090
491	XerC (Rekombinase Homolog)	2,135
493	Phosphatidat Cytidyltransferase	3,219
495	Hypothetisches Protein sav1278	7,786
499	Aerobe Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase	4,834
501	Hypothetisches Protein sav1315	0,119
503	Threonin Synthase	12,294
510	Hmg-CoA Reduktase	2,907
511	Hypothetisches Protein Imo1252	3,331
513	Glycin Dehydrogenase	0,361
515	Hypothetisches Protein sav1555	3,495

---

516	sa1530 (Xaa-Pro Dipeptidase Homolog)	0,296
523	Hypothetisches Protein sav1614	5,837
524	Riboflavin Synthase alpha-Kette	13,384
525	Hypothetisches Protein sav2541	855,230
530	Hypothetisches Protein sav1344	3,012
533	Hypothetisches Protein sav1223	7,153
534	Hypothetisches Protein sav1364	12,764
537	Hypothetisches Protein sav1243	2,041
538	Hypothetisches Protein sav1391	0,448
541	DNA Polymerase III	2,320
542	Dihydrolipoamid Succinyltransferase	0,365
543	Hypothetisches Protein sav1280	5,936
544	RbsK (wahrscheinlich Ribokinase)	0,170
549	sa1155 (Cardiolipin Synthetase Homolog)	0,164
551	Homoserin Kinase	2,855
555	Hypothetisches Protein sav1504	2,134
559	ArgD	3,263
561	Aminomethyltransferase	0,330
563	möglicher ABC Transporter	2,561
564	Alanin Dehydrogenase	0,361
566	Hypothetisches Protein sav1725	0,345
567	Sauerstoff-unabhängige Coproporphyrinogen Oxidase III	17,594
568	Hypothetisches Protein sav1739	2,521
572	Riboflavin-spezifische Deaminase	10,275
577	Uracil Permease	0,387
578	Hypothetisches Protein sav1345	10,168
581	Hypothetisches Protein sav1225	2,325
582	Prephenat Dehydrogenase	23,215
583	Ribonuklease III	6,539
584	Hypothetisches Protein sav1377	20,752
586	sa1224 (ABC Transporter Homolog)	0,307
588	Hypothetisches Protein sav1405	0,267
589	Konserviertes hypothetisches Protein (sav1265)	3,970
590	2-Oxoglutarat Dehydrogenase	0,476
591	Hypothetisches Protein sav2359	7,569
592	Phosphotransferase System	0,386
593	YoqZ	10,429
594	Hypothetisches Protein sav2361	6,027
595	Glutathion Peroxidase	0,268
601	Pseudouridin Synthase B	2,549
603	Glucose-6-Phosphat 1-Dehydrogenase	0,402
604	Porphobilinogen Deaminase	3,179
605	Hypothetisches Protein sav2535	0,149
607	Acetylglutamat Kinase	3,869
609	Hypothetisches Protein sav1541	44,037
611	Hypothetisches Protein sav1557	3,382
614	PTS System, N-Acetylglucosamin-spezifische Komponente	0,450

---

616	sa1562 (DNA Translocase Homolog)	4,293
619	Hypothetisches Protein sav1620	4,066
620	Hypothetisches Protein sav1772	36,248
622	Hypothetisches Protein 30.9 kDa	26,696
625	Aspartat Carbamoyltransferase	0,464
626	Hypothetisches Protein sav1346	3,400
629	Konserviertes hypothetisches Protein	3,027
630	Hypothetisches Protein sav2532	0,066
631	Chromosom Segregationsprotein	4,130
633	Succinyl-CoA Synthetase beta-Kette	0,246
635	AldA (Aldehyd Dehydrogenase Homolog)	0,164
636	Hypothetisches Protein sav1406	0,218
637	Translationsinitiationsfaktor IF-2	5,470
639	Hypothetisches Protein sav2523	0,176
640	Hypothetisches Protein sav1423	0,292
641	Konserviertes hypothetisches Protein (sav1292)	4,779
642	Hypothetisches Protein sav0270	0,104
643	Hypothetisches Protein sav1307	2,018
644	Endonuklease-ähnliches Protein	2,768
646	Nucleosid Diphosphat Kinase	0,478
647	Katalase	0,411
649	Hypothetisches Protein sav1494	3,185
650	DNA Reparaturprotein RadC Homolog	20,652
651	Alpha-D-1,4-Glucosidase	0,167
652	HemX, negative Effektor der HemA Konzentration	4,026
654	Translationsinitiationsfaktor IF-3	3,634
657	Hypothetisches Protein sav1543	25,056
660	Hypothetisches Protein sav1712	0,283
662	Hypothetisches Protein sav1727	0,372
664	sa1566 (Endo-1,4-beta-Glucanase Homolog)	5,476
665	Hypothetisches Protein sav1604	2,785
667	(5-Methylaminomethyl-2-Thiouridylat)-Methyltransferase	3,780
668	Hypothetisches Protein sa1593	4,808
673	Hypothetisches Protein sav2406	2,741
677	ATP-abhängige DNA Helicase RecG	2,973
679	wahrscheinlich: 16 S rRNA prozessierendes Protein	2,619
680	Hypothetisches Protein sav1384	0,151
681	Succinyl-CoA Synthetase	0,272
684	Aminosäure-bindendes Protein	4,376
685	Riboflavin Kinase	6,418
688	Peptid-Methionin-Sulfoxid Reduktase 2, MsrA	0,302
689	Hypothetisches Protein sav1294	4,578
697	Tyrosin Rekombinase XerD	2,611
698	Folylpolyglutamat Synthase	2,024
699	Phosphogluconat Dehydrogenase	0,276
702	Hmg-CoA Synthase	0,186
707	Hypothetisches Protein sav1559/sa1388	4,510

708	Hypothetisches Protein sav1716	8,954
712	Hypothetisches Protein sav1749	18,514
713	Hypothetisches Protein sav1609	8,164
715	sa1450 (Eisen-Schwefel-Cofaktor Syntheseprotein, Homolog)	3,112
716	Oxidoreduktase	0,145
718	S-Adenosylmethionin Synthetase	4,867
719	möglich: 50S ribosomales Protein L21	2,257
721	Dihydroorotase	0,382
727	tRNA (Guanin-1)-Methyltransferase	2,787
728	Hypothetisches Protein sav1385	2,071
729	Hypothetisches Protein sav1249	34,572
732	Hypothetisches Protein sav1408	3,082
733	Polyribonukleotid Nukleotidyltransferase	3,191
734	Hypothetisches Protein 30.9 kda protein	23,450
736	Hypothetisches Protein sav1425	0,396
737	MutS (DNA mismatch repair Protein)	3,066
739	Glutamin Synthetase Repressor	0,257
744	Hypothetisches Protein sav1483	2,836
746	DNA-3-Methyladenin Glycosidase	3,549
748	Hypothetisches Protein sav1673	2,159
749	möglich: Exodeoxyribonuklease VII große Untereinheit	2,494
752	Citrat Synthase II	0,365
755	Hypothetisches Protein sav1560	8,097
756	Hypothetisches Protein sav1717	2,770
760	D-Alanin Aminotransferase	0,371
762	1-Pyrrolin-5-Carboxylat Dehydrogenase	0,043
764	Transposase	5,645
765	GTP Pyrophosphokinase	2,091
768	Signaltransduktionsprotein	0,102
769	Hypothetisches Protein sav1836	0,276
771	Hypothetisches Protein sav1852	5,608
773	Hypothetisches Protein tc0114	0,089
775	Hypothetisches Protein sav1872	3,155
779	Hypothetisches Protein sav1898	3,043
780	Hypothetisches Protein sav2605	1063,591
781	Adenylosuccinat Lyase	3,374
782	Hypothetisches Protein sav2088	4,305
783	Hypothetisches Protein sav1921	0,244
786	Hypothetisches Protein sav2115	4,114
790	Phosphopentomutase	0,446
792	Hypothetisches Protein sav1213	8,270
795	Hypothetisches Protein sav2175	12,559
796	Hypothetisches Protein sav2342	2,036
801	Präprotein Translokase SecY Untereinheit	0,098
802	Transposase für Insertionselement IS257 in Transposon Tn4003	2,490
803	50S ribosomales Protein L16	0,238
805	sa2053 (Glucoseaufnahme Protein Homolog)	0,113

806	möglich: Oxidoreduktase	8,058
808	Hypothetisches Protein sav0188	16,741
813	Hypothetisches Protein sav2310	3,768
815	Hypothetisches Protein sav2320	13,386
817	Hypothetisches Protein sav2560	369,248
819	Sekretorisches Antigen, Vorstufe SsaA	2,973
821	Hypothetisches Protein sav2567	14,240
823	SgtB (Hypothetisches Protein sav1874)	12,861
826	orf122 (Fragment)	0,039
827	Glutamyl-tRNA Amidotransferase Untereinheit b	0,280
829	NAD Synthetase	0,337
831	Hypothetisches Protein sav2588	2,478
833	Hypothetisches Protein sav2031	26,038
836	wahrscheinlich: DNA-gerichtete RNA Polymerase Untereinheit	2,137
840	Hypothetisches Protein sav2144	8,298
841	orf122 (Fragment)	0,044
842	Hypothetisches Protein sav2329	6,409
843	Hypothetisches Protein sav2178	5,874
845	6-Phospho-beta-Galactosidase	0,364
848	Transposase	2,292
849	50S ribosomales Protein L15	0,061
850	Transposase	2,680
851	30S ribosomales Protein S3	0,255
853	Glucose-1-Dehydrogenase	0,390
858	PTS System, Sucrose-spezifische Komponente	2,547
859	Hypothetisches Protein sav2614	30,498
861	Hypothetisches Protein sav2311	16,271
865	sa1655 (ABC Transporte Homolog)	0,236
869	orf122 (Fragment)	0,045
871	Hypothetisches Protein sav1875/sa1692/mw1815	2,495
872	Alpha-Keto-beta-Hydroxylacil Reduktoisomerase	4,029
873	Hypothetisches Protein sav1891	0,498
874	Hypothetisches Protein sav2062	9,014
875	Glutamyl-tRNA Amidotransferase Untereinheit a	0,175
877	D-Serin/D-Alanin/Glycin Transporter	5,833
878	Hypothetisches Protein sav2097	18,619
881	SdrH	11,962
884	Hypothetisches Protein sav2129	2,493
886	sa2399 (Fructosebisphosphat Aldolase Homolog)	0,486
888	Hypothetisches Protein ma4202	4,560
890	Hypothetisches Protein sav2334	4,400
893	PTS System, Lactose-spezifische Komponente	0,322
894	Transposase	2,549
897	30S ribosomales Protein S5	0,079
899	Hypothetisches Protein sav0102	7,057
901	Hypothetisches Protein sav2258	2,779
902	Hypothetisches Protein	5,133

---

905	Hypothetisches Protein sav2283	0,344
906	Acetoin(diacetyl) Reductase	2,637
907	Sekretorisches Antigen, Vorstufe SsaA	2,958
908	Hypothetisches Protein sa2168	10,037
909	Hypothetisches Protein sav2312	2,190
910	Hypothetisches Protein sav2654	0,285
912	Lipase Vorstufe	0,402
913	Hypothetisches Protein sav1847	7,821
914	Hypothetisches Protein sav2206	0,446
917	Eisenaufnahme Regulator, Homolog	6,998
919	Hypothetisches Protein sav1877	5,096
921	Hypothetisches Protein sav1892	0,461
922	Hypothetisches Protein sav2063	7,784
923	Prolin Permease	9,346
924	Hypothetisches Protein sav2081	3,780
925	sa1729 (Nicotinat Phosphoribosyltransferase, Homolog)	0,334
927	Hypothetisches Protein sav1925	6,719
928	ATP Synthase alpha-Kette	0,445
932	Hypothetisches Protein sav2130	6,384
935	Transposase für Insertionselement IS256 in Transposon Tn4001	2,373
936	Hypothetisches Protein sav2152	0,166
939	Hypothetisches Protein sav2179	63,259
942	Sulfat Adenylyltransferase	4,949
947	30S ribosomales Protein S19	0,271
955	Hypothetisches Protein sav2301	2,658
958	Hypothetisches Protein sav0140	2,263
959	Hypothetisches Protein sav2324	3,388
961	sa1666 (Zweikomponenten response Regulator Homolog)	7,754
962	Alpha-Acetylactat Synthase	0,254
963	Glutamat ABC Transporter	17,530
964	Wahrscheinlich: Cystein Protease Inhibitor	0,257
965	Glutamat-1-Semialdehyd Aminotransferase	0,393
968	3-Isopropylmalat Dehydrogenase	4,143
970	SigB	2,516
971	Hypothetisches Protein sav2570	3,948
973	Hypothetisches Protein sav1915	5,556
976	UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase	0,475
978	Hypothetisches Protein sav2122	0,448
982	Purin Nukleosid Phosphorylase	2,982
984	Glucosamin-Fructose-6-Phosphat Aminotransferase	0,065
985	Hypothetisches Protein sa1972	27,169
986	Hypothetisches Protein sav2336	3,462
987	Hypothetisches Protein sav2180	27,520
993	50S ribosomales Protein L18	0,104
994	Hypothetisches Protein sav2371	0,495
995	50S ribosomales Protein L2	0,168
996	Hypothetisches Protein sav2373	0,354

---

998	Transposase für Insertionselement IS257 in Transposon Tn4003	2,599
1001	Urease Untereinheit beta	0,213
1002	PTS System, Sucrose-spezifische Komponente	3,517
1003	Hypothetisches Protein sav2302	2,565
1006	Hypothetisches Protein sav0142	3,427
1007	Transposase	20,261
1009	sa1667 (Zweikomponenten Sensor Histidin Kinase Homolog)	12,758
1011	Hypothetisches Protein sav1858	4,745
1013	sa1683 (ABC Transporter Homolog)	10,027
1016	3-Isopropylmalat Dehydratase, große Untereinheit	9,196
1017	Hypothetisches Protein sav1894	5,926
1024	Uracil Phosphoribosyltransferase	0,378
1025	sa2156 (L-Lactat Permease LctP Homolog)	0,363
1026	Hypothetisches Protein 30.9 kda protein	27,940
1030	Generelles Stress Protein 20U	4,433
1031	Hypothetisches Protein savp027	4,369
1034	Anaerobe Ribonukleotid Reduktase, große Untereinheit	3,465
1035	Hypothetisches Protein sav2181	7,880
1039	30S ribosomales Protein S11	0,162
1041	50S ribosomales Protein L6	0,099
1043	50S ribosomales Protein L4	0,283
1044	Na <sup>+</sup> /Myoinositol CoTransporter	9,543
1049	Urease	0,479
1050	Hypothetisches Protein sav2643	0,477
1057	Hypothetisches Protein sav1850	3,995
1058	L-Lactat Dehydrogenase 2	0,194
1059	Hypothetisches Protein sav1859	0,338
1060	YomG	0,147
1063	Hypothetisches Protein sav1883	2,225
1064	Threonin Dehydratase	8,977
1068	Hypothetisches Protein sav2084	2,801
1069	sa1734 (Pyrazinamidase/Nicotinamidase Homolog)	0,365
1071	Hypothetisches Protein sav1932	2,173
1072	Serin Hydroxymethyltransferase	0,366
1076	Autoinducer-2 Produktionsprotein LuxS	5,161
1077	3-Methyl-2-Oxobutanoat Hydroxymethyltransferase	0,203
1078	Hypothetisches Protein sav2141	2,083
1079	möglich: Transposase	2,712
1080	Hypothetisches Protein 30.1 kDa	0,463
1081	Konserviertes hypothetisches Protein (sav2172)	6,726
1082	Hypothetisches Protein sav2338	2,678
1083	Hypothetisches Protein sav2186	0,477
1084	wahrscheinlich: Adenylylsulfat Kinase	4,496
1087	30S ribosomales Protein S13	0,169
1089	30S ribosomales Protein S8	0,096
1091	50S ribosomales Protein L3	0,314
1092	Hypothetisches Protein sav2623	6,129

1093	Hypothetisches Protein sav2265	4,092
1094	Hypothetisches Protein sav2376	3,111
1096	Hypothetisches Protein sav2636	3,356
1097	Urease accessory Protein UreE	0,372
1099	Hypothetisches Protein sav2305	0,181
1103	Hypothetisches Protein sav2659	3,638
1105	Fumarat Hydratase	0,499
1107	Extrazelluläre Serin Proteinase, Vorstufe (Fragment )	6,648
1108	Holin Protein	2,256
1109	Hypothetisches Protein sav1869	2,694
1110	Hypothetisches Protein sav2050	0,497
1112	Hypothetisches Protein tc0114	0,086
1113	sa1713 (RNA Methyltransferase Homolog)	8,705
1117	Mangan-abhängige anorganische Pyrophosphatase	0,467
1119	Hypothetisches Protein sav1936	3,084
1120	Hypothetisches Protein sav2114	0,278
1122	Fructose-Bisphosphat Aldolase	0,201
1123	TcaA	2,809
1124	Hypothetisches Protein sav2135	0,291
1125	Transposas (is257 transposase)	2,613
1126	Hypothetisches Protein sa1945	3,092
1127	möglich: Einzelstrang-DNA-spezifische Endonuklease	4,775
1128	Hypothetisches Protein tc0114	0,088
1129	Konserviertes hypothetisches Protein (sav2174)	20,041
1131	sa1989 (Quinon Oxidoreductase)	0,451
1135	Adenylat Kinase	0,172
1137	50S ribosomales Protein L5	0,110
1139	Hypothetisches Protein sav2253	3,255
1141	Hypothetisches Protein sav2266	6,953
1147	Hypothetisches Protein sav2306	3,281
1150	Hypothetisches Protein sa0140	0,347
1151	Hypothetisches Protein sav2616	95,798
1155	Drp35	0,394
1159	Hypothetisches Protein sav2166	2,710
1161	Hypothetisches Protein sav1170	0,350
1162	Transposase für Insertionselement IS431	2,492
1164	Replikative DNA Helicase	3,476
1166	DNA Gyrase Untereinheit A	2,268
1171	Hypothetisches Protein sav2395	0,352
1172	sa2202 (möglich: Aminosäure ABC Transporter)	0,423
1174	Einzelstrang-DNA-bindendes Protein des Phagen phi pvl	2,792
1176	Hypothetisches Protein sav0385	6,636
1177	NADH Dehydrogenase Untereinheit 5	0,137
1180	MnhC (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit)	0,298
1182	Hypothetisches Protein sav2508	6,912
1183	Hypothetisches Protein sav0600	0,382
1185	Hypothetisches Protein sav0619	10,423

1187	Teichonsäure Biosynthese Protein	5,693
1188	Autolysin AtlE und möglicher Transkriptionsregulator AtlR	0,239
1190	Hypothetisches Protein sav1081	2,509
1191	Hypothetisches Protein sav0691	6,621
1192	PotB (Spermidin/Putrescin ABC Transporter Homolog)	4,132
1194	Hypothetisches Protein sav1141	7,643
1195	Homolog zu comforf1 in <i>Bacillus subtilis</i>	177,223
1196	sa0620 (Sekretorisches Antigen SsaA Homolog)	12,199
1197	sa0734 (Carboxyesterase Vorstufe, Homolog )	5,311
1198	Signal recognition particle	3,041
1199	Hypothetisches Protein sav0819	15,957
1200	30S ribosomales Protein S15	7,798
1203	Konserviertes hypothetisches Protein (sav2689)	5,739
1207	Hypothetisches Protein sav0652	0,497
1217	Hypothetisches Protein sav2350	0,425
1218	ABC Transporter VraE	9,023
1222	Hypothetisches Protein sav0376	4,980
1224	Hypothetisches Protein sa0371	11,142
1228	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit	0,282
1234	sa0884 (Lipoat-Protein Ligase Homolog)	0,187
1235	TagD (Teichonsäure Biosynthese Protein D)	0,399
1236	Autolysin AtlE und möglicher Transkriptionsregulator AtlR	0,168
1238	Hypothetisches Protein	2,598
1241	Hypothetisches Protein sav0727	0,109
1242	Thioredoxin	0,167
1243	Hypothetisches Protein sav0751	36,569
1244	Hypothetisches Protein sav1207	2,211
1246	Hypothetisches Protein sav1236	2,748
1247	Hypothetisches Protein sav0822	4,164
1255	Hypothetisches Protein sav0651	0,485
1258	Hypothetisches Protein sav2409	2,659
1266	ATP-bindendes Protein (ABC Transporter, VraD)	3,956
1267	Hypothetisches Protein lmo0828	3,378
1270	Hypothetisches Protein sav0377	2,560
1273	CysK (Cystein Synthase Homolog)	0,344
1275	50S ribosomales Protein L7/L12	2,412
1276	Hypothetisches Protein 32.7 kDa	2,249
1277	Hypothetisches Protein 14.2 kDa	10,604
1278	Oligopeptid Transport System Permease	371,948
1284	Hypothetisches Protein sav1061	0,079
1285	Hypothetisches Protein sav0240	0,115
1287	Hypothetisches Protein sav0703	2,834
1290	Succinat Dehydrogenase Cytochrom b-558	0,489
1293	Hypothetisches Protein sav1801	3,116
1294	Ffh Protein (Signal recognition particle Homolog)	2,002
1295	Hypothetisches Protein sav0823	4,995
1296	Hypothetisches Protein sav1286	6,667

---

1299	Immunodominantes Antigen B	0,352
1301	wahrscheinlich: Metabolit Transportprotein CsbC	0,226
1302	Konserviertes hypothetisches Protein (sav2402)	4,000
1307	Hypothetisches Protein sav0186	0,179
1309	Opp-1a (OligopeptidTransporter)	6,013
1310	DNA Gyrase Untereinheit B	2,721
1312	Hypothetisches Protein sav2707	6,231
1313	Serin Proteinase Homolog	99,945
1318	Alkylhydroperoxid Reduktase Untereinheit F	0,183
1322	Hypothetisches Protein sav0927	24,330
1323	möglich: ribosomales Protein L7	0,203
1324	Argininosuccinat Lyase (AsaL)	26,863
1326	Hypothetisches Protein sav0987	88,284
1332	Hypothetisches Protein sav1067	0,451
1333	Hypothetisches Protein sav0671	0,449
1334	sa0937 (Cytochrom D Ubiquinol Oxidase Untereinheit 1 Homolog)	32,622
1335	Hypothetisches Protein sav0704	2,388
1336	Hypothetisches Protein sav1112	2,476
1337	Lipoprotein, ähnlich Ferrichrom ABC Transporter	2,792
1338	MraZ	0,373
1341	Hypothetisches Protein	12,335
1342	Hypothetisches Protein sa1085	2,314
1344	Hypothetisches Protein sav1288	7,910
1345	Transkriptionsregulator LrpC	7,693
1347	Acetoindehydrogenase E2 Komponente	0,125
1349	Transkriptionsregulator	0,463
1353	OpuCB (Glycin/Betain/Carnitin/Cholin ABC Transporter)	2,320
1355	Hypothetisches Protein sa1814	57,605
1356	Hypothetisches Protein sav0012	2,647
1357	Hypothetisches Protein sav2468	506,642
1358	DNA Replikations- und Reparaturprotein RecF	4,018
1360	Hypothetisches Protein sav2706	7,170
1361	Hypothetisches Protein sav0225	3,613
1363	Nitrat Reduktase beta-Kette NarH	0,441
1366	Alkylhydroperoxid Reduktase Untereinheit C	0,162
1370	D-Alanyl Trägerprotein (Dcp)	0,175
1374	Hypothetisches Protein sav0998	2,813
1376	TcaR (Transkriptionsregulator)	2,261
1379	Hypothetisches Protein sa0610	5,583
1380	Phosphoribosyl-Formyl-Glycinamidin Synthase II	0,436
1381	Hypothetisches Protein sav0674	0,334
1382	Hypothetisches Protein sav1088	4,326
1383	Response Regulator	0,065
1384	Hypothetisches Protein sav2513	0,303
1385	Hypothetisches Protein sav0740	3,734
1387	ATP-abhängige Clp Protease	0,354
1389	Hypothetisches Protein sav0168	6,448

---

1390	Undecaprenyl-Pyrophosphatase/Synthetase	4,877
1391	Hypothetisches Protein sav0831	2,728
1395	Acetoindehydrogenase E1 Komponente	0,103
1397	Hypothetisches Protein sav0180	2,932
1400	Hypothetisches Protein sav2405	2,697
1401	OpuCA (Glycin/Betain/Carnitin/Cholin ABC Transporter)	2,250
1406	DNA Polymerase III, beta-Kette	3,582
1408	Hypothetisches Protein sav0198	2,471
1410	sa0342 (Acetyl-CoA C-Acetyltransferase Homolog)	0,222
1411	Hypothetisches Protein sav0089	2,535
1414	sa2204 (Phosphoglycerat Mutase)	0,343
1418	möglich: Exoprotein DltD	0,231
1421	Mevalonat Diphosphat Decarboxylase	4,138
1422	Hypothetisches Protein sav0999	81,152
1424	möglich: is605/is200-ähnliche Transposase	6,891
1429	Hypothetisches Protein sav0678	2,078
1430	Peptid Deformylase	0,395
1431	Hypothetisches Protein sav0708	0,066
1433	Hypothetisches Protein sav0741	5,329
1435	TcaA	3,298
1437	Hypothetisches Protein sav0817	144,906
1438	Hypothetische Zink-Metalloprotease sav1262/sa1105	2,384
1440	Hypothetisches Protein sav1291	6,203
1441	Hypothetisches Protein sav2682	113,635
1443	TPP-abhängige Acetoin Dehydrogenase E1 alpha-Untereinheit	0,096
1452	Seryl-tRNA Synthetase (SerRS)	0,088
1454	Chromosomales Replikationsinitiationsprotein DnaA	5,373
1456	Hypothetisches Protein sav0199	4,260
1459	Nitrat Reduktase alpha-Kette	0,450
1465	Hypothetisches Protein sav0520	0,328
1468	Hypothetisches Protein sav0969	0,203
1469	Hypothetisches Protein sav0593	17,404
1471	staphylococcal accessory regulator A Homolog	0,451
1472	Hypothetisches Protein sav1012	16,381
1475	Hypothetisches Protein sav0658	2,509
1476	Hypothetisches Protein sav1076	11,992
1478	Hypothetisches Protein sav1092	4,928
1481	Hypothetisches Protein sav0742	2,016
1482	wahrscheinlich: YlmG	0,303
1484	Hypothetisches Protein sav2521	4,297
1485	Hypothetisches Protein sav0818	5,756
1486	Prolin-tRNA Ligase	4,490
1487	Hypothetisches Protein sav0839	5,669
1488	Hypothetisches Protein sav1293	6,687
1489	Hypothetisches Protein sav2687	0,214
1491	Dihydrolipoamid Dehydrogenase	0,093
1495	Ornithin Carbamoyltransferase	0,335

---

1498	Adenylosuccinat Synthetase	3,027
1502	Ribonuklease P Komponente	5,375
1504	Lipase Vorstufe	1720,097
1508	Lysin	8,497
1510	Hypothetisches Protein sav0383	3,712
1514	MnhG (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit)	0,329
1515	Hypothetisches Protein sav0565	0,428
1516	Hypothetisches Protein sav0971	0,290
1518	Unbekanntes Protein	7,786
1520	Hypothetisches Protein sav1016	2,843
1523	Hypothetisches Protein sav2451	3,096
1525	Hypothetisches Protein 17.0 kDa	3,847
1526	Pyruvat Dehydrogenase E1 Komponente alpha-Untereinheit	0,437
1531	SecG (mögliches Proteinexport Membranprotein)	5,455
1532	Proteinkinase	6,018
1533	Hypothetisches Protein sav2480	0,368
1534	Hypothetisches Protein sav1268	2,553
1538	Alkaline Phosphatase Synthese Sensor Protein	13,069
1540	Hypothetisches Protein sav1721	0,154
1543	möglich: Ribose Permease	0,099
1544	Hypothetisches Protein sav1779	51,025
1547	Hypothetisches Protein sav1514	0,306
1548	Hypothetisches Protein sav1844	2,290
1549	Hypothetisches Protein sav1539	11,527
1550	Hypothetisches Protein sav1873	4,589
1551	DNA Primase	2,918
1554	Hypothetisches Protein sav1934	2,960
1555	Hypothetisches Protein sav1607	5,554
1557	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase	2,231
1558	orf 140	0,417
1559	Hypothetisches Protein sav1648	2,035
1562	Hypothetisches Protein sav1487	6,935
1563	Hypothetisches Protein sav2089	13,838
1564	IcaR	3,618
1565	Hypothetisches Protein sav2110	0,381
1566	Glycin/Betain Transporter	19,173
1569	Hypothetisches Protein sav0165	5,033
1572	wahrscheinlich: NirD	0,198
1573	30S ribosomales Protein S17	0,150
1579	Hypothetisches Protein sav2307	3,859
1582	Hypothetisches Protein sav0003	3,891
1584	30S ribosomales Protein S6	3,109
1585	Hypothetisches Protein sav0888	3,962
1586	Alkaline Phosphatase Synthese Transkriptionsregulator Protein	3,940
1588	Hypothetisches Protein sav1722	0,340
1592	Hypothetisches Protein sav1781	0,326
1593	DNA-bindendes Protein II	0,124

---

1595	IspA (Geranyltransferase Homolog)	2,849
1596	Hypothetisches Protein sav1845	6,482
1598	Hypothetisches Protein sas054	6,372
1601	Hypothetisches Protein sav1587	2,539
1603	Hypothetisches Protein sav1608	12,289
1610	Hypothetisches Protein sav1489	8,411
1612	wahrscheinlich: IcaD	2,079
1613	Hypothetisches Protein sav2116	3,722
1617	Hypothetisches Protein sav2176	12,018
1618	Hypothetisches Protein sav2477	6,545
1620	Hypothetisches Protein 41.4 kda protein	0,041
1621	wahrscheinlich: 50S ribosomales Protein L29	0,228
1623	Hypothetisches Protein sav2267	3,749
1627	Hypothetisches Protein sav2370	0,438
1629	wahrscheinlich: Hypothetisches Protein 21.1 kDa	3,444
1630	Hypothetisches Protein sav2709	2,008
1632	wahrscheinlich: 30S ribosomales Protein S18	4,081
1633	Hypothetisches Protein cpe1260	0,256
1636	Hypothetisches Protein sav1728	0,142
1638	sa1580 (multidrug Resistenz Protein Homolog)	3,238
1640	Hypothetisches Protein sav1783	5,585
1641	30S ribosomales Protein S1	0,408
1642	möglich: Cadmium-bindendes Protein	0,298
1643	NusB	2,695
1644	Hypothetisches Protein sav1846	25,524
1645	Hypothetisches Protein sav1544	18,300
1646	Aminopeptidase AmpS	0,318
1649	Hypothetisches Protein sav1588	11,192
1650	AgrB	0,483
1651	Uridin Kinase	2,657
1653	Protein-Export Membran Protein SecDF	0,492
1663	Lytisches Regulationsprotein flankiert von Tn554	0,475
1665	Hypothetisches Protein sav2177	0,440
1667	Hypothetisches Protein sav2220	0,463
1669	50S ribosomales Protein L22	0,351
1673	Hypothetisches Protein sav2296	2,511
1679	Hypothetisches Protein lin2168	4,103
1684	sa1563 (Phenylalanyl-tRNA Synthetase Homolog)	6,080
1687	Hypothetisches Protein sav1451	4,771
1688	Hypothetisches Protein sav1784	4,677
1690	Hit-ähnliches Protein, beteiligt an Regulation des Zellzyklus	0,206
1694	Hypothetisches Protein sav1882	0,385
1697	Hypothetisches Protein sav1590	13,195
1698	Response Regulator	2,386
1699	Hypothetisches Protein sav1613	5,802
1708	IcaC	2,321
1709	50S ribosomales Protein L31 Typ B	0,324

---

1710	Hypothetisches Protein sav2696	0,486
1714	Hypothetisches Protein all1509	3,580
1717	50S ribosomales Protein L23	0,240
1723	Hypothetisches Protein sav2319	139,219
1724	Hypothetisches Protein 9.3 kDa	3,804
1726	möglich: Zell-Oberflächenadhesin SdrF	6,714
1728	Hypothetisches Protein YrhP	3,284
1729	Hypothetisches Protein sav1325	0,364
1732	Hypothetisches Protein sav1743	4,759
1734	sa1584 (Lysophospholipase Homolog)	2,655
1736	Hypothetisches Protein sav1789	4,998
1737	Ferredoxin	2,728
1740	Hypothetisches Protein sav1867	10,005
1744	orf133	7,052
1747	Hypothetisches Protein sav1615	7,947
1749	Hypothetisches Protein sav2542	3,009
1751	50S ribosomales Protein L20	6,946
1754	Hypothetisches Protein sav2658	0,473
1765	30S ribosomales Protein S10	0,309
1771	Hypothetisches Protein sav2337	3,486
1774	Hypothetisches Protein sav0351	7,213
1778	Hypothetisches Protein sav1714	3,090
1781	CtpA (wahrscheinlich: Carboxy-terminal prozessierende Proteinase)	3,854
1784	O-Succinylbenzoesäure Synthetase	2,407
1785	Hypothetisches Protein sav1495	4,016
1786	Hypothetisches Protein sav1840	3,239
1787	Hypothetisches Protein sav1534	2,819
1788	Hypothetisches Protein sav1868	13,345
1791	Hypothetisches Protein sav1577	3,282
1795	Hypothetisches Protein sav1617	4,784
1800	Hypothetisches Protein sav2542	2,512
1803	Hypothetisches Protein sav2096	7,922
1805	Hypothetisches Protein sav2131	2,360
1806	Hypothetisches Protein sav2386	0,071
1809	Hypothetisches Protein sav0323	0,410
1811	50S ribosomales Protein L17	0,205
1813	Hypothetisches Protein sav2252	0,310
1816	Hypothetisches Protein sav0068	5,481
1818	Hypothetisches Protein sav2403	2,879
1820	Hypothetisches Protein sav2410	2,861
1821	Hypothetisches Protein sav2622	3,070
1822	Hypothetisches Protein sav0350	10,859
1826	wahrscheinlich: Thiamin Biosynthese Protein ThiI	4,474
1828	wahrscheinlich: sa1565 (Thioredoxin Homolog)	4,077
1830	Hypothetisches Protein sav1777	8,150
1833	Hypothetisches Protein sav1496	2962,604
1834	PrsA (Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase)	0,276

---

1837	Eisenaufnahme Regulationsprotein	2,712
1838	DNA Polymerase IV	7,420
1840	Hypothetisches Protein sav1929	8,747
1843	Alanyl-tRNA Synthetase	16,895
1844	Pantoat beta-Alanine Ligase	0,315
1845	wahrscheinlich: 50S ribosomales Protein L27	2,232
1847	Threonyl-tRNA Synthetase ThrRS	0,414
1857	Hypothetisches Protein sav2188	7,232
1859	Translationsinitiationsfactor IF-1	0,198
1863	Hypothetisches Protein sav2287	28,128
1864	Transposase	7,347
1865	Hypothetisches Protein YkkC	2,204
1871	is605/is200-ähnliche Transposase	1301,409
1874	Hypothetisches Protein sav1718	0,268
1876	sa1575	0,439
1877	Hypothetisches Protein sav0308	2,551
1881	Eisenaufnahme Regulationsprotein	2,469
1883	Hypothetisches Protein sav1538	0,483
1884	Hypothetisches Protein sav1871	2,899
1885	Hypothetisches Protein sav1558	3,961
1886	Glutamyl-tRNA Amidotransferase Untereinheit C	0,205
1889	Hypothetisches Protein sav1605	3,186
1891	Hypothetisches Protein sav1619	10,850
1893	Hypothetisches Protein sav1646	2,378
1898	YfhI	2,493
1901	Hypothetisches Protein sav2142	3,774
1907	wahrscheinlich: 30S ribosomales Protein S14-1	0,124
1911	wahrscheinlich: Urease gamma Untereinheit	0,224
1912	Transposase	3,346
1919	Hypothetisches Protein sav2631	2,811
1922	Hypothetisches Protein sav0565	17,244
1924	Hypothetisches Protein sav0489	13,418
1925	Hypothetisches Protein sav0678	2,109
1929	Hypothetisches Protein 32.7 kDa	2,186
1930	CadX	4,824
1931	Hypothetisches Protein sav0466	6,015
1940	wahrscheinlich: 50S ribosomales Protein L29	0,227
1942	Integrase-ähnliches Protein	3,112
1943	Hypothetisches Protein sav0466	4,229
1947	möglich: NrdH-Redoxin	14,195
1948	Hypothetisches Protein sav1404	0,262
1950	Hypothetisches Protein sav2142	2,727
1953	Hypothetischer Transcriptionsregulator in <i>lacR</i> 5' Region (Fragment)	61,492
1956	Hypothetisches Protein 32.7 kDa	2,513
1957	50S ribosomales Protein L28	2,330
1958	Hypothetisches Protein sav1638	2,489
1959	Hypothetisches Protein sav2044	2,047

1960	Hypothetisches Protein sav2260	3,321
1963	Hypothetisches Protein sav0467	5,332
1964	orf122 (Fragment)	0,040
1965	Hypothetisches Protein sav0491	2,249
1967	Hypothetisches Protein sa0941	2,833
1970	SmrB	3,873
1971	Hypothetisches Protein sav2349	0,424
1972	Cystathionin gamma-Synthase	19,413
1974	wahrscheinlich: DNA Polymerase III delta'-Untereinheit	6,412
1977	Konserviertes hypothetisches Protein (sav1267)	2,898
1978	Hypothetisches Protein sav2543	0,128
1983	Hypothetisches Protein sav0469	11,399
1985	Hypothetisches Protein sav0492	8,202
1987	Hypothetisches Protein pa0380	2,307
1993	Transposase für Insertionselement IS256 in Transposon Tn4001	2,315
1994	Hypothetisches Protein sav0485	8,777
1995	Peptidyl-tRNA Hydrolase	2,482
1996	Transposase	7,727
1997	Hypothetisches Protein sav1287	26,281
1998	50S ribosomales Protein L35	3,959
2002	Hypothetisches Protein sav0456	2,691
2003	Hypothetisches Protein sav0470	8,762
2005	KsgA	6,376
2007	Hypothetisches Protein sav1097	82,510
2009	Hypothetisches Protein sav1880	0,419
2011	Hypothetisches Protein sav0068	134,820
2013	Hypothetisches Protein sav0477	20,507
2014	Hypothetisches Protein sav0486	17,933
2015	Hypothetisches Protein sas016 (VraX)	0,263
2016	Hypothetisches Protein lmo1978	8,159
2017	Hypothetisches Protein sav1316	0,046
2020	Hypothetisches Protein sav2313	5,690
2021	möglich: Ribosomales Protein L34	10,260
2023	Transkriptionsaktivator des Glutamat Synthase Operons	11,226
2024	Hypothetisches Protein tc0114	0,089
2025	wahrscheinlich: Veg	9,693
2027	Hypothetisches Protein sav1110	0,258
2028	Hypothetisches Protein sav1451	5,911
2033	DNA Polymerase III gamma und tau Untereinheiten	4,027
2035	Hypothetisches Protein sav0618	5,462
2037	30S ribosomales Protein S14-2	5,421
2038	Hypothetisches Protein sav1746	232,664
2040	Hypothetisches Protein sav2319	5,120
2042	Hypothetisches Protein sav0457	3,265
2043	wahrscheinlich: Glutamat Synthase	16,093
2046	Hypothetisches Protein sav0822	4,482
2047	wahrscheinlich: 50S ribosomales Protein L32	4,444

---

2048	DNA-bindendes Protein II	0,142
2049	orf133 (hypothetisches Protein sa1738)	13,559
2050	Translationsinitiationsfaktor IF-1	0,186
2054	Hypothetisches Protein 28.1 kDa	26,584
2056	Potentielle DNA-Invertase Bin3 des Transposons Tn552	71,672
2062	Hypothetisches Protein sav0458	2,239
2065	YabJ	2,596
2066	Hypothetisches Protein sav0823	4,890
2067	Hypothetisches Protein sav1141	7,303
2068	Ferredoxin	5,483
2070	wahrscheinlich: 30S ribosomales Protein S14-1	0,114
2071	Hypothetisches Protein sav0068	9,519
2072	Hypothetisches Protein sa0423	7,219
2074	Hypothetisches Protein sav0488	18,913
2076	Hypothetisches Protein sav1029	0,204
STEP_1222	Riboflavin Synthase alpha-Kette	12,665
STEP_138	Alkoholdehydrogenase I	0,362
STEP_2146	DNA Gyrase Untereinheit A	2,161
STEP_2149	DNA Gyrase Untereinheit B	2,681
STEP_321	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	0,232
STEP_42	Glutamyl-tRNA Synthetase (GluRS)	2,536
STEP_99	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	11,434

---

**Tabelle A5:** Deregulierte Gene von *S. epidermidis* 567 nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK MT02

id	Beschreibung	x-fache Änderung
9	Transkriptionsantiterminationsprotein NusG	0,437
13	IlvE (Aminosäure Aminotransferase Homolog)	0,286
16	Hypothetisches Protein sav0707	0,124
18	Hypothetisches Protein sav0719	2,013
23	Hypothetisches Protein alr1286	0,358
32	Quinol Oxidase Polypeptid III QoxC	0,389
51	Dihydropteroat Synthase Dhps	0,460
57	RplK	3,545
62	Hypothetisches Protein sav0698	0,459
71	Uncharakterisiertes konserviertes Protein	0,378
80	Quinol Oxidase Polypeptid I QoxB	0,385
100	Acetylaceton Reduktase	0,356
105	50 S ribosomales Protein L1	3,193
113	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	3,100
135	sa0815 (Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase Homolog)	0,345
136	Pyruvat Carboxylase	0,472
141	Hydrolase	2,115
153	50 S ribosomales Protein L10	2,483
164	Hypothetisches Protein sav0728	0,392
171	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	0,382
180	Glycin Oxidase	2,047
186	Hypothetisches Protein sav1127	2,654
188	Excinuklease ABC Untereinheit C	5,601
201	Hypothetisches Protein sav0541	2,814
203	Hypothetisches Protein sav0549	0,402
212	Hypothetisches Protein sav0729	0,413
248	sa0620 (Sekretorisches Antigen SsaA Homolog)	0,339
249	DNA-gerichtete RNA Polymerase beta-Kette	2,846
252	Hypothetisches Protein sav0690	0,480
257	wahrscheinlich: Holin-ähnliches Protein LrgA	0,488
259	LrgB	0,491
267	Phosphoglycerat Kinase	0,355
272	Hypothetisches Protein sav2512	0,196
282	Phe-tRNA Synthetase alpha-Kette	0,454
286	Zellteilungsprotein	0,483
293	Hypothetisches Protein sav0524	2,307
297	DNA-gerichtete RNA-Polymerase beta'-Kette (Fragment)	2,812
313	Polyphosphat Kinase	0,416
314	sa0878 (Resistenzprotein toxische Anionen, Homolog)	0,408
315	Triosephosphat Isomerase	0,480
323	Hypothetisches Protein sav0938	0,444
340	Hypothetisches Protein sav0635	2,419

341	Negativer Regulator der genetischen Kompetenz ClpC/MecB	2,087
350	Histidin Proteinkinase	0,151
360	Exopolyphosphatase	0,402
363	2,3-Diphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat Mutase	0,462
366	Isoleucyl-tRNA Synthetase IleRS	0,353
377	Hypothetisches Protein sav0968	0,421
386	LexA	3,853
398	Hypothetisches Protein sav1409	2,065
404	Hypothetisches Protein sav1444	2,143
406	Hypothetisches Protein sav1460	2,643
409	Hypothetisches Protein sav1485	5,985
410	Hypothetisches Protein sav1650	2,178
413	Alpha-Ketosäure Dehydrogenase E2	2,851
415	Acetyl-CoA Carboxylase (Biotincarboxylase Untereinheit) AccC	2,268
422	30 S ribosomales Protein S4	2,107
432	Kupfer-transportierende ATPase CopA	2,478
461	Alpha-Ketosäure Dehydrogenase E1	2,808
463	Acetyl-CoA Carboxylase Biotin Carboxyl Carrier Untereinheit	2,056
466	D-Serin/D-Alanin/Glycin Transporter	0,235
476	Riboflavin Biosynthese Protein	26,773
496	Hypothetisches Protein sav1419	0,424
501	Hypothetisches Protein sav1315	0,402
507	Hypothetisches Protein sav1503	0,320
509	Alpha-Ketosäure Dehydrogenase E1	2,979
513	Glycin Dehydrogenase Untereinheit 1	0,479
524	Riboflavin Synthase alpha-Kette	25,621
534	Hypothetisches Protein sav1364	3,790
538	Hypothetisches Protein sav1391	0,498
539	ATP-abhängige Protease HslV	0,385
542	Dihydrolipoamid Succinyltransferase	0,303
557	Dihydrolipoamid Dehydrogenase	3,020
561	Aminomethyltransferase	0,455
572	Riboflavin-spezifische Deaminase	15,645
577	Uracil Permease	0,228
578	Hypothetisches Protein sav1345	3,956
582	Prephenat Dehydrogenase	2,168
590	2-Oxoglutarat Dehydrogenase E1	0,307
597	Hypothetisches Protein sav1320	0,449
605	Hypothetisches Protein sav2535	2,466
618	Leucyl-tRNA Synthetase LeuRS	0,355
626	Hypothetisches Protein sav1346	3,445
634	Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase	0,473
635	AldA (Aldehyd Dehydrogenase Homolog)	2,067
644	Endonuclease-ähnliches Protein	2,025
650	RadC (DNA Reparaturprotein Homolog)	2,784
653	DNA Reparaturprotein	2,424
673	Hypothetisches Protein sav2406	0,367

---

674	Glycin/Betain Transporter	0,499
680	Hypothetisches Protein sav1384	0,499
695	Hypothetisches Protein sav1337	2,228
698	Folylpolyglutamat Synthase	0,431
701	Arginin Repressor	2,042
712	Hypothetisches Protein sav1749	2,071
718	S-Adenosylmethionin Synthetase	2,560
724	FmtC	0,289
729	Hypothetisches Protein sav1249	2,871
732	Hypothetisches Protein sav1408	2,168
743	Hypothetisches Protein sav1338	2,829
762	1-Pyrrolin-5-Carboxylat Dehydrogenase	0,334
777	Hypothetisches Protein YvqF	3,667
803	50 S ribosomales Protein L16	2,097
814	Hypothetisches Protein sav2651	2,101
831	Hypothetisches Protein sav2588	0,459
855	Molybdän Cofaktor Biosyntheseprotein A	2,737
863	Hypothetisches Protein sav2322	2,929
895	tRNA Pseudouridin Synthase A	0,398
899	Hypothetisches Protein sav0102	2,047
900	orf141	0,490
911	PTS System, Arbutin-ähnliche Komponent	0,271
932	Hypothetisches Protein sav2130	0,451
943	Hypothetisches Protein sav2222	0,391
947	30 S ribosomales Protein S19	2,077
952	Arginin/Ornithin Antiporter	0,362
962	Alpha-Acetolactat Synthase	0,320
969	Hypothetisches Protein sav1893	2,394
984	Glucosamin-Fructose-6-Phosphat Aminotransferase	2,310
990	Replikationsprotein	2,909
995	50 S ribosomales Protein L2	2,014
1000	Ornithin Transcarbamoylase	0,290
1013	sa1683 (ABC Transporter Homolog)	4,530
1019	Hypothetisches Protein sav1903	2,083
1023	Hypothetisches Protein sav1930	2,112
1025	sa2156 (L-Lactat Permease LctP Homolog)	0,369
1030	Generelles Stressprotein 20 U	9,214
1042	YvgQ	0,427
1043	50 S ribosomales Protein L4	2,177
1048	Arginin Deiminase	0,267
1058	L-Lactat Dehydrogenase 2	0,326
1067	ATP-abhängige DNA Helicase PcrA	2,223
1069	sa1734 (Pyrazinamidase/Nicotinamidase Homolog)	0,488
1071	Hypothetisches Protein sav1932	2,281
1077	3-Methyl-2-Oxobutanoat Hydroxymethyltransferase	0,412
1081	Konserviertes hypothetisches Protein (sav2172)	2,262
1090	Sulfit Reduktase (NADPH) Flavoprotein	0,338

---

1091	50 S ribosomales Protein L3	2,143
1111	Zweikomponenten Sensor Histidin Kinase	3,309
1115	PcrB	2,274
1119	Hypothetisches Protein sav1936	0,403
1131	sa1989 (Quinon Oxidoreduktase)	0,377
1148	Hypothetisches Protein sav2650	2,228
1151	Hypothetisches Protein sav2616	0,453
1156	Hypothetisches Protein sav0237	2,743
1163	Nitrite Extrusion Protein	0,356
1171	Hypothetisches Protein sav2395	0,302
1182	Hypothetisches Protein sav2508	2,287
1203	Konserviertes hypothetisches Protein (sav2689)	3,452
1241	Hypothetisches Protein sav0727	0,287
1265	NarI	0,487
1277	Hypothetisches Protein 14.2 kDa	5,653
1282	Hypothetisches Protein sav1027	2,953
1284	Hypothetisches Protein sav1061	0,375
1285	Hypothetisches Protein sav0240	0,438
1292	Hypothetisches Protein sav0757	0,311
1318	Alkylhydroperoxid Reduktase Untereinheit F	3,326
1331	Hypothetisches Protein sav0653	2,306
1338	MraZ	0,460
1347	Acetoin Dehydrogenase E2 Komponente	0,465
1363	Nitrate Reduktase beta-Kette NarH	0,301
1366	Alkylhydroperoxide Reduktase Untereinheit C	3,287
1367	Hypothetisches Protein sav2481	3,045
1377	Hypothetisches Protein sav0626	2,031
1383	Respons Regulator	0,147
1388	Hypothetisches Protein sav1214	2,252
1389	Hypothetisches Protein sav0168	0,467
1395	Acetoin Dehydrogenase E1 Komponente	0,434
1412	Hypothetisches Protein sav0361	2,245
1418	möglich: Exoprotein DltD	0,465
1431	Hypothetisches Protein sav0708	0,109
1443	TPP-abhängige Acetoin Dehydrogenase E1 alpha-Untereinheit	0,422
1454	Chromosomales Replikationsinitiationsprotein DnaA	2,239
1456	Hypothetisches Protein sav0199	2,033
1459	Nitrat Reduktase alpha-Kette	0,281
1469	Hypothetisches Protein sav0593	2,285
1491	Dihydrolipoamid Dehydrogenase	0,387
1498	Adenylosuccinat Synthetase AdsS	3,182
1519	Hypothetisches Protein sav0617	2,344
1533	Hypothetisches Protein sav2480	0,449
1552	DNA Ligase	2,601
1569	Hypothetisches Protein sav0165	2,720
1573	30 S ribosomales Protein S17	2,051
1588	Hypothetisches Protein sav1722	2,027

---

1589	Hypothetisches Protein sa1215	2,400
1590	Hypothetisches Protein sav1759	0,367
1595	IspA (Geranyltranstransferase Homolog)	3,022
1603	Hypothetisches Protein sav1608	0,436
1611	Lipoprotein Vorstufe	2,232
1621	wahrscheinlich: 50 S ribosomales Protein L29	2,034
1633	Hypothetisches Protein cpe1260	0,445
1649	Hypothetisches Protein sav1588	2,369
1655	Valyl-tRNA Synthetase ValRS	0,358
1667	Hypothetisches Protein sav2220	0,346
1668	Hypothetisches Protein sav0100	2,825
1669	50 S ribosomales Protein L22	2,140
1670	Hypothetisches Protein rv2821c	2,434
1671	Molybdopterin-Guanin Dinukleotid Biosynthese MobA	2,473
1675	Hypothetisches Protein sav2316	0,392
1687	Hypothetisches Protein sav1451	2,344
1705	RsbV	0,457
1715	Hypothetisches Protein sav2221	0,490
1717	50 S ribosomales Protein L23	2,229
1735	DNA Replikations-ähnliches Protein	2,136
1742	Response Regulator	3,910
1744	orf133	4,323
1765	30 S ribosomales Protein S10	2,212
1769	sa2092 (IraC)	2,101
1779	Peptid Methioninsulfoxid Reduktase Regulator (MsrR)	0,299
1787	Hypothetisches Protein sav1534	2,292
1788	Hypothetisches Protein sav1868	2,245
1790	Hypothetisches Protein orfx	4,051
1806	Hypothetisches Protein sav2386	0,409
1823	Hypothetisches Protein sav2348	0,386
1830	Hypothetisches Protein sav1777	2,423
1835	Hypothetisches Protein sav2536	2,211
1836	möglich: Transferase	0,473
1840	Hypothetisches Protein sav1929	7,723
1844	Pantoat beta-Alanin Ligase	0,496
1853	Hypothetisches Protein sav2140	2,085
1871	is605/is200-ähnliche Transposase	3,227
1883	Hypothetisches Protein sav1538	0,498
1888	Hypothetisches Protein sav1931	2,084
1897	Hypothetisches Protein 19.5 kDa	0,453
1900	Hypothetisches Protein sav2349	0,379
1918	Hypothetisches Protein sav0364	4,401
1921	Hypothetisches Protein sav2417	0,457
1927	wahrscheinlich: mechanosensitiver Kanal	3,244
1928	Hypothetisches Protein sav1795	2,500
1940	wahrscheinlich: 50 S ribosomales Protein L29	2,039
1971	Hypothetisches Protein sav2349	0,468

---

---

1990	Hypothetisches Protein sav2173	2,293
2004	Hypothetisches Protein sav2432	2,223
2015	Hypothetisches Protein sav0579	7,723
2017	Hypothetisches Protein sav1316	0,415
2021	wahrscheinlich: ribosomales Protein L34	2,443
2034	Hypothetisches Protein sav2433	2,067
2047	wahrscheinlich: 50 S ribosomales Protein L32	2,411
2049	orf133	4,379
2055	Hypothetisches Protein sav0624	2,145
STEP_1222	Riboflavin Synthase alpha-Kette	23,110
STEP_321	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	0,384
STEP_99	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	2,775

---

**Tabelle A6:** Deregulierte Gene von *S. epidermidis* 567 nach 60minütiger Inkubation mit 10 x MHK MT109

id	Beschreibung	x-fache Änderung
2	Hypothetisches Protein sav0609	0,080
6	TagH Homolog (Teichonsäure Translokationsprotein)	0,255
9	Transkriptions Antiterminationsprotein NusG	0,383
10	Hypothetisches Protein cpe1916	0,156
12	möglich: Undecaprenolkinase	0,080
13	IlvE (Aminosäure Aminotransferase Homolog)	0,032
16	Hypothetisches Protein sav0707	0,040
18	Hypothetisches Protein sav0719	0,480
19	Hypothetisches Protein sav0584	4,124
20	Hypothetisches Protein sav0725	0,305
23	Hypothetisches Protein alr1286	0,154
25	Excinuclease ABC Untereinheit B	4,852
31	Hypothetisches Protein sav0828	2,227
32	Quinol Oxidase Polypeptid III QoxC	0,151
33	Hypothetisches Protein sav0843	5,240
39	wahrscheinlich: MnhB (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit)	0,291
43	Transposase	2,486
44	Hypothetisches Protein sav1142	0,270
47	Hypothetisches Protein sav1004	0,265
54	Teichonsäure Translokationspermease	0,373
57	RplK	12,291
66	Hypothetisches Protein 30.9 kDa	2,786
67	Hypothetisches Protein sav0585	0,474
69	sa0551 (Quecksilberreduktase Homolog)	0,377
71	Uncharakterisiertes konserviertes Protein	0,111
72	Hypothetisches Protein sav2472	4,780
73	Excinuclease ABC Untereinheit A	6,667
80	Quinol Oxidase Polypeptid I QoxB	0,136
81	sa0776 (Aminotransferase NifS Homolog)	5,198
84	sa0938 (Cytochrom D Ubiquinol Oxidase Untereinheit II Homolog)	5,511
87	wahrscheinlich: OrfA	0,376
90	Hypothetisches Protein sav1124	0,187
91	Coenzym A Disulfidreduktase	0,250
94	Hypothetisches Protein sav1153	2,469
98	Hypothetisches Protein sav0610	0,126
100	Acetylacetoin Reductase	0,310
102	wahrscheinlich: Teichonsäure Biosynthese Protein B	0,450
105	50 S ribosomales Protein L1	19,192
109	Hypothetisches Protein sav0555	0,083
110	Fructose 1-Phosphat Kinase	0,333
112	sa0666 (6-Pyruvoyl Tetrahydrobiopterin Synthase Homolog)	0,034
116	Hypothetisches Protein sav0726	0,358

118	Hypothetisches Protein sav0739	0,094
119	Alkohol Dehydrogenase I	5,107
120	Hypothetisches Protein sav0752	2,077
124	YdaT	3,678
127	Hypothetisches Protein sav2490	0,306
128	wahrscheinlich: sa0914 (IraE)	0,410
129	Hypothetisches Protein sav0845	5,286
133	AmpA (wahrscheinlich: Cytosol Aminopeptidase)	0,271
138	sa0973 protein (Phosphopantethein Adenyltransferase Homolog)	0,349
138	sa0973 protein (Phosphopantethein Adenyltransferase Homolog)	5,097
139	Hypothetisches Protein sav0974	0,068
146	Hypothetisches Protein sav0611	0,247
150	Teichonsäure Biosynthese Protein X	0,478
155	Translationelongationfaktor Tu	0,406
160	Hypothetisches Protein sav0712	0,037
161	Hypothetisches Protein sav0580	0,446
172	Hypothetisches Protein sa2299	4,138
173	Hypothetisches Protein sav2007	0,168
174	Fibronectin-bindendes Autolysin	0,482
177	Hypothetisches Protein sav0846	5,652
183	Hypothetisches Protein sav0955	0,209
186	Hypothetisches Protein sav1127	4,073
188	Excinuclease ABC Untereinheit C	3,144
189	Tryptophanyl-tRNA Synthetase	0,262
194	Hypothetisches Protein sav0612	0,300
197	CtsR (Transkriptionsrepressor der Klasse III Stressgene Homolog)	4,116
201	Hypothetisches Protein sav0541	5,043
208	Hypothetisches Protein sav2459	0,252
211	Phosphotransacetylase	3,812
212	Hypothetisches Protein sav0729	0,124
213	Transposase	2,082
215	Transposase	2,404
216	Peptidkette release Faktor 2	0,384
217	Thioredoxin Reduktase (Fragment)	0,358
218	Hypothetisches Protein sav1017	0,329
222	Hypothetisches Protein sav1056	0,350
223	sa0769 (ABC Transporter Homolog)	0,363
225	Hypothetisches Protein sav2491	0,354
227	D-Alanin-D-Alanyl carrier Protein Ligase DltA	0,236
230	Hypothetisches Protein sav1106	0,302
231	Hypothetisches Protein sav0956	0,212
232	CtaB (Cytochrom Caa3 Oxidase Homolog)	0,169
233	Hypothetisches Protein sav0963	0,173
234	Fructose-Bisphosphatase	0,248
235	Transposase	2,702
236	Succinat Dehydrogenase Flavoprotein Untereinheit	2,013
237	Hypothetisches Protein sav0997	3,581

238	S-Adenosyl-Methyltransferase MraW	0,175
245	Hypothetisches Protein sav0523	4,027
248	sa0620 (Sekretorisches Antigen SsaA Homolog)	0,072
249	DNA-gerichtete RNA Polymerase beta-Kette	8,460
250	Hypothetisches Protein sav0679	2,513
251	Acetyltransferase	0,463
254	Hypothetisches Protein sav0702	0,381
255	NagB (wahrscheinlich: Glucosamin-6-Phosphate Isomerase)	0,237
257	wahrscheinlich: Holin-ähnliches Protein LrgA	0,106
259	LrgB (Holin-ähnliches Protein LrgB)	0,192
261	OpuCD (Glycin/Betain/Carnitin/Cholin ABC Transporter)	2,367
264	Hypothetisches Protein sav0755	0,327
266	Peptidkette release Faktor 3	0,374
269	YndL	5,606
271	Hypothetisches Protein sav0838	0,489
272	Hypothetisches Protein sav2512	0,015
275	Hypothetischer MembranTransporter (DltB)	0,182
276	Pyruvat Dehydrogenase beta Untereinheit PdhB	3,004
278	sa0958 (Myo-inositol-1(oder 4)-Monophosphatase Homolog)	0,264
283	FabH (3-Oxoacyl-(Acyl-Trägerprotein) Synthase)	2,311
284	Succinat Dehydrogenase Eisen-Schwefel Protein Untereinheit	2,184
285	Hypothetisches Protein 30.9 kDa	2,533
286	Zellteilungprotein	0,161
291	Hypothetisches Protein tc0114	2,906
293	Hypothetisches Protein sav0524	4,449
294	Hypothetisches Protein sav0646	0,462
296	Bmr-ähnliches Protein (sa2241)	0,277
297	DNA-gerichtete RNA Polymerase beta'-Untereinheit (Fragment)	9,400
298	Hypothetisches Protein sav0681/sa0636	2,049
307	Hypothetisches Protein sav0589	3,825
308	Hypothetisches Protein sav0733	0,234
309	Hypothetisches Protein sav0604	0,318
312	Hypothetisches Protein sav0756	0,143
314	sa0878 (Resistenzprotein gegen toxische Anionen Homolog)	0,089
315	Triosephosphat Isomerase	2,191
317	Hypothetisches Protein sav0824	2,019
318	Hypothetisches Protein YaaF	0,390
321	Hypothetisches Protein sav0921	0,176
322	Hypothetisches Protein sav1077	0,239
323	Hypothetisches Protein sav0938	0,319
324	Pyruvat Dehydrogenase Komplex Untereinheit E2	3,096
325	MnhE (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit)	2,197
325	MnhE (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit)	0,298
328	Hypothetisches Protein sav1118	0,084
331	3-Oxoacyl-[Acyl-Trägerprotein] Synthase	2,119
332	Glutamat Racemase	2,146
336	Isoleucyl-tRNA Synthetase (IleRS)	0,330

338	Hypothetisches Protein sav2354	0,188
341	Negativer Regulator der genetischen Kompetenz ClpC/MecB	4,818
344	Hypothetisches Protein lin0388	0,140
349	Hypothetisches Protein sav0559	0,428
350	Histidin Protein Kinase	0,055
351	Hypothetisches Protein sav0571	2,208
352	Hypothetisches Protein sav0718	0,184
353	Hypothetisches Protein sav0583	2,133
356	Hypothetisches Protein sav0735	0,484
358	Lipophiles Protein	0,222
360	Exopolyphosphatase	0,349
362	Serin Protease HtrA	0,446
366	Hypothetisches Protein sav1058	0,194
367	sa0774 (ABC Transporter Homolog)	4,000
370	sa0102	5,089
373	MnhD (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit)	0,229
374	Transposase	2,489
375	Ornithin Aminotransferase	0,320
377	Hypothetisches Protein sav0968	0,070
381	Hypothetisches Protein sa0860	0,143
384	Aldehyd Dehydrogenase	8,272
386	LexA	5,305
393	50 S ribosomales Protein L19	2,597
394	Hypothetisches Protein sav1387	0,467
398	Hypothetisches Protein sav1409	2,387
400	Konserviertes hypothetisches Protein (sav1417)	0,496
401	Competence-damage induzierbares Protein CinA	0,225
406	Hypothetisches Protein sav1460	2,964
407	sa1163 (Aspartat Kinase Homolog)	5,360
408	Menaquinon Biosynthese Methyltransferase	0,102
409	Hypothetisches Protein sav1485	2,668
410	Hypothetisches Protein sav1650	0,382
413	alpha-Ketosäure Dehydrogenase E2	5,744
415	Acetyl-CoA Carboxylase (Biotincarboxylase Untereinheit) AccC	3,169
416	Hypothetisches Protein sav1686	0,374
420	Hypothetisches Protein sav1706	4,404
421	RNA Polymerase Sigmafaktor RpoD	2,884
422	30 S ribosomales Protein S4	2,783
428	sa1585 (Prolin Dehydrogenase Homolog)	0,489
431	Adenin Phosphoribosyltransferase	2,015
432	Kupfer-transportierende ATPase CopA	0,397
446	Xylose Kinase	0,231
450	Thymidylat Synthase	0,392
454	Hypothetisches Protein sav1461	0,153
456	Hypothetisches Protein sav1472	0,071
461	alpha-Ketosäure Dehydrogenase E1	5,308
462	Trigger Faktor	2,368

---

463	Acetyl-CoA Carboxylase Biotin Carboxyl Carrier Untereinheit	2,835
464	Glyceraldehyd 3-Phosphate Dehydrogenase 2	0,133
466	D-Serin/D-Alanin/Glycin Transporter	0,023
469	Hypothetisches Protein sav1563	2,753
475	Hypothetisches Protein sav1612	2,086
476	Riboflavin Biosynthese Protein	15,729
484	Hypothetisches Protein sav1353	0,310
491	XerC (Rekombinase Homolog)	0,253
492	Alanin Racemase 2	0,402
496	Hypothetisches Protein sav1419	0,190
497	Hypothetisches Protein sav1289	0,446
499	Aerobe Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase	3,055
501	Hypothetisches Protein sav1315	0,136
502	3-Phosphoshikimat 1-Carboxyvinyltransferase	0,272
503	Threonin Synthase	2,920
509	alpha-Ketosäure Dehydrogenase E1	4,307
511	Hypothetisches Protein lmo1252	0,203
514	Pyruvat Kinase	2,945
516	sa1530	0,457
519	Chaperon DnaK (Hitzeschockprotein 70, Hsp70)	3,122
522	Hypothetisches Protein sav1753	0,494
523	Hypothetisches Protein sav1614	2,149
524	Riboflavinsynthase alpha-Kette	14,037
531	Hypothetisches Protein sav1208	0,355
532	Topoisomerase IV Untereinheit B	0,193
536	FemA	0,211
538	Hypothetisches Protein sav1391	0,097
539	ATP-abhängige Protease HslV	0,256
540	Diaminopimelat Decarboxylase	0,261
541	DNA Polymerase III	2,106
542	Dihydrolipoamid Succinyltransferase	0,200
544	RbsK (wahrscheinlich: Ribokinase)	0,177
549	sa1155 (Cardiolipin Synthetase Homolog)	0,150
550	3-Dehydroquinat Synthase	0,248
557	Dihydrolipoamide Dehydrogenase	5,457
560	Hypothetisches Protein sav1689	0,278
562	6-Phosphofruktokinase	2,340
566	Hypothetisches Protein sav1725	0,346
571	Hypothetisches Protein sav2540	2,162
572	Riboflavin-spezifische Deaminase	11,290
578	Hypothetisches Protein sav1345	3,761
583	Ribonuklease III	2,031
586	sa1224 (ABC Transporter Homolog)	0,358
587	ATP-abhängige Hsl Protease Untereinheit HslU	0,297
589	Konserviertes hypothetisches Protein (sav1265)	2,354
590	2-Oxoglutarat Dehydrogenase E1	0,234
593	YoqZ	7,809

---

594	Hypothetisches Protein sav2361	0,329
598	Chorismat Synthase	0,175
601	Pseudouridin Synthase B	0,439
603	Glucose-6-Phosphat 1-Dehydrogenase	0,114
606	Hypothetisches Protein sav1677	0,449
608	AdaB (wahrscheinlich: Cystein Methyltransferase)	0,399
611	Hypothetisches Protein sav1557	3,010
612	Hypothetisches Protein sav1710	3,716
614	PTS System, N-Acetylglucosamin-spezifische Komponente	0,432
615	GTP-bindendes Protein	0,330
616	sa1562 (DNA Translocase, Sporulationsprotein, Homolog)	3,297
618	Leucyl-tRNA Synthetase (LeuRS)	0,166
620	Hypothetisches Protein sav1772	2,563
621	Hypothetisches Protein sav1628	2,779
622	Hypothetisches Protein 30.9 kDa	2,744
626	Hypothetisches Protein sav1346	3,897
628	Antiterminator GlcT	0,079
631	Chromosomensegregationsprotein Smc	3,353
637	Translationsinitiationsfaktor IF-2	3,410
639	Hypothetisches Protein sav2523	0,394
642	Hypothetisches Protein sav0270	0,120
646	Nucleosid Diphosphat Kinase	0,307
649	Hypothetisches Protein sav1494	0,445
653	DNA Reparaturprotein	5,589
662	Hypothetisches Protein sav1727	0,296
670	sa1606	4,615
674	Glycin/Betain Transporter	0,460
676	Hypothetisches Protein sav1359	0,201
679	wahrscheinlich: 16 S rRNA prozessierendes Protein RimM	0,176
683	Transkriptionsrepressor CodY	0,350
687	Hypothetisches Protein sav1281	0,430
692	Hypothetisches Protein sav1456	0,218
696	Peptidoglycan-bindend LysM	0,426
701	Arginin Repressor	4,057
702	Hmg-CoA Synthase	0,496
703	Dipeptidase	0,407
705	Hypothetisches Protein sav1545	0,433
707	Hypothetisches Protein sav1559/sa1388	3,395
711	Operon zur DNA-Bindung und -Aufnahme ComEB	0,237
712	Hypothetisches Protein sav1749	2,472
720	Uroporphyrinogen Decarboxylase	0,310
722	Aconitat Hydratase	0,411
727	tRNA (Guanin-N1)-Methyltransferase	0,323
731	30 S ribosomales Protein S2	0,416
732	Hypothetisches Protein sav1408	2,121
734	Hypothetisches Protein 30.9 kDa	2,561
735	Phosphatidylglycerophosphat Synthase	0,452

---

738	Hypothetisches Protein xf1747	0,362
740	Hypothetisches Protein sav1458	0,368
749	wahrscheinlich: Exodeoxyribonuklease VII große Untereinheit	3,616
750	Chromosomales Replikation-Initiations/Membran Adhärenz Protein	0,493
751	Hypothetisches Protein sav1533	0,392
755	Hypothetisches Protein sav1560	3,727
757	Hypothetisches Protein sav1572	0,243
761	Hypothetisches Protein sav2539	5,113
762	1-Pyrrolin-5-Carboxylat Dehydrogenase	0,145
763	Hypothetisches Protein sav1623	0,384
767	Hypothetisches Protein sav1649	0,372
768	Signaltransduktionsprotein TraP	0,100
773	Hypothetisches Protein tc0114	3,001
776	Hypothetisches Protein sav2051	2,117
779	Hypothetisches Protein sav1898	0,204
782	Hypothetisches Protein sav2088	0,331
784	ATP Synthase alpha-Kette	0,257
785	60 kDa Chaperonin	3,326
790	Phosphopentomutase	0,414
799	Hypothetisches Protein sav2197	0,084
803	50 S ribosomales Protein L16	2,078
804	Hypothetisches Protein sav2621	0,231
807	Hypothetisches Protein 54.6 kDa	3,676
808	Hypothetisches Protein sav0188	30,424
813	Hypothetisches Protein sav2310	0,297
816	IcaA	0,454
819	Sekretorisches Antigen Vorstufe SsaA	0,392
821	Hypothetisches Protein sav2567	0,179
825	Methionin Aminopeptidase	0,439
826	orf122 (Fragment)	3,111
827	Glutanyl-tRNA Amidotransferase Untereinheit B	3,793
828	Hypothetisches Protein orf3	0,389
831	Hypothetisches Protein sav2588	0,224
832	ATP-Synthase delta-Kette	0,237
833	Hypothetisches Protein sav2031	0,234
836	wahrscheinlich: DNA-gerichtete RNA Polymerase delta Untereinheit	2,290
838	TagF	0,283
839	Thymidylat Synthase	0,375
845	6-Phospho-beta-Galactosidase	5,049
855	Molybdän Cofactor Biosynthese Protein A	2,592
863	Hypothetisches Protein sav2322	4,111
875	Glutanyl-tRNA Amidotransferase Untereinheit A	3,521
876	Hypothetisches Protein sav2074	0,208
877	D-Serin/D-Alanin/Glycin Transporter	11,791
880	ATP Synthase beta-Kette	0,268
884	Hypothetisches Protein sav2129	2,385
886	sa2399 (Fructose-Bisphosphat Aldolase Homolog)	0,469

---

889	Hypothetisches Protein sav2165	0,287
891	Acetat-CoA Ligase	0,405
893	PTS System Lactose-spezifische Komponente	4,692
894	wahrscheinlich: Transposase	2,057
895	tRNA Pseudouridin Synthase A	0,344
898	Uroporphyrin-III C-Methyltransferase	0,035
901	Hypothetisches Protein sav2258	0,384
907	Sekretorisches Antigen Vorstufe SsaA	0,348
909	Hypothetisches Protein sav2312	2,152
911	PTS System Arbutin-ähnliche Komponent	0,137
915	Hypothetisches Protein sav1855	0,223
916	Hypothetisches Protein 39.3 kDa	0,118
917	Eisenaufnahmeregulator Homolog	0,256
921	Hypothetisches Protein sav1892	0,481
924	Hypothetisches Protein sav2081	0,300
928	ATP Synthase alpha-Kette	0,205
934	Deoxyribose-Phosphat Aldolase	0,406
941	Tagatose 1,6-Diphosphat Aldolase	5,194
945	wahrscheinlich: Pal1 (Fragment)	0,317
948	Hypothetisches Protein sav0236	0,349
949	möglich: Transmembran Protein (Fragment)	2,505
955	Hypothetisches Protein sav2301	0,248
959	Hypothetisches Protein sav2324	2,975
962	Alpha-Acetolactat Synthase	0,358
969	Hypothetisches Protein sav1893	4,620
970	SigB	0,480
975	Hypothetisches Protein sav1926	0,289
976	UDP-Glcnac 2-Epimerase	0,414
977	sa1845	2,806
978	Hypothetisches Protein sav2122	0,259
989	Tagatose-6-Phosphat Kinase	5,084
994	Hypothetisches Protein sav2371	0,298
995	50 S ribosomales Protein L2	2,210
996	Hypothetisches Protein sav2373	0,295
997	Cholin Dehydrogenase	5,270
1003	Hypothetisches Protein sav2302	0,367
1007	Transposase	2,281
1013	sa1683 (ABC Transporter Homolog)	2,472
1015	Hypothetisches Protein sav1881	0,289
1018	RsbW	0,351
1019	Hypothetisches Protein sav1903	3,790
1022	ATP Synthase epsilon-Kette	0,267
1024	Uracil Phosphoribosyltransferase	0,408
1025	sa2156 (L-Lactat Permease LctP Homolog)	0,182
1026	Hypothetisches Protein 30.9 kDa	2,007
1030	Generelles Stressprotein 20 U	7,302
1037	Galactose-6-Phosphat Isomerase LacB Untereinheit	4,799

---

1043	50 S ribosomales Protein L4	2,098
1055	Hypothetisches Protein sav2326	0,392
1057	Hypothetisches Protein sav1850	0,302
1058	L-Lactat Dehydrogenase 2	0,364
1061	Immunodominantes Antigen A	0,268
1062	Hypothetisches Protein sav2049	2,262
1066	RsbU	0,259
1067	ATP-abhängige DNA Helicase PcrA	5,109
1069	sa1734 (Pyrazinamidase/Nicotinamidase Homolog)	0,117
1070	ATP Synthase beta-Kette	0,264
1072	Serin Hydroxymethyltransferase	0,409
1076	Autoinducer-2 Produktionsprotein LuxS	0,246
1077	3-Methyl-2-Oxobutanoat Hydroxymethyltransferase	0,142
1079	wahrscheinlich: Transposase	2,099
1080	Hypothetisches Protein 30.1 kDa	0,490
1081	Konserviertes hypothetisches Protein (sav2172)	2,096
1084	wahrscheinlich: Adenylylsulfat Kinase	5,676
1085	Galactose-6-Phosphat Isomerase LacA Untereinheit	4,019
1091	50 S ribosomales Protein L3	2,100
1098	Hypothetisches Protein sav2644	2,095
1099	Hypothetisches Protein sav2305	0,432
1105	Fumarat Hydratase, Klasse-II	0,461
1112	Hypothetisches Protein tc0114	2,971
1114	Alanin Racemase 1	0,451
1115	PcrB	3,896
1118	ATP Synthase gamma-Kette	0,284
1119	Hypothetisches Protein sav1936	0,097
1120	Hypothetisches Protein sav2114	0,380
1122	Fructose-Bisphosphat Aldolase	0,281
1123	TcaA	3,124
1124	Hypothetisches Protein sav2135	0,326
1126	Hypothetisches Protein sa1945	0,124
1128	Hypothetisches Protein tc0114	2,729
1129	Konserviertes hypothetisches Protein (sav2174)	10,245
1140	Hypothetisches Protein sav2625	0,144
1144	Extrazelluläre Elastase Vorstufe	2,484
1147	Hypothetisches Protein sav2306	0,177
1155	Drp35	3,136
1156	Hypothetisches Protein sav0237	6,198
1162	Transposase des Insertionssequenz-ähnlichen Elements IS4	2,072
1164	Replikative DNA Helicase	5,499
1166	DNA Gyrase Untereinheit A	6,122
1167	Hypothetisches Protein sa2180	0,275
1170	Hypothetisches Protein sav2412	2,430
1174	Einzelstrang DNA-bindendes Protein des Phagen phi pvl	2,282
1177	NADH Dehydrogenase Untereinheit 5	0,142
1179	wahrscheinlich: Präprotein Translocase SecE Untereinheit	0,308

---

1180	MnhC (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit)	0,266
1181	LytS und LytR Gene, (Zweikomponenten Responseregulator)	0,055
1188	Autolysin AtlE und möglicher Transkriptionsregulaor AtlR	3,459
1192	PotB (Spermidin/Putrescin ABC Transporter Homolog)	0,449
1193	Hypothetisches Protein sav2458	0,270
1197	sa0734 (Carboxyesterase Vorstufe Homolog)	2,131
1198	Signal Recognition Particle	3,457
1212	50 S ribosomales Protein L9	2,703
1217	Hypothetisches Protein sav2350	0,273
1219	Hexosephosphat Transport Protein	0,081
1222	Hypothetisches Protein sav0376	13,708
1228	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter Untereinheit	0,203
1246	Hypothetisches Protein sav1236	2,915
1247	Hypothetisches Protein sav0822	10,423
1248	Konserviertes hypotehtisches Protein (sav1282)	0,326
1258	Hypothetisches Protein sav2409	4,214
1260	Hypothetisches Protein sav0014	2,429
1262	FmhA	0,439
1273	CysK (Cystein Synthase Homolog)	3,989
1274	Hypothetisches Protein sav0925	0,370
1276	Hypothetisches Protein 32.7 kDa	2,677
1279	Hypothetisches Protein sav0603	0,251
1284	Hypothetisches Protein sav1061	0,125
1285	Hypothetisches Protein sav0240	0,307
1287	Hypothetisches Protein sav0703	2,297
1291	Hypothetisches Protein sav0757	0,131
1294	Ffh (Signal Recognition Particle Homolog)	2,816
1295	Hypothetisches Protein sav0823	10,628
1299	Immunodominantes Antigen B	0,349
1301	wahrscheinlich Metabolit Transportprotein CsbC	0,242
1306	Hypothetisches Protein sav0022	0,355
1310	DNA Gyrase Untereinheit B	5,084
1321	Hypothetisches Protein sav2436	0,149
1327	Hypothetisches Protein sav0273	5,514
1338	MraZ	0,155
1354	YchH (Fragment)	0,432
1358	DNA Replikation und Reparatur Protein RecF	4,503
1362	Hypothetisches Protein sav2413	2,253
1368	GMP Synthase	0,450
1370	D-Alanyl Trägerprotein (Dcp)	0,213
1372	Inaktive Signalpeptidase Ia	0,174
1374	Hypothetisches Protein sav0998	2,509
1379	Hypothetisches Protein sa0610	0,152
1383	Response Regulator	0,044
1387	ATP-abhängige Clp Protease proteolytische Untereinheit	4,269
1389	Hypothetisches Protein sav0168	0,078
1393	YjdF	0,353

---

1402	Histidin Kinase YycG (Zweikomponenten Sensor Histidin Kinase)	0,399
1406	DNA Polymerase III beta-Kette	5,053
1414	sa2204 (Phosphoglycerat Mutase)	0,333
1418	möglich: Exoprotein DltD	0,172
1429	Hypothetisches Protein sav0678	2,836
1431	Hypothetisches Protein sav0708	0,034
1432	Hypothetisches Protein sav1122	0,345
1434	Zellteilungsprotein	0,371
1440	Hypothetisches Protein sav1291	5,569
1450	Response Regulator	0,355
1454	Chromosomales Replikation Initiationsprotein DnaA	6,189
1458	Hypothetisches Protein sav0355	0,135
1462	Hypothetisches Protein sav0382	2,824
1470	Hypothetisches Protein sav1003	0,135
1477	Hypothetisches Protein sav0682	2,898
1478	Hypothetisches Protein sav1092	0,091
1480	Hypothetisches Protein sav1123	0,495
1485	Hypothetisches Protein sav0818	3,363
1486	Prolin-tRNA Ligase	2,412
1489	Hypothetisches Protein sav2687	0,449
1498	Adenylosuccinat Synthetase	13,495
1510	Hypothetisches Protein sav0383	3,514
1520	Hypothetisches Protein sav1016	0,367
1524	Hypothetisches Protein sav1080	0,235
1526	Pyruvat Dehydrogenase E1 Komponente alpha-Untereinheit	2,819
1533	Hypothetisches Protein sav2480	0,315
1534	Hypothetisches Protein sav1268	2,276
1539	Hypothetisches Protein sav1341	0,241
1541	FemB	0,074
1543	wahrscheinlich Ribose Permease	0,091
1545	Hypothetisches Protein sav1463	0,162
1547	Hypothetisches Protein sav1514	0,407
1551	DNA Primase	2,953
1552	DNA Ligase	4,650
1554	Hypothetisches Protein sav1934	0,455
1565	Hypothetisches Protein sav2110	0,171
1569	Hypothetisches Protein sav0165	5,768
1573	30 S ribosomales Protein S17	2,029
1582	Hypothetisches Protein sav0003	5,197
1586	Alkaline Phosphatase Synthese Transkriptionsregulator Protein	0,279
1594	Hypothetisches Protein sav1831	0,354
1595	IspA (Geranyltranstransferase Homolog)	4,306
1600	Hypothetisches Protein bh0622	2,288
1601	Hypothetisches Protein sav1587	0,251
1602	10 kDa Chaperonin	3,097
1636	Hypothetisches Protein sav1728	0,065
1641	30 S ribosomales Protein S1	0,331

---

1643	NusB	2,889
1650	AgrB	0,254
1663	Lytisches Regulationsprotein flankiert von Tn554	0,238
1669	50 S ribosomales Protein L22	2,196
1671	Molybdopterin-Guanin Dinukleotid Biosynthese MobA	2,373
1673	Hypothetisches Protein sav2296	2,524
1675	Hypothetisches Protein sav2316	0,227
1684	sa1563 (Phenylalanyl-tRNA Synthetase Homolog)	2,676
1690	Hit-ähnliches Protein involviert in Zellzyklus Regulation	0,260
1693	Hypothetisches Protein 12.1 kDa	0,465
1705	RsbV	0,286
1713	Hypothetisches Protein sav2183	6,283
1717	50 S ribosomales Protein L23	2,246
1719	wahrscheinlich: MoaD (Molybdopterin Synthase kleine Untereinheit)	2,118
1729	Hypothetisches Protein sav1325	2,243
1732	Hypothetisches Protein sav1743	2,713
1736	Hypothetisches Protein sav1789	0,408
1741	Hypothetisches Protein sav1549	0,279
1743	Hypothetisches Protein sav1574	0,219
1747	Hypothetisches Protein sav1615	3,948
1750	Hypothetisches Protein sav2367	0,131
1753	Hypothetisches Protein 13.5 kDa	0,231
1757	Hypothetisches Protein sav2126	0,286
1761	Hypothetisches Protein sav2184	6,029
1789	Hypothetisches Protein sav1550	0,158
1801	Hypothetisches Protein sav2069	0,241
1813	Hypothetisches Protein sav2252	0,135
1831	Hypothetisches Protein sav1457	0,139
1834	PrsA (Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase)	0,035
1839	GrpE (Hsp70 Cofaktor, Hsp20)	2,243
1847	Threonyl-tRNA Synthetase	0,105
1851	Hypothetisches Protein sav2101	0,099
1852	Malate:Quinone Oxidoreduktase	0,299
1853	Hypothetisches Protein sav2140	2,043
1865	Hypothetisches Protein YkkC	2,844
1867	Hypothetisches Protein sav2347	0,411
1869	Hypothetisches Protein sav2624	0,070
1873	Gamma-Aminobutyrat Permease	0,352
1874	Hypothetisches Protein sav1718	0,407
1876	sa1575 (Sporencortex Protein Homolog)	0,361
1883	Hypothetisches Protein sav1538	0,155
1885	Hypothetisches Protein sav1558	2,556
1886	Glutamyl-tRNA Amidotransferase Untereinheit C	2,685
1887	Hitze-induzierbarer Transkriptionsrepressor HrcA	2,164
1889	Hypothetisches Protein sav1605	2,117
1897	Hypothetisches Protein 19.5 kDa	0,260
1899	ATP Synthase Untereinheit C	0,223

---

1901	Hypothetisches Protein sav2142	0,153
1925	Hypothetisches Protein sav0678	3,030
1928	Hypothetisches Protein sav1795	3,672
1936	Hypothetisches Protein sav0936	0,231
1939	10 kDa Chaperonin (Cpn10)	3,014
1940	wahrscheinlich: 50 S ribosomales Protein L29	2,173
1950	Hypothetisches Protein sav2142	0,184
1956	Hypothetisches Protein 32.7 kDa	2,537
1962	GP32	0,439
1964	orf122 (Fragment)	2,817
1972	Cystathionin gamma-Synthase	30,743
1977	wahrscheinlich: konserviertes hypothetisches Protein (sav1267)	2,524
1990	Hypothetisches Protein sav2173	3,337
2006	CspC (Kälteschock Protein C)	0,027
2010	Hypothetisches Protein sav2183	6,950
2017	Hypothetisches Protein sav1316	0,159
2023	Transkriptionsaktivator des Glutamat Synthase Operons	4,234
2024	Hypothetisches Protein tc0114	2,748
2025	wahrscheinlich: Veg Protein Homolog	12,292
2039	Hypothetisches Protein sav2069	0,196
2046	Hypothetisches Protein sav0822	13,274
2047	wahrscheinlich: 50 S ribosomales Protein L32	5,056
2053	Hypothetisches Protein sav0479	0,464
2057	Hypothetisches Protein sav1341	0,283
2058	Hypothetisches Protein sav1776	0,262
2065	YabJ	3,986
2066	Hypothetisches Protein sav0823	8,832
2070	wahrscheinlich: 30 S ribosomales Protein S14-1	2,010
2072	Hypothetisches Protein sa0423	0,177
2078	Hypothetisches Protein 32.7 kDa	3,398

---

## 7.2 Publikation und Tagungsbeiträge

### Publikation

**Menzel T. M., Tischer M., François P., Nickel J., Schrenzel J., Bruhn H., Albrecht A., Lehmann L., Holzgrabe U. and Ohlsen K.** 2011. Mode-of-action studies of the novel bisquaternary bisnaphthalimide MT02 against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 55(1):311-20

### Tagungsbeiträge

**Menzel T., Tischer M., Katzowitsch E., Hammerschmidt S., Schrenzel J., Holzgrabe U. and Ohlsen K.** 2008. Investigations on a new antibacterial substance against *Staphylococcus aureus*. Posterpräsentation, Jahrestagung der DGHM, Dresden

**Menzel T., Tischer M., Katzowitsch E., Hammerschmidt S., Schrenzel J., Holzgrabe U. and Ohlsen K.** 2008. Investigations on a new antibacterial substance against Gram-positive bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Posterpräsentation, workshop Pathophysiology of Staphylococci, Kloster Banz

**Menzel T., Tischer M., Katzowitsch E., Hammerschmidt S., Schrenzel J., Holzgrabe U. and Ohlsen K.** 2008. Looking for the needle in the haystack: Seeking the mode of action of a novel antibacterial substance. Posterpräsentation, 4<sup>th</sup> Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB630, SFB766 and SFB544, Kloster Bronnbach

**Menzel T., Tischer M., Schrenzel J., Sahl H.-G., Holzgrabe U. and Ohlsen K.** 2009. New insights into the mode of action of an antibacterial bisquaternary bisnaphthalimide on *Staphylococci*. Posterpräsentation, Jahrestagung der DGHM, Göttingen

**Menzel T., Tischer M., Schrenzel J., Sahl H.-G., Holzgrabe U. and Ohlsen K.** 2009. New insights into the mode of action of an antibacterial bisquaternary bisnaphthalimide on *Staphylococci*. Posterpräsentation, 2<sup>nd</sup> International Symposium of the SFB630: Novel Agents Against Infectious Diseases – An Interdisciplinary Approach, Würzburg

**Menzel T., Tischer M., Schrenzel J., Sahl H.-G., Holzgrabe U. and Ohlsen K.** 2009. Having a closer look: New insights into the mode of action of an antibacterial bisquaternary bisnaphthalimide on *Staphylococci*. Posterpräsentation, 5<sup>th</sup> Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB630, SFB766 and SFB544, Heidelberg

**Menzel T. M.** 2010. Deep red cells of *Staphylococcus aureus* – influence of the antibacterial substance MT02. Vortrag, 3<sup>rd</sup> Joint Conference of DGHM and VAAM, Hannover

**Menzel T. M.** 2010. Mode of action studies on the antibacterial substance MT02 against *Staphylococcus aureus*. Vortrag, 5<sup>th</sup> International Symposium of the GSLS, Würzburg