

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Institute für Infektionsmedizin
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. M. Herrmann

Regulatoren des Kohlenstoff-Metabolismus in Staphylokokken

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2014**

vorgelegt von
Torsten Hartmann
geb. am: 08.05.1981 in Hannover

Abkürzungsverzeichnis

Aap	„accumulation-associated protein“
Abb	Abbildung
Agr	„accessory gene regulator“
AIP	autoinduzierendes Peptid („autoinducing peptide“)
Amp	Ampicillin
Arl	„autolysis-related locus“
ASL	„airway surface liquid“
ATP	Adenosintriphosphat
Bap	Biofilm-assoziiertes Protein („biofilm-associated protein“)
BCAA	„branched chain amino acids“
bp	Basenpaare
CA	in der Bevölkerung erworben („community-acquired“)
CcpA, C, E	Katabolit-Kontrollprotein A, C, E („catabolite control protein A, C, E“)
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
ClfA, B	„clumping factor A, B“
Cm	Chloramphenicol
Cna	Kollagen-bindendes Protein („collagen-binding protein“)
Coa	Koagulase („coagulase“)
CoA	Coenzym A
CP5, 8	kapsuläres Polysaccharid Typ 5, 8 („capsular polysaccharide type 5, 8“)
<i>cre</i>	„catabolite responsive element“
C _T	„cycle threshold“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelstrang-DNA
Eap	extrazelluläres Adhärenzprotein („extracellular adherence protein“)
eDNA	extrazelluläre DNA

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Efb	extrazelluläres Fibrinogen-bindendes Protein („extracellular fibrinogen-binding protein“)
Emp	extrazelluläres Matrix-bindendes Protein („extracellular matrix binding protein“)
EMSA	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“
Erm	Erythromycin
<i>et al</i>	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
FBP	Fruktose-1,6-bisphosphat
FnBPA, B	Fibronectin-bindendes Protein A, B („fibronectin-binding protein A, B“)
GISA	Glycopeptid-intermediärresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
Glukose-6-P	Glukose-6-Phosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	nosokomial („hospital-acquired“)
His	Histidin
Hla	α-Hämolysin
Hlb	β-Hämolysin
Hld	δ-Hämolysin
HPr	„histidine-containing phosphocarrier protein“
HprK/P	HPr Kinase/Phosphorylase
Ica	„intercellular adhesion locus“
IgG	Immunglobulin G
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
KKR	Kohlenstoff-Katabolitrepression
kV	Kilovolt
l	Liter
LB-L	Luria-Bertani Lennox
M	molar

McF	McFarland
mg	Milligramm
MHC II	„major histocompatibility complex class II”
MilliQ-H ₂ O	hochreines Wasser (Milli-Q Synthesis A10 System, Millipore, Billerica, USA)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	“messenger”-RNA
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMMs	„microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”
MSSA	Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nt	Nukleotidnummer
OD	optische Dichte
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
OLR	Offener Leserahmen
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBP2a	Penicillin-Bindeprotein
PBS	“phosphate buffered saline”
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction”)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PIA	interzelluläres Polysaccharid Adhäsिन („polysaccharide intercellular adhesin”)
PMNs	„polymorphonuclear neutrophils”
pmol	pikomolar
PNAG	„poly-N-acetylglucosamin”
PSMs	“phenol-soluble modulins”
PTS	Phosphotransferasesystem
PVL	Panton-Valentine Leukocidin

qPCR	quantitative Real-Time PCR
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RLU	„relative light units“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Sae	„ <i>S. aureus</i> exoprotein expression“ Lokus
Sar	„staphylococcal accessory regulator“
SasG	„ <i>S. aureus</i> surface protein G“
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SERAMs	„secretable expanded repertoire adhesive molecules“
Spc	Spectinomycin
Srr	„staphylococcal respiratory response“
Stk1/PknB	Serin/Threonin Proteinkinase
Tab	Tabelle
TCA	Tricarbonsäurezyklus
TcaR	“teicoplanin-associated locus“
Tet	Tetracyclin
TNFR	„tumor necrosis factor α (TNF- α) receptor 1“
TSA	„Trypticase Soy Agar“
TSB	„Trypticase Soy Broth“
TSST-1	Toxisches-Schocksyndrom-Toxin 1 („toxic shock syndrome toxin-1“)
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
x g	x fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Summary	3
2 Einleitung	5
2.1 Staphylokokken.....	5
2.2 Virulenzfaktoren von <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.3 Regulation von Virulenzfaktoren in Staphylokokken	9
2.4 Biofilmbildung in Staphylokokken.....	11
2.5 Kohlenstoff-Katabolitrepression in gram-positiven Bakterien.....	14
2.5.1 Das Phosphoenolpyruvat – Phosphotransferasesystem (PEP-PTS).....	15
2.5.2 Das Katabolit-Kontrollprotein A (CcpA).....	16
2.5.3 Das Katabolit-Kontrollprotein C (CcpC)	19
2.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
3 Material und Methoden	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Bakterienstämme.....	23
3.1.2 Plasmide	24
3.1.3 Oligonukleotide.....	25
3.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	26
3.1.5 Nährmedien.....	27
3.1.6 Antibiotika.....	27
3.1.7 Lösungen und Puffer	28
3.1.8 Enzyme	29
3.1.9 Kits	29
3.1.10 Geräte	30
3.2 Methoden.....	30
3.2.1 Kultivierung und Konservierung der verwendeten Bakterienstämme	30
3.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. aureus</i> und <i>B. subtilis</i>	31
3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	32
3.2.4 Isolierung von RNA aus <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> und <i>B. subtilis</i>	32
3.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	34
3.2.6 Ethanolfällung.....	34
3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	35

3.2.9	Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	36
3.2.10	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	37
3.2.11	Ligation von DNA-Fragmenten	37
3.2.12	Transformation von <i>E. coli</i>	37
3.2.12.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	37
3.2.12.2	Transformation.....	38
3.2.13	Transformation von <i>S. aureus</i>	39
3.2.13.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	39
3.2.13.2	Transformation.....	39
3.2.14	Transformation von <i>B. subtilis</i>	40
3.2.14.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	40
3.2.14.2	Transformation.....	41
3.2.15	Phagentransduktion in <i>S. aureus</i>	41
3.2.16	Konstruktion einer <i>S. aureus</i> $\Delta ccpE$ Mutante und dessen Komplementation	42
3.2.16.1	Konstruktion der <i>S. aureus</i> $\Delta ccpE$ Mutante	42
3.2.16.2	Konstruktion der <i>cis</i> -Komplementation der <i>S. aureus</i> $\Delta ccpE$ Mutante	44
3.2.17	Herstellung der Komplementationen der $\Delta ccpA$ Mutante KS66 in <i>S. aureus</i>	45
3.2.18	Konstruktion der <i>Trans</i> -Komplementationsplasmide <i>B. subtilis</i> <i>ccpC</i> Promoter - <i>B. subtilis</i> <i>ccpC</i> und <i>B. subtilis</i> <i>ccpC</i> Promoter - <i>S. aureus</i> <i>ccpE</i>	46
3.2.19	DNA-Sequenzierung.....	47
3.2.20	Reverse Transkription von RNA	47
3.2.21	Quantitative Real-Time PCR (qPCR).....	47
3.2.22	Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	49
3.2.23	Untersuchung der Biofilmbildung	50
3.2.24	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
3.2.25	Western Blot Analyse	54
3.2.26	Herstellung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper.....	54
3.2.27	Bestimmung der Konzentrationen von Glukose, Acetat und Ammoniak in Kulturüberständen	55
3.2.28	Proteinbestimmung nach Bradford.....	56
3.2.29	Bestimmung der Enzymaktivitäten von Aconitase und Citrat Synthase.....	56
3.2.29.1	Aconitase	56
3.2.29.2	Citrat Synthase.....	57
3.2.30	Statistische Analyse	58
4	Ergebnisse.....	59
4.1	Untersuchung des Einflusses von CcpA auf die Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i>	59
4.1.1	Einfluss von CcpA auf die Transkription von <i>icaADBC</i>	59

4.1.2	Einfluss von CcpA auf die Biofilmbildung.....	60
4.2	Überprüfung der physiologischen Relevanz einer Phosphorylierung von CcpA durch Stk1 in <i>S. aureus</i>	65
4.2.1	<i>Trans</i> -Komplementation der $\Delta ccpA$ Mutante KS66 mit dem <i>ccpA</i> Wildtyp-Allel, sowie einer phosphoablative und phosphomimetischen Variante von CcpA.....	65
4.2.2	Auswirkung der Phosphorylierung von CcpA auf die Expression von CcpA.....	65
4.2.3	Auswirkung der Phosphorylierung von CcpA auf die Transkription CcpA-regulierter Gene.....	68
4.2.4	Auswirkung der Phosphorylierung von CcpA auf die Biofilmbildung.....	70
4.3	Charakterisierung des neuen KKR- Regulators CcpE in <i>S. aureus</i>	71
4.3.1	Identifizierung eines putativen Homologs von CcpC aus <i>B. subtilis</i>	71
4.3.2	Herstellung einer markerlosen Deletionsmutante von <i>ccpE</i>	72
4.3.3	Genetische Organisation von <i>ccpE</i> in <i>S. aureus</i>	74
4.3.3.1	Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes von NWMN_0640.....	76
4.3.4	Einfluss der Deletion von <i>ccpE</i> auf die Transkription von NWMN_0640 und <i>ccpE</i>	77
4.3.5	Expression von CcpE während des Wachstums.....	79
4.3.6	Einfluss von CcpE auf die Wachstumseigenschaften von <i>S. aureus</i>	80
4.3.7	Einfluss von CcpE auf die Transkription der TCA-Zyklus Gene <i>citZ</i> und <i>citB</i>	82
4.3.8	Einfluss von CcpE auf die Aktivität der TCA-Zyklus Enzyme Citrat Synthase und Aconitase.....	84
4.3.9	Effekt von CcpE auf die Wachstumseigenschaften und die Aktivität des TCA-Zyklus von <i>S. aureus</i> in Anwesenheit von Glukose.....	86
4.3.10	Überprüfung von CcpE aus <i>S. aureus</i> in Hinblick auf eine funktionelle Homologie zu CcpC aus <i>B. subtilis</i>	93
4.3.11	Einfluss von CcpE auf Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	98
5	Diskussion.....	103
5.1	Der Einfluss von CcpA auf die Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i>	103
5.2	Physiologische Relevanz der Phosphorylierung von CcpA durch Stk1 in <i>S. aureus</i>	106
5.3	CcpE als regulatorische Verknüpfung zwischen Metabolismus und Virulenz in <i>S. aureus</i>	109
5.4	Ausblick.....	122
6	Literaturverzeichnis.....	124
7	Publikationen / Kongressbeiträge.....	141
8	Danksagung.....	143
9	Lebenslauf.....	144

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Anhand der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) können Bakterien die Expression von Genen und Operons in Hinblick auf die effiziente Aufnahme und Verstoffwechslung bevorzugter Kohlenstoffquellen aus einem Nährstoffgemisch hin optimieren. In gram-positiven Bakterien, wie Staphylokokken, wird die KKR hauptsächlich durch den globalen Transkriptionsregulator Katabolit-Kontrollprotein A (CcpA) vermittelt. Umfangreiche Untersuchungen in *Staphylococcus aureus* haben gezeigt, dass CcpA nicht nur Gene des Stoffwechsels reguliert, sondern auch einen Einfluss auf die Expression von Virulenzfaktoren dieses Pathogens hat und dessen Biofilmbildungskapazität fördert.

Ein derartiger Einfluss von CcpA wurde nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch für *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen. Es konnte in Biofilmversuchen unter statischen und dynamischen Bedingungen, sowie kontrollierten Flussbedingungen gezeigt werden, dass eine Deletion von *ccpA* in einer deutlich verminderten Fähigkeit der Biofilmbildung und reduzierten Transkription von *icaD*, Teil des für die Synthese vom interzellulären Polysaccharid Adhäsin (PIA) benötigten *icaADBC* Operons, dieses Pathogens resultierte.

Ferner zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals *in vivo* in *S. aureus*, dass eine über die Serin/Threonin Proteinkinase Stk1 vermittelte Phosphorylierung von CcpA innerhalb der DNA-Bindedomäne einen inaktivierenden Einfluss auf dessen regulatorische Aktivität hat. Die Phosphorylierung von CcpA führte dabei, ähnlich wie die Deletion von *ccpA*, zu einer verstärkten Transkription von *citZ* (kodiert für das Enzym Citrat Synthase) und verminderten Transkription von *hla* (kodiert für das Exotoxin α -Hämolysin). Ebenso verhinderte die Phosphorylierung von CcpA die Biofilmbildung dieses Pathogens unter dynamischen Wachstumsbedingungen.

Mit dem Katabolit-Kontrollprotein E (CcpE) wurde im Rahmen dieser Arbeit zudem ein neuer Regulator der KKR in *S. aureus* identifiziert. Es konnte eine markerlose *ccpE*-Deletionsmutante und dessen Komplementante erstellt und in Hinblick auf den Metabolismus und die Virulenz charakterisiert werden. Dabei stellte sich in Transkriptionsanalysen heraus, dass CcpE ein essentieller Aktivator der Transkription der Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) Gene *citB* (kodiert für das

Enzym Aconitase), und im geringen Maße auch von *citZ* ist. Im Einklang mit den Transkriptionsdaten zeigte sich auch eine drastisch reduzierte Enzymaktivität der Aconitase. Diese metabolische Störung des TCA-Zyklus an der Aconitase als Folge der Deletion von *ccpE* führte bei einem Wachstum in glukosehaltigem Medium zu einem verminderten Acetatkatabolismus und reduzierten Wachstum mit dem Beginn der post-exponentiellen Wachstumsphase, ab der dieser Stoffwechselweg eine tragende Rolle in *S. aureus* spielt. Neben diesen drastischen Auswirkungen auf den Metabolismus konnte auch ein Einfluss auf die Virulenz beobachtet werden, was sich in einem deutlich veränderten Transkriptionsmuster der wichtigen Virulenzfaktoren RNAIII, *hla*, *capA* (kodiert für das „capsular polysaccharide synthesis enzyme A“) und *psmA* (kodiert für die „phenol soluble modulins“ der Gruppe α) äußerte. In einer *trans*-Komplementationsstudie konnte abschließend gezeigt werden, dass CcpE kein funktionelles Homolog des KKR-Regulators CcpC aus *Bacillus subtilis* zu sein scheint. Damit konnte CcpE als ein neues, weiteres wichtiges Bindeglied zwischen Metabolismus und Virulenz in *S. aureus* charakterisiert werden.

1.2 Summary

Regulators of carbon catabolite repression in staphylococci

Carbon catabolite repression (CCR) allows bacteria to modulate the expression of genes and operons in order to optimize the efficient uptake and metabolism of preferred carbon sources out of a mixture of nutrients. In gram-positive bacteria such as staphylococci, CCR is primarily mediated by a global transcriptional regulator termed catabolite control protein A (CcpA). A number of studies have shown that CcpA of *Staphylococcus aureus* does not only regulate genes of metabolism, but also has an effect on virulence determinant production, and the biofilm formation capacity of this pathogen.

This study shows now that the CcpA homolog of *Staphylococcus epidermidis* fulfills a similar function in this likewise important nosocomial pathogen. Deletion of *ccpA* in this pathogen markedly reduced its ability to form a biofilm under static, dynamic and controlled flow conditions. Additionally, a reduced transcription of *icaD*, which is part of the *icaADBC* operon that is important for the production of the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) – a major component of the extracellular matrix in the majority of biofilm forming clinical isolates – was observed.

In a second part of this study, an inactivating effect of the serine/threonine protein kinase Stk1-mediated phosphorylation of the *S. aureus* CcpA within its DNA-binding domain under *in vivo* conditions was observed. It was shown that the Stk1-driven phosphorylation of CcpA abolished the transcriptional effect of this regulator on *citZ* (encoding citrate synthase) and *hla* (encoding α -hemolysin) expression, and affected the ability of *S. aureus* to form a biofilm under dynamic growth conditions.

With the catabolite control protein E (CcpE), a further regulator of CCR in *S. aureus* was identified in this work that links carbon metabolism with virulence determinant production in this pathogen. A markerless *ccpE* deletion mutant and its complementation were successfully constructed and phenotypically characterized. Transcriptional analyses suggest that CcpE is an essential activator for the transcription of the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) genes *citB* (encoding aconitase) and, to a lesser extent, of *citZ*. Consistent with the transcriptional data, a drastically reduced enzyme activity of aconitase was observed. When grown in

glucose containing media, inactivation of *ccpE* led to an impaired catabolism of acetate and a reduced bacterial growth rate at later stages of growth, where this pathway plays an important role in *S. aureus*. In addition to its impact on metabolism and growth rate, the *ccpE* deletion also affected the virulence determinant production of *S. aureus* by altering the transcription rates of major virulence factors such as RNAIII, *hla*, *capA* (encoding capsular polysaccharide synthesis enzyme A) and *psmA* (encoding the phenol-soluble modulins group α cluster). *Trans*-complementation studies finally suggest that CcpE of *S. aureus* is not a functional homolog of the CCR regulator CcpC from *Bacillus subtilis*.

2 Einleitung

2.1 Staphylokokken

Staphylokokken (lat. Singular *Staphylococcus*) sind gram-positive, fakultativ anaerobe, nicht aktiv bewegliche und nicht-sporenbildende Bakterien mit einem Zelldurchmesser von 0,5 bis 1,5 µm. Typisch für den Genus *Staphylococcus* ist neben der Kugelform eine häufig traubenförmige Clusterbildung der Zellen während des Wachstums. Anhand der Koagulasereaktion werden Staphylokokken in zwei Klassen unterteilt, die Koagulase-positiven und die Koagulase-negativen Staphylokokken (rezensiert in Plata *et al.*, 2009).

Zu den Koagulase-positiven Staphylokokken gehört die bedeutende humanpathogene Spezies *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* ist eine der Hauptursachen für nosokomiale (hospital-acquired, HA) und in der Bevölkerung erworbene (community-acquired, CA) Infektionen (Diekema *et al.*, 2001). Bis zu 30% der Bevölkerung sind zumeist in der Nase, aber auch auf der Hautoberfläche, in den Achselhöhlen, der Vagina oder als Teil der Flora des Verdauungstraktes dauerhaft mit *S. aureus* kolonisiert, ohne dass es zu einer Infektion kommt (Gordon & Lowy, 2008; rezensiert in Wertheim *et al.*, 2005). Jedoch besteht in diesem Fall ein erhöhtes Infektionsrisiko, da *S. aureus*, oft begünstigt durch Verletzungen der Haut oder ein geschwächtes Immunsystem, in den Blutkreislauf oder angrenzende Gewebe gelangen und sich im Wirt ausbreiten kann, wodurch in der Folge eine Reihe lebensbedrohlicher Erkrankungen wie Lungenentzündung, Endokarditis, Toxisches Schocksyndrom (TSS) und Sepsis bei den Betroffenen auftreten können (Archer, 1998; rezensiert in Lowy, 1998). Der Grund für die hohe Pathogenität von *S. aureus* ist durch sein breites Spektrum an Virulenzfaktoren begründet, welche an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beteiligt sind. Ein Überblick über eine Auswahl wichtiger Virulenzfaktoren von *S. aureus* wird in Kapitel 2.2 gegeben.

Zu den häufigsten humanen Infektionserregern innerhalb der Koagulase-negativen Staphylokokken gehört *Staphylococcus epidermidis*. Er besiedelt bevorzugt verschiedene Areale der Haut und Schleimhäute (rezensiert in Kloos & Bannerman, 1994). Anhand zahlreicher Studien zeigte sich, dass *S. epidermidis* die häufigste aus

klinischen Materialien isolierte Koagulase-negative Staphylokokken-Spezies, sowie einer der Hauptverursacher nosokomial erworbener Fremdkörperinfektionen (z.B. durch Kathetersysteme und Prothesen) und Bakteriämien bei immunsupprimierten Patienten ist (Chaves *et al.*, 2005; García *et al.*, 2004).

Einer der wichtigsten Faktoren bei der Entstehung von Medizinalprodukt-assoziierten Staphylokokken-Infektionen ist die Bildung anhaftender, mehrlagiger Biofilme (Mack *et al.*, 2006). Während bei *S. aureus* neben der Biofilmbildung insbesondere zahlreiche andere Virulenzfaktoren sein hohes pathogenes Potenzial hervorrufen, ist die Pathogenität von *S. epidermidis* vor allem durch die Fähigkeit der Biofilmbildung begründet (rezensiert in Cue *et al.*, 2012).

Ein großes Problem für unser Gesundheitssystem stellt die zunehmende Verbreitung multiresistenter Staphylokokken-Isolate sowohl im Krankenhausumfeld als auch in der Gesellschaft dar. Die wichtigste Gruppe bilden hier die sogenannten MRSA (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*), die aufgrund der Bildung eines alternativen Penicillin-Bindeproteins, PBP2a (auch MecA und PBP2' genannt), gegenüber allen β -Lactamantibiotika resistent sind und vielfach (insbesondere die im Krankenhausumfeld kursierenden Isolate) auch noch gegen weitere Antibiotikaklassen aktive Resistenzdeterminanten ausbilden (rezensiert in Berger-Bächi & Rohrer, 2002). MRSA weisen im Vergleich zu ihren Methicillin-sensiblen Artgenossen, den MSSA, eine um den Faktor zwei bis drei erhöhte Mortalitätsrate auf und sind für einen großen Teil der nosokomialen *S. aureus* Infektionen verantwortlich (Gastmeier *et al.*, 2005). Die Resistenz gegenüber Oxacillin (Methicillin) hat auch unter den Koagulase-negativen Spezies weiter zugenommen und liegt gemäß der PEG-Resistenzstudie aus dem Jahre 2007 in Mitteleuropa für die klinisch relevanten Spezies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. hominis* bei 73,8%, 89,0% und 71,4%.

2.2 Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus*

Der Hauptgrund für die zuvor beschriebene hohe Pathogenität von *S. aureus* und seine Fähigkeit, eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen hervorzurufen zu können, ist sein breites Spektrum an Virulenzfaktoren (Archer, 1998). Das Überleben der Bakterien im Wirt wird dabei durch verschiedene Mechanismen begünstigt.

So verfügt *S. aureus* zum einen über verschiedene Adhäsionsfaktoren, wodurch in der frühen Phase einer Infektion eine Verbindung zu den Wirtszellen hergestellt werden kann und eine Besiedlung des Wirtes initiiert und etabliert wird. Es gibt zwei wichtige Gruppen von Adhäsionsfaktoren, welche in die Zellwand-gebundenen MSCRAMMs („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“) und sekretorischen SERAMs („secretable expanded repertoire adhesive molecules“) unterteilt werden. Während die MSCRAMMs über ein LPXTG-Motiv kovalent in der Zellwand verankert sind, besitzen die SERAMs kein solches Motiv und sind daher nicht kovalent in der Zellwand verankert (rezensiert in Chavakis *et al.*, 2007; rezensiert in Chavakis *et al.*, 2005). Neben diesen Adhäsionsfaktoren sezerniert *S. aureus* zahlreiche Enzyme und Exotoxine, welche unter anderem vier Hämolsine (α -, β -, γ - und δ -Hämolsin) sowie Nucleasen, Proteasen und Lipasen umfassen. Manche Stämme produzieren weitere Exotoxine wie z.B. das Leukozidin PVL (Panton-Valentine Leukocidin). Neben ihrer wichtigen immunmodulatorischen Funktion sorgen diese Proteine für den Aufschluss von Wirtszellen und die Freisetzung von Nährstoffen für das bakterielle Wachstum (rezensiert in Dinges *et al.*, 2000). Eine weitere wichtige Gruppe bilden die als Superantigene klassifizierten Toxine, zu denen verschiedene Enterotoxine und das TSST-1 (Toxisches-Schocksyndrom-Toxin 1) gehören, welche die Immunantwort des Wirtes schwächen und eine weitere Ausbreitung von *S. aureus* begünstigen (rezensiert in Plata *et al.*, 2009). Einige *S. aureus* Stämme sind zudem in der Lage, eine Kapsel zu produzieren, welche die äußere Hülle des Bakteriums überdeckt und es so vor der Phagozytose durch Zellen des Immunsystems schützt. Diese aus Polysacchariden (CPs) bestehenden Kapseln sind bei klinischen Isolaten meist vom Serotyp CP5 oder CP8 (rezensiert in O'Riordan & Lee, 2004). Eine Auswahl bedeutender Virulenzfaktoren der genannten Gruppen und deren Funktion in *S. aureus* sind in Tab. 2.1 dargestellt.

Tab. 2.1: Übersicht einer Auswahl wichtiger Virulenzfaktoren von *S. aureus*.

Virulenzfaktor	Funktion	Referenz
MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)		
Fibronektin-bindendes Protein A und B (FnBPA und FnBPB)	Bindung an Fibronektin, Fibrinogen und andere Proteine der extrazellulären Matrix.	Heying <i>et al.</i> , 2007; Fitzgerald <i>et al.</i> , 2006
“Clumping factor” A und B (ClfA und ClfB)	Bindung an Fibrinogen und Fibrin	Higgins <i>et al.</i> , 2006; O'Brien <i>et al.</i> , 2002
Kollagen-bindendes Protein (Cna)	Bindung an Kollagen Typ I und IV	rezensiert in Chavakis <i>et al.</i> , 2007
Protein A (<i>spa</i>)	Bindung unter anderem an IgG (Fc-Teil), von Willebrand Faktor und gC1qR/p33; Aktivierung von tumor necrosis factor α (TNF- α) receptor 1 (TNFR1)	Cedergren <i>et al.</i> , 1993; Hartleib <i>et al.</i> , 2000; Gómez <i>et al.</i> , 2004; Nguyen <i>et al.</i> , 2000
SERAMs (secretable expanded repertoire adhesive molecules)		
Extrazelluläres Adhärenzprotein (Eap)	Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix und Plasmaproteinen wie z.B. Fibronektin, Fibrinogen und Prothrombin; Internalisierung in Wirtszellen; verschiedene immunmodulatorische und antiangiogenetische Aktivitäten	Hussain <i>et al.</i> , 2008; Haggar <i>et al.</i> , 2003; Palma <i>et al.</i> , 1999
Extrazelluläres Matrix-bindendes Protein (Emp)	Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix	Hussain <i>et al.</i> , 2001
Extrazelluläres Fibrinogen-bindendes Protein (Efb)	Bindung an Fibrinogen und Komplement-Faktoren C3b und C3d	rezensiert in Chavakis <i>et al.</i> , 2007
Koagulase (Coa)	Aktivierung von Prothrombin	rezensiert in Chavakis <i>et al.</i> , 2007
Exotoxine/Superantigene		
α -Hämolysin (Hla)	Porenbildung in der Membran von Erythrozyten und Monozyten; Lyse von Erythrozyten; Entrinnen aus dem Phagosom	rezensiert in Sinha & Fraunholz, 2010; rezensiert in Fournier & Philpott, 2005; rezensiert in Dinges <i>et al.</i> , 2000
β -Hämolysin (Hlb)	Zytotoxisch für Erythrozyten und Monozyten; anti-inflammatorisches Potential	Tajima <i>et al.</i> , 2009; rezensiert in Dinges <i>et al.</i> , 2000
Panton-Valentine Leukozidin (PVL)	Lyse von PMNs („polymorphonuclear neutrophils“), Monozyten und Makrophagen	Genestier <i>et al.</i> , 2005

Toxisches-Schocksyndrom-Toxin 1 (TSST-1) und Enterotoxine	Bindung an MHC II - Rezeptoren; starke Aktivierung von T-Zellen	rezensiert in Fraser & Proft, 2008; rezensiert in Thomas <i>et al.</i> , 2007
Polysaccharide		
Kapsuläre Polysaccharide Typ 5 und 8 (CP5, CP8)	Produktion einer extrazellulären Kapsel; Schutz vor Phagozytose	rezensiert in O’Riordan & Lee, 2004
Interzelluläres Polysaccharid Adhäsion (PIA)	Bestandteil der extrazellulären Biofilmmatrix zur interzellulären Adhäsion zwischen Bakterienzellen	rezensiert in Cue <i>et al.</i> , 2012

Für die gezielte Synthese von Virulenzfaktoren besitzen Staphylokokken ein sehr komplexes Regulationssystem.

2.3 Regulation von Virulenzfaktoren in Staphylokokken

Die Expression der Virulenzfaktoren von Staphylokokken wird auf transkriptioneller wie post-transkriptioneller Ebene über ein komplexes Regulationssystem moduliert. Dabei haben sowohl die Wachstumsphase der Bakterien als auch Umweltfaktoren einen markanten Einfluss. Eine solche Regulation ist für das Bakterium wichtig, damit es sich schnell an sich verändernde Bedingungen seiner Umgebung anpassen kann (rezensiert in Cheung *et al.*, 2004; rezensiert in Bronner *et al.*, 2004).

Eines der wichtigsten und am besten untersuchten regulatorischen Systeme ist das Quorum-sensing System Agr („accessory gene regulator“), welches insbesondere bei der wachstumsphasenabhängigen Regulation diverser Virulenzfaktoren eine wichtige Rolle spielt (rezensiert in Thoendel *et al.*, 2011). Bei *S. aureus* umfasst das *agr*-Operon die zwei Transkriptionseinheiten RNAII und RNAIII, deren Transkription von den zwei Promotoren P2 bzw. P3 reguliert wird. Das P2 Transkript RNAII kodiert für AgrA, AgrB, AgrC und AgrD. AgrB und AgrD induzieren durch eine zell-dichte-abhängige Bildung und Sekretion von autoinduzierenden Peptiden (AIPs) die Aktivierung des transmembranständigen Rezeptors AgrC, welcher mit AgrA als Zweikomponenten-Transduktionssystem fungiert. AgrA kann durch die Aktivierung von AgrC an eine Region zwischen Promoter P2 und P3 binden und die Transkription des *agrABCD* Operons und RNAIII induzieren. Das P3 Transkript RNAIII ist das eigentliche Effektor-Molekül des *agr*-Operons, welches die Synthese sekretorischer Virulenzfaktoren (z.B. α -Hämolyisin) positiv und Oberflächen-assoziiertes Proteine

(z.B. Protein A) negativ reguliert. Neben seiner Funktion als Effektor des *agr*-Operons kodiert RNAIII auch für das δ -Hämolyisin (*hld*) (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009; rezensiert in Novick, 2003). Für *S. epidermidis* konnte ein vergleichbares *agr*-System mit ähnlicher Struktur und Funktion identifiziert werden (Otto *et al.*, 1998). Neben dem *agr*-System gibt es einige weitere Zweikomponentensysteme wie SaeRS, SrrAB und ArlRS, welche auch in die Regulation von Virulenzfaktoren involviert sind (rezensiert in Novick, 2003).

Eine zweite wichtige Gruppe bildet die Familie der Sar („staphylococcal accessory regulator“) DNA-Bindeproteine. Unter diesen ist SarA das bisher am besten untersuchte Protein der Familie, welches zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* strukturell und funktionell hoch konserviert ist (Fluckiger *et al.*, 1998). Der *sar* Lokus in *S. aureus* besteht aus drei transkriptionellen Einheiten (*sarA*, *sarB*, und *sarC*), welche für das Protein SarA kodieren. Die Expression dieser Transkripte steht in einem wachstumsabhängigen Zusammenhang, wobei *sarA* und *sarB* vorwiegend in der exponentiellen und *sarC* in der stationären Phase exprimiert werden. (Bayer *et al.*, 1996). Durch eine direkte Bindung des Proteins an die Promotorregion von Genen ist SarA in der Lage, die Transkription verschiedener Virulenzfaktoren wie *spa* (Protein A) und *hla* (α -Hämolyisin) zu beeinflussen (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009). Darüber hinaus ist SarA auch ein wichtiger Aktivator des *agr*-Systems (Cheung *et al.*, 1997). Insgesamt umfasst die Familie der Sar Proteine wenigstens 11 verschiedene Proteine, welche auf ähnliche Weise die Regulation der Virulenz beeinflussen und von denen einige Vertreter wie SarA, SarR und SarX sowohl in *S. aureus* als auch *S. epidermidis* nachgewiesen werden konnten (rezensiert in Cue *et al.*, 2012).

Ferner verfügen Staphylokokken über eine Gruppe von alternativen Sigmafaktoren, von denen σ^B bis heute am besten untersucht wurde. In *S. aureus* erfolgt die Aktivierung von σ^B in Reaktion auf Stressfaktoren wie hohe Temperaturen, osmotischer Schock oder extreme pH-Werte (Senn *et al.*, 2005; rezensiert in Novick, 2003; Kullik & Giachino, 1997). Da die Transkription und Synthese von Virulenzfaktoren häufig durch Stress in Bezug auf wechselnde Umweltfaktoren und Nährstoffangebot beeinflusst wird, wurde σ^B aufgrund seiner stressabhängigen Aktivierung in Hinblick auf eine regulative Funktion auf Virulenzfaktoren umfassend

untersucht. So hat σ^B einen direkten oder indirekten Einfluss auf etwa 200 Gene, darunter eine Reihe wichtiger Virulenzfaktoren wie das α -Hämolysin. Ebenso konnte ein Einfluss auf die Expression globaler Regulatoren von Virulenzfaktoren wie SarA und RNAlII bereits nachgewiesen werden (Pane-Farre *et al.*, 2006; Bischoff *et al.*, 2004). In *S. epidermidis* wurde ein *sigB* Operon mit vergleichbarer Funktion zu dem von *S. aureus* identifiziert (Kies *et al.*, 2001).

2.4 Biofilmbildung in Staphylokokken

S. aureus und insbesondere *S. epidermidis* sind eine häufige Ursache Biofilm-assoziiierter Infektionen, welche vor allem durch den steigenden Einsatz von Biomaterialien in der Medizintechnik zunehmend an Bedeutung gewinnen. Ein Biofilm ist eine an eine Oberfläche anhaftende mikrobielle Gemeinschaft, die in einer selbst synthetisierten Matrix eingebettet ist. Innerhalb solcher Biofilme zeigen Staphylokokken eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Abwehrmechanismen des Wirts, Antibiotikatherapien und Bioziden (Molina-Manso *et al.*, 2013; rezensiert in Arciola *et al.*, 2012; rezensiert in Boles & Horswill, 2011). Die Ausbildung eines Biofilms in Staphylokokken ist sehr komplex und kann im Wesentlichen in drei Phasen unterteilt werden: initiale Adhäsion, Reifung und Ablösung (rezensiert in Otto, 2013) (Abb. 2.1).

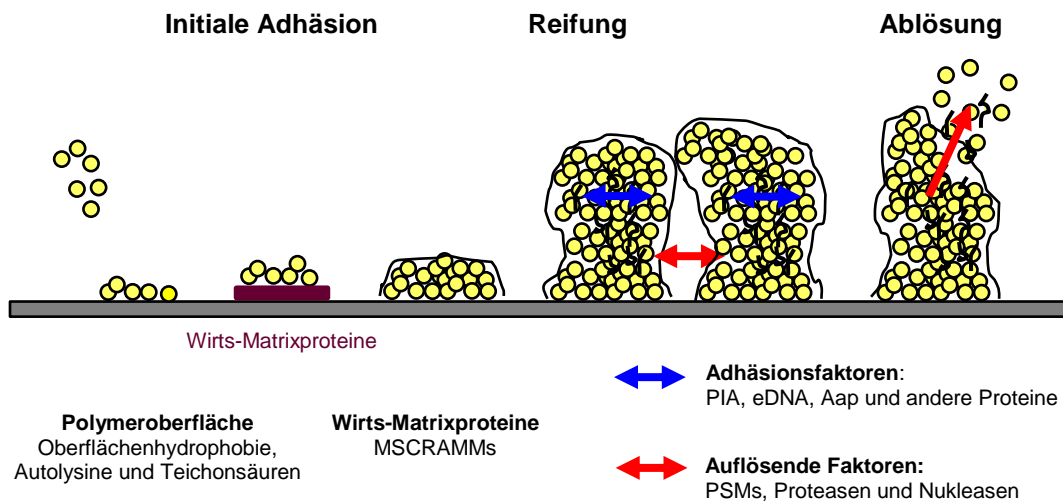


Abb. 2.1: Phasen der Biofilmbildung. Die Biofilmbildung umfasst die initiale Adhäsion, Reifung und anschließende Ablösung von Zellen. Die initiale Adhäsion kann direkt an eine Oberfläche (z.B. Polymeroberfläche) oder an Wirts-Matrixproteine, die diese Oberfläche schon kurz nach der Implantation besiedeln, erfolgen. Bei der Reifung des Biofilms kommt es zur Agglomeration von Zellen, wobei verschiedene Adhäsionsfaktoren eine Rolle spielen. Die charakteristischen Kanäle innerhalb der Biofilmmatrix und die letzte Phase der Ablösung sind von auflösenden Faktoren abhängig. Abkürzungen: Aap („accumulation-associated protein“); eDNA (extrazelluläre DNA); MSCRAMMs („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“); PIA (interzelluläres Polysaccharid Adhäsion); PSMs („phenol-soluble modulins“) (nach Otto, 2013).

Die initiale Anheftung kann an abiotischem und biotischem Material erfolgen. Bei der Anheftung an abiotisches Material wie Polymeroberflächen vieler medizintechnischer Produkte spielen hauptsächlich hydrophobe, elektrostatische und Lifshitz - Van der Waals Wechselwirkungen (rezensiert in Arciola *et al.*, 2012) sowie Autolysine (Heilmann *et al.*, 1997) und Teichonsäuren (Gross *et al.*, 2001) eine Rolle. Im Falle der Anheftung an biotisches Material, was besonders bei implantiertem Fremdkörpermaterial aufgrund der schnellen Anlagerung von Matrixproteinen des Wirts von Bedeutung ist, haben verschiedene Proteine aus der Gruppe der MSCRAMMs durch eine Bindung an die Wirts-Proteine eine sehr wichtige Funktion (rezensiert in Otto, 2013). Im Verlauf der Reifung des Biofilms kommt es zur interzellulären Aggregation der akkumulierenden Zellen, wobei insbesondere die Produktion von Exopolysacchariden eine wichtige Komponente ist. Das wichtigste Exopolysaccharid in Hinblick auf die Biofilmbildung von Staphylokokken ist PIA (interzelluläres Polysaccharid Adhäsion), auch als PNAG („poly-N-acetylglucosamin“) bekannt. Die PIA-Synthese wird durch die Produkte des *icaADBC*-Lokus

hervorgerufen. Zum *ica*-Operon gehört des Weiteren der Regulator IcaR, welcher die Transkription des *icaADBC*-Lokus negativ beeinflusst (rezensiert in Cue *et al.*, 2012; rezensiert in Otto, 2008). Neben der PIA-vermittelten Biofilmbildung gibt es auch eine von PIA unabhängige Ausbildung eines Biofilms. Hier spielen Teichonsäuren, sowie verschiedene Proteine wie Aap („accumulation-associated protein“), Bap (Biofilm-assoziiertes Protein) Emp (extrazelluläres Matrix-bindendes Protein), Protein A und SasG („*S. aureus* surface protein G“) eine wichtige Rolle bei der initialen Anheftung und der Zell-Zell-Adhäsion. Darüber hinaus konnte extrazelluläre DNA (eDNA) als eine weitere wichtige Komponente des PIA-abhängigen wie -unabhängigen Biofilms von Staphylokokken identifiziert werden (rezensiert in Otto, 2013; rezensiert in Arciola *et al.*, 2012). Bei der Ausbildung der charakteristischen Kanäle innerhalb der Biofilmmatrix sowie der Ablösung von Zellen aus dem reifen Biofilm zur Initiierung eines neuen Zyklus und Ausbreitung der Infektion übernehmen PSMs („phenol-soluble modulins“), Proteasen und Nukleasen eine wichtige Funktion. Sie führen zu einer Auflösung von Zell-Zell-Interaktionen innerhalb des Biofilms (rezensiert in Otto, 2013; rezensiert in Boles & Horswill, 2011).

Die Regulation der Biofilmbildung von Staphylokokken ist sehr komplex und hängt von vielen Faktoren wie einer Vielzahl von Umwelteinflüssen, darunter Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit, Osmolarität, Glukose und Ethanol ab und wird über eine Reihe von Regulatoren beeinflusst (rezensiert in Cue *et al.*, 2012). Als wichtige Regulatoren des *ica* Operons sollten IcaR, der alternative Sigmafaktor σ^B und das DNA-Bindeprotein SarA genannt werden (rezensiert in Arciola *et al.*, 2012). Eine weitere Komponente bei der Regulation der Biofilmbildung ist die Zell-Zell Kommunikation („quorum sensing“) innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft. Das quorum sensing wird in Staphylokokken vom *agr*-System (rezensiert in Otto, 2013) und über LuxS (rezensiert in Cue *et al.*, 2012) vermittelt und spielt eine tragende Rolle bei der Biofilmbildung in Staphylokokken. Weitere Regulatoren mit Einfluss auf die Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* sind unter anderem SaeRS (Lou *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2008), ArlRS (Wu *et al.*, 2012; Fournier & Hooper, 2000) sowie TcaR und Rfb (rezensiert in Cue *et al.*, 2012).

Für *S. aureus* und *S. epidermidis* ist bekannt, dass die Verfügbarkeit von Glukose sowie Bedingungen während denen der Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus)

reprimiert ist, zu einer erhöhten Transkription von *icaADBC*, Produktion von PIA sowie einer verstärkten Biofilmbildung führen (Sadykov *et al.*, 2008; Seidl *et al.*, 2008a; Dobinsky *et al.*, 2003). Neben den zuvor genannten Regulatoren der Biofilmbildung wurde mit CcpA (Katabolit-Kontrollprotein A), dem zentralen Regulator der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) in gram-positiven Bakterien, ein essentieller Faktor für die Fähigkeit zur Biofilmbildung in *S. aureus* identifiziert (Seidl *et al.*, 2008a). Für *S. epidermidis* ist ein derartiger Einfluss von CcpA bislang nicht bekannt. Da *S. epidermidis* ein bedeutsamer Auslöser Biofilm-assoziiierter Infektionen ist, stellt sich aktuell die Frage, ob CcpA auch in dieser Spezies ein wichtiger Regulator der Biofilmbildung ist. Ein umfassender Überblick zur KKR wird im folgenden Abschnitt gegeben.

2.5 Kohlenstoff-Katabolitrepression in gram-positiven Bakterien

Die meisten Bakterien sind in der Lage, eine Vielzahl von Nährstoffquellen zu nutzen und verfügen dafür über eine Vielzahl metabolischer Enzyme. Trotz dieser Möglichkeit besitzen sie aber Kontrollmechanismen zur ökonomisch sinnvollen, bevorzugten Aufnahme bestimmter Kohlenstoffquellen, welche mit dem geringsten Aufwand verwertet werden können und der Zelle viel Energie liefern. Dies ist bei vielen Bakterien Glukose (rezensiert in Görke & Stülke, 2008). Eine solche präferentielle Nutzung von Kohlenstoffquellen aus einem Nährstoffgemisch wird durch den Mechanismus der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) reguliert, welcher unter den Bakterien weit verbreitet ist. In Anwesenheit von Glukose wird über die KKR die Expression von Genen und Operons zur Verstoffwechslung anderer sekundärer Kohlenstoffquellen reprimiert. Gleichzeitig ist die Expression von Genen zur Aufnahme der präferierten Kohlenstoffquelle aktiv (rezensiert in Fujita, 2009; rezensiert in Deutscher, 2008). So kann die Zelle die für das Wachstum beste Energiequelle effizient und schnell aufnehmen. Die Mechanismen der KKR sind vielfältig und umfassen mehrere Regulatoren, welche im gram-positiven Modellorganismus *Bacillus subtilis* bereits gut untersucht sind (rezensiert in Fujita, 2009). In den folgenden Abschnitten werden die beiden KKR-Regulatoren CcpA und CcpC, welche Gegenstand dieser Arbeit sind, genauer erläutert. Eine wichtige Rolle der Signaltransduktion zur KKR spielen zunächst aber Komponenten des

Phosphoenolpyruvat–Phosphotransferasesystems (PEP-PTS) (rezensiert in Görke & Stülke, 2008), welches im Folgenden kurz vorgestellt wird.

2.5.1 Das Phosphoenolpyruvat – Phosphotransferasesystem (PEP-PTS)

Das PEP-PTS ist ein aktives Transportsystem zur Aufnahme verschiedener Kohlenstoffquellen, im Folgenden am Beispiel der Glukose vorgestellt, welches bisher ausschließlich bei Bakterien nachgewiesen wurde. Die Energie für die Aufnahme der Glukose wird durch die Dephosphorylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) bereitgestellt. Der Phosphatrest wird auf das Enzym I (EI) übertragen welches dann HPr („histidine-containing phosphocarrier protein“) an seinem Histidin-Rest 15 (His15) phosphoryliert. Über HPr wird der Phosphatrest im nächsten Schritt an den substratspezifischen Enzymkomplex Enzym II (EIIA und EIIB) übertragen, wobei der Phosphatrest letztlich bei der Aufnahme durch das membranständige Transportprotein EIIC von EIIB auf die Glukose übertragen wird. Glukose wird so als Glukose-6-Phosphat (Glukose-6-P) in die Zelle aufgenommen und über die Glykolyse weiter verwertet (rezensiert in Görke & Stülke, 2008; rezensiert in Deutscher *et al.*, 2006) (Abb. 2.2).

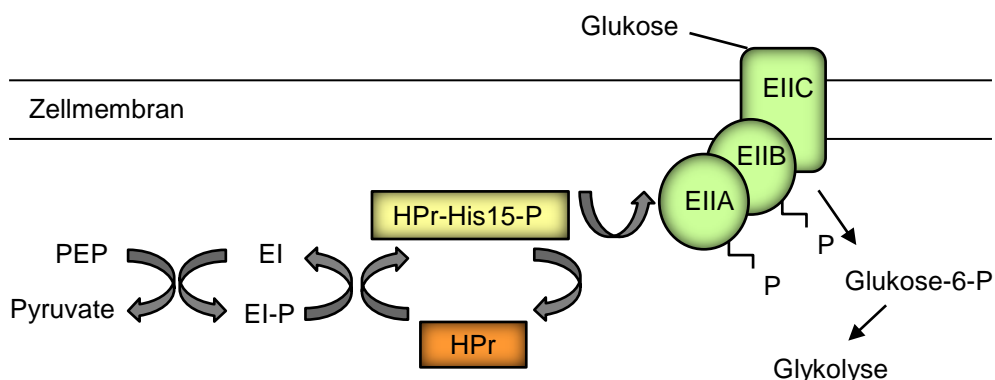


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des PEP-PTS-Systems am Beispiel Glukose. Die Dephosphorylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) führt zur Phosphorylierung von EI (EI-P). Dieses Phosphat wird im Anschluss auf das Histidin 15 (His15) des Proteins HPr transferiert. Schließlich phosphoryliert HPr-His15-P den zuckerspezifischen Komplex EII, der das Phosphat während der Aufnahme in die Zelle auf die Glukose überträgt (nach Lorca *et al.*, 2005).

2.5.2 Das Katabolit-Kontrollprotein A (CcpA)

In gram-positiven Bakterien gilt das Katabolit-Kontrollprotein A (CcpA), welches Teil der LacI/GalR-Familie transkriptioneller Regulatoren ist, als zentraler Regulator der KKR (Lorca *et al.*, 2005). Neben anderen Bakterien konnte CcpA auch in *S. aureus* als zentraler Regulator der KKR identifiziert werden (Seidl *et al.*, 2009; Seidl *et al.*, 2006).

Die regulatorische Aktivität von CcpA wird in *B. subtilis* durch die Interaktion mit einer phosphorylierten Form von HPr am Serin 46 und dessen Homolog Crh kontrolliert (rezensiert in Deutscher, 2008). Ist die bevorzugt verstoffwechselte Kohlenstoffquelle Glukose vorhanden, wird diese nach der PEP-PTS-abhängigen Aufnahme über die Glykolyse weiter abgebaut, was zu einem intrazellulären Anstieg an Fruktose-1,6-bisphosphat (FBP) und ATP führt. Dadurch wird das bifunktionelle Enzym HPr Kinase/Phosphorylase (HPrK/P) aktiviert, welches unter ATP-Verbrauch die Phosphorylierung von HPr am Serin 46 (Ser46) zu HPr-Ser46-P katalysiert. Dagegen führen geringe Konzentrationen an ATP und FBP und hohe Mengen an anorganischem Phosphat zur Dephosphorylierung von HPr-Ser46-P durch HPrK/P. HPr-Ser46-P bildet einen Komplex mit CcpA, welcher durch Glukose-6-P und FBP verstärkt wird und stimuliert so die Bindung dieses Komplexes an sogenannte *cre*'s („catabolite responsive element“), CcpA-Erkennungssequenzen der DNA. Über diesen Mechanismus kann die Transkription der entsprechenden mit diesem DNA-Bindungsmotiv versehenen Gene moduliert werden. Mit Ausnahme von Mykoplasmen wird der in *B. subtilis* beschriebene Mechanismus unter Beteiligung der Komponenten Hpr, HprK/P und CcpA für alle Firmicutes angenommen (rezensiert in Görke & Stülke, 2008) (Abb. 2.3).

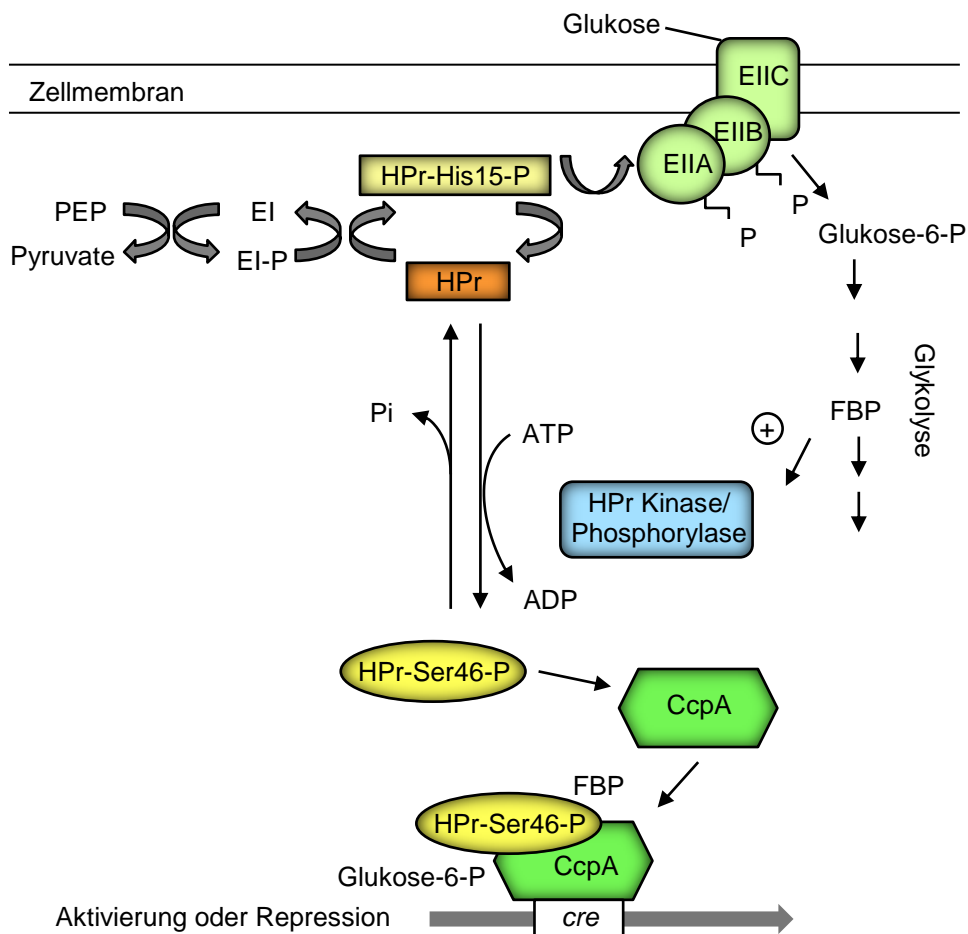


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der CcpA-vermittelten Kohlenstoff-Katabolitrepresion (KKR) in Firmicutes. Die über PEP-PTS aufgenommene Glukose führt über die Glykolyse zu einer erhöhten Konzentration an ATP und Fruktose-1,6-bisphosphat (FBP), welche die HPr Kinase/Phosphorylase (HPrK/P)-abhängige Phosphorylierung von HPr am Serin-46 (Ser46) stimuliert. HPr-Ser46-P bildet mit CcpA einen Komplex, welcher durch Glukose-6-P und FBP verstärkt wird. Dieser Komplex bindet dann an sogenannte *cre* („catabolite responsive element“) Erkennungssequenzen der DNA und so kann die Transkription von Genen moduliert werden (modifiziert nach Lorca *et al.*, 2005).

In Anwesenheit von Glukose ist die Expression von etwa 10 % aller Gene in *B. subtilis* signifikant beeinflusst, von denen ein Großteil auf eine Regulation durch CcpA zurückzuführen ist (rezensiert in Fujita, 2009; Moreno *et al.*, 2001). Insgesamt sind dabei für Proteine des TCA-Zyklus und zur Verstoffwechslung von sekundären Kohlenstoffquellen kodierende Gene reprimiert, während die für glykolytische Enzyme kodierenden Gene aktiviert sind (Lorca *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde in verschiedenen anderen gram-positiven Pathogenen wie *Streptococcus pyogenes* (Kinkel & McIver, 2008), *Streptococcus mutans* (Abranches *et al.*, 2008),

Enterococcus faecalis (Gao *et al.*, 2013), *Clostridium perfringens* (Mendez *et al.*, 2008), *Clostridium difficile* (Antunes *et al.*, 2011) und *Bacillus anthracis* (Chiang *et al.*, 2011) auch ein Effekt von CcpA auf die Regulation von Virulenzfaktoren beobachtet. In *S. aureus* konnten Seidl *et al.* (2009, 2006) einen ähnlich wichtigen Einfluss von CcpA auf das Transkriptom und die Expression von Virulenzfaktoren nachweisen. Dort ergab eine Transkriptom- und Proteomanalyse, dass CcpA mehr als 100 Gene in diesem Pathogen reguliert. Vergleichbar zu *B. subtilis* führt CcpA in Anwesenheit von Glukose auch in *S. aureus* zu einer Repression von Genen des TCA-Zyklus, darunter *citZ* und *citB*, welche für die Enzyme Citrat-Synthase bzw. Aconitase kodieren (Seidl *et al.* 2009; Seidl *et al.* 2008a). Darüber hinaus werden zahlreiche Virulenzfaktoren dieses Pathogens über CcpA reguliert. So hat CcpA unter anderem einen Einfluss auf die Antibiotikaresistenz-Niveaus von MRSA (Methicillin-resistente *S. aureus*) und GISA (Glycopeptid-intermediärresistente *S. aureus*) (Seidl *et al.*, 2006), die Biofilmbildung (Seidl *et al.*, 2008a), sowie die Expression von Toxinen wie *hla* (kodiert für α -Hämolyysin) (Seidl *et al.*, 2006) und *tst* (kodiert für das Toxische-Schock-Syndrom-Toxin) (Seidl *et al.*, 2008b). Auch die Expression von RNAIII, dem wichtigen Effektor-Molekül des *agr*-Systems, wird durch CcpA beeinflusst (Seidl *et al.*, 2006).

Bemerkenswerterweise hat CcpA auch einen Einfluss auf die Expression zahlreicher Gene in Abwesenheit von Glukose (Seidl *et al.*, 2009). Die genauen Mechanismen, ob und wie CcpA seine DNA-Bindeaktivität in Abwesenheit von Glukose erlangt und ob HPr auch unter diesen Bedingungen eine Rolle spielt, sind bisher jedoch unklar. Jüngst konnte ein Einfluss der Serin/Threonin Proteinkinase Stk1 (syn. PknB) von *S. aureus* auf zentrale metabolische Prozesse wie Glykolyse und TCA-Zyklus (Donat *et al.*, 2009) sowie die Aktivität wichtiger Regulatoren dieses Pathogens wie z.B. MgrA (Truong-Bolduc & Hooper, 2010) und SarA (Didier *et al.*, 2010) identifiziert werden. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob Stk1 möglicherweise auch einen regulatorischen Einfluss auf den zentralen Regulator CcpA der KKR hat.

2.5.3 Das Katabolit-Kontrollprotein C (CcpC)

Ein weiterer wichtiger Regulator der KKR in gram-positiven Bakterien ist das zur LTTR-Familie (LysR-type transcriptional regulator) gehörende Katabolit-Kontrollprotein C (CcpC), welcher zuerst für *B. subtilis* beschrieben (Jourlin-Castelli *et al.*, 2000) und später auch in *Listeria monocytogenes* (Mittal *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006) identifiziert und charakterisiert wurde. CcpC aus *B. subtilis* ist ein Repressor der TCA-Zyklus Gene *citZ* und *citB*, dessen Aktivität durch Citrat und Transkription durch CcpA beeinflusst werden kann. CcpA kontrolliert zum einen durch eine direkte Repression von *citZ* die Synthese von Citrat. Sinkt der intrazelluläre Spiegel an FBP und ATP, so verliert CcpA seine reprimierende Wirkung auf *citZ* und es kann vermehrt Citrat synthetisiert werden. Eine steigende Citrat-Konzentration inaktiviert die Bindung von CcpC an *citZ* und *citB*, was zu einer verstärkten Transkription dieser Gene und somit zur Aktivierung des TCA-Zyklus führt (rezensiert in Sonenshein, 2007) (Abb. 2.4).

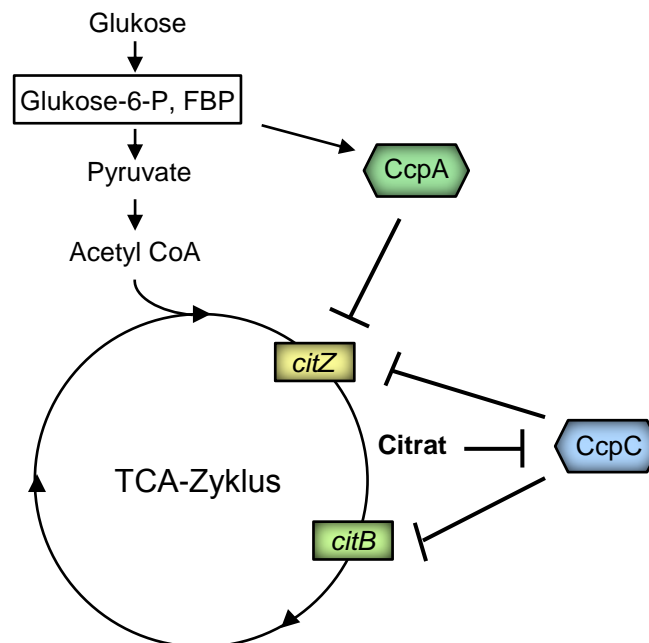


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Regulation der TCA-Zyklus Gene *citZ* und *citB* durch CcpC und CcpA in *B. subtilis*. Die Aktivität von CcpC und CcpA wird durch die Konzentration der Metabolite Citrat (CcpC) bzw. Glukose-6-P und FBP (CcpA) beeinflusst (modifiziert nach Sonenshein, 2007).

Zum anderen kann die Transkription von *ccpC* autoregulatorisch durch CcpC sowie durch CcpA beeinflusst werden (Kim *et al.*, 2002). Kürzlich zeigten Mittal *et al.* (2013), dass CcpC nicht nur ein Repressor von *citB* zu sein scheint, sondern bei steigender Citratkonzentration auch über eine vermutete Interaktion mit der RNA-Polymerase als Aktivator der Transkription von *citB* fungiert. Die genauen Mechanismen, wie CcpC in diesem Zusammenhang zum Aktivator wird, sind aber noch nicht eindeutig geklärt.

Somit stellt CcpC neben CcpA einen wichtigen Regulator der Aktivität des TCA-Zyklus dar. Darüber hinaus sollte in diesem Zusammenhang auch der Regulator CodY erwähnt werden, welcher neben CcpC als weiterer direkter Repressor von *citB* fungiert. Die Aktivität von CodY wird durch die Konzentration an GTP und/oder verzweigtkettiger Aminosäuren (BCAA; „branched chain amino acids“) beeinflusst (rezensiert in Sonenshein, 2007).

Anhand zahlreicher Studien ist bekannt, dass die Aktivität des TCA-Zyklus eng mit der Virulenz von *S. aureus* verknüpft ist (Sadykov *et al.*, 2010a; Zhu *et al.*, 2009; Somerville *et al.*, 2003; Somerville *et al.*, 2002). Mit CcpA (Seidl *et al.*, 2009) und CodY (Pohl *et al.*, 2009) konnte bereits für zwei Regulatoren der KKR eine derartige Verknüpfung von Metabolismus und Virulenz in diesem Pathogen nachgewiesen werden. Ob CcpC auch in *S. aureus* vorkommt, ist bisher noch nicht untersucht worden. Im Falle eines Vorhandenseins von CcpC könnte dieses Regulatorprotein neben CcpA und CodY neue Einblicke in die bedeutende Verknüpfung von Metabolismus und Virulenz dieses wichtigen Pathogens geben.

2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Bakterien besitzen zahlreiche Mechanismen, um sich schnell und flexibel wechselnden Umweltbedingungen anzupassen. Dabei wird die Anpassung an verschiedene Nahrungsquellen vor allem durch den wichtigen Mechanismus der KKR reguliert. Bei pathogenen Bakterien ist die Erschließung von Nahrungsquellen darüber hinaus meist eng mit deren Virulenz verknüpft. CcpA konnte jüngst neben einigen anderen Bakterien auch in *S. aureus* als zentraler Regulator der KKR identifiziert werden. Neben seiner Funktion als Regulator des Metabolismus schafft er auch eine Vernetzung zur Virulenz dieses Pathogens. Ein besseres Verständnis des Metabolismus und dessen enge Verknüpfung zur Virulenz können einen wichtigen Beitrag zur erfolgreichen Bekämpfung dieses Pathogens leisten. Vor diesem Hintergrund ist die Gewinnung neuer Erkenntnisse zu Regulatoren der KKR und deren Verknüpfung zur Virulenz in den klinisch bedeutenden Staphylokokken-Spezies *S. aureus* und *S. epidermidis* das zentrale Ziel dieser Arbeit. Dazu sollten die folgenden drei wichtigen Fragestellungen bearbeitet werden:

- (1) In *S. aureus* konnte CcpA als essentieller regulatorischer Faktor zur Fähigkeit der Biofilmbildung identifiziert werden. Für *S. epidermidis* ist ein derartiger Einfluss von CcpA jedoch bisher nicht bekannt. An diesem Punkt sollte diese Arbeit ansetzen und zur Aufklärung beitragen, ob CcpA auch in diesem bedeutenden pathogenen Auslöser Biofilm-assoziiierter Fremdkörperinfektionen für die Entstehung von Biofilmen von Bedeutung ist.
- (2) In Analogie zur Regulation der Aktivität von CcpA in *B. subtilis* wird auch für *S. aureus* angenommen, dass die regulatorische Aktivität von CcpA in Anwesenheit von Glukose über die Interaktion des Regulators mit HPr-Ser46-P kontrolliert wird. CcpA hat darüber hinaus aber auch einen Einfluss auf Gene in Abwesenheit von Glukose und wird daher scheinbar auch über andere Wege in seiner DNA-Bindeaktivität beeinflusst. In vorangegangenen Arbeiten zu dieser Doktorarbeit zeigte sich, dass CcpA mittels der Serin/Threonin Proteinkinase Stk1 in seiner DNA-Bindedomäne phosphoryliert werden kann, was *in vitro* zu einem Verlust der Bindefähigkeit an seine *cre* Sequenzen führt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand von phosphoablativer und phosphomimetischer Komplementationen einer *ccpA* Mutante *in vivo* die physiologische Relevanz einer solchen

Phosphorylierung von CcpA in Hinblick auf bekannte CcpA-Phänotypen untersucht werden.

- (3) Neben CcpA gibt es in *S. aureus* vermutlich noch weitere Regulatoren der KKR, welche in *B. subtilis* bereits gut untersucht wurden. So weisen Genomvergleiche zwischen *B. subtilis* und *S. aureus* darauf hin, dass auch *S. aureus* ein CcpC Homolog bilden könnte. Aufgrund der engen Verknüpfung des TCA-Zyklus mit der Virulenz von *S. aureus* könnte dieses mutmaßliche CcpC Homolog neben CcpA in diesem Pathogen eine bedeutende Rolle in der Virulenz spielen. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit dieses putative CcpC Homolog erstmalig in diesem Pathogen charakterisiert werden. Dazu sollte eine Deletions-Mutante des putativen Homologs hergestellt und der Einfluss dieses möglichen Regulators auf den Metabolismus und die Virulenz in *S. aureus* untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Tab. 3.1: Verwendete Bakterienstämme dieser Arbeit

Bakterienstamm	Relevante Merkmale / Genotyp	Quelle / Referenz
<i>S. epidermidis</i>		
1457	<i>S. epidermidis</i> , Wildtyp	Mack <i>et al.</i> , 1992
1457 $\Delta ccpA$	1457 $\Delta ccpA$, Em ^R	Sadykov <i>et al.</i> , 2011
1457 $\Delta ccpA$ -compl	Stamm 1457 $\Delta ccpA$ mit wiederhergestelltem Wildtypallel von <i>ccpA</i> , Tc ^R	Sadykov <i>et al.</i> , 2011
<i>S. aureus</i>		
RN4220	Restriktion-negativer Stamm, 8325 Derivat	Kreiswirth <i>et al.</i> , 1983
THa Newman	RN4220 $\Delta ccpE::lox66-aphAIII-lox71$, Kan ^R Klinisches Isolat (ATCC 25904), Kapsuläre Polysaccharide Typ 5 (CP5)	Diese Arbeit Duthie, 1952
TH01 TH01c	Newman $\Delta ccpE::lox72$ TH01 mit dem am NWMN_0640 Locus <i>cis</i> -integrierten Plasmid TH01c, was zu in einer Verdopplung des NWMN_0640 Gens führt, <i>ccpE</i> ⁺ , Tc ^R	Diese Arbeit Diese Arbeit
Newman*pSB2035	Stamm Newman, welcher das Plasmid pSB2035 trägt, Cm ^R	(M. Bischoff)
TH01*pSB2035	Stamm TH01, welcher das Plasmid pSB2035 trägt, Cm ^R	(M. Bischoff)
TH01c*pSB2035	Stamm TH01c, welcher das Plasmid pSB2035 trägt, Cm ^R	(M. Bischoff)
RN4220*pTH3	Stamm RN4220, welcher das Plasmid pTH3 trägt, Tc ^R	Diese Arbeit
RN4220*pTH4	Stamm RN4220, welcher das Plasmid pTH4 trägt, Tc ^R	Diese Arbeit
TH01*pTH3	Stamm TH01, welcher das Plasmid pTH3 trägt, Tc ^R	Diese Arbeit
TH01*pTH4	Stamm TH01, welcher das Plasmid pTH4 trägt, Tc ^R	Diese Arbeit
SA113	ATCC35556, PIA-abhängiger Biofilm-Bildner, NCTC 8325 Derivat, <i>rsbU</i>	Iordanescu & Surdeanu, 1976
KS66	SA113 $\Delta ccpA$, Biofilm-negatives Derivat von SA113, Tet ^R	Seidl <i>et al.</i> , 2008a
RN4220*pCN34_ <i>ccpA</i>	Stamm Rn4220, welcher das Plasmid pCN34_ <i>ccpA</i> trägt, Tet ^R , Kan ^R	Diese Arbeit
RN4220*pCN34_ <i>ccpA</i> _ <i>Ala</i>	Stamm RN4220, welcher das Plasmid pCN34_ <i>ccpA</i> _ <i>Ala</i> trägt, Tet ^R , Kan ^R	Diese Arbeit
RN4220*pCN34_ <i>ccpA</i> _ <i>Asp</i>	Stamm RN4220, welcher das Plasmid pCN34_ <i>ccpA</i> _ <i>Asp</i> trägt, Tet ^R , Kan ^R	Diese Arbeit

KS66*pCN34_ccpA	Stamm KS66, welcher das Plasmid pCN34_ccpA trägt, Tet ^R , Kan ^R	Diese Arbeit
K66*pCN34_ccpA_Ala	Stamm KS66, welcher das Plasmid pCN34_ccpA_Ala trägt, Tet ^R , Kan ^R	Diese Arbeit
K66*pCN34_ccpA_Asp	Stamm KS66, welcher das Plasmid pCN34_ccpA_Asp trägt, Tet ^R , Kan ^R	Diese Arbeit
Echerichia coli		
DH5α	<i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>deoR endA1 gyrA96 recA1 relA1 supE44 thi-1 F</i> λ ⁻ Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 φ80 <i>lacZ</i> ΔM15	Invitrogen
SCS110	<i>dam dcm rpsL</i> (Str ^r) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx supE44</i> □(<i>lac-proAB</i>) [<i>F'</i> <i>traD36 proAB lac^fZ</i> □M15]	Stratagene
B. subtilis		
AF21	Δ <i>amyE</i> ::Φ(<i>citBp21-lacZ cat</i>), Cm ^R	Fouet & Sonenshein, 1990
CJB9	Δ <i>amyE</i> ::Φ(<i>citBp21-lacZ cat</i>) <i>ccpC</i> :: <i>spc</i> , Cm ^R , Spc ^R	Jourlin-Castelli <i>et al.</i> , 2000
CJB9*pTH3	Stamm CJB9, welcher das Plasmid pTH3 trägt, Cm ^R , Spc ^R , Tc ^R	Diese Arbeit
CJB9*pTH4	Stamm CJB9, welcher das Plasmid pTH4 trägt, Cm ^R , Spc ^R , Tc ^R	Diese Arbeit

3.1.2 Plasmide

Tab. 3.2: Verwendete Plasmide dieser Arbeit

Plasmid / Vektor	Relevante Merkmale	Referenz
pBT	1,6 kb PCR Fragment des <i>tet</i> (L) Gens aus pHY300PLK im Alw26I-verdauten pBC SK(+) (Stratagene), Tc ^R	Giachino <i>et al.</i> , 2001
pBT2-arcA	Vektor zum Allel-Austausch von <i>S. aureus arcA</i> , welcher die <i>lox66-aphAIII-lox71</i> Resistenzkassette enthält; Kan ^R	Leibig <i>et al.</i> , 2008
pBus1	<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> Shuttle-Vektor mit einer MCS aus pBluescript II SK (Stratagene) und einer <i>rrnT14</i> Terminatorsequenz aus pLL2443; Tc ^R	Rossi <i>et al.</i> , 2003
pRAB1	<i>cat</i> , <i>bla</i> , P _{pagA} - <i>cre</i> ; pBT2 Derivat, Expression von Cre in Staphylokokken, Cm ^R	Leibig <i>et al.</i> , 2008
pBT_ccpE-up	pBT mit einem 638 bp großen Fragment der oberhalb von <i>ccpE</i> liegenden Region, Tc ^R	Diese Arbeit
pBT_ccpE-up-down	pBT mit einem 1,5 kb großen Fragment der flankierenden Regionen von <i>ccpE</i> , Tc ^R	Diese Arbeit
pTH2	pBT mit einem 3,1 kb Fragment der flankierenden Regionen von <i>ccpE</i> und der <i>lox66-aphAIII-lox71</i> Resistenzkassette, welche den <i>ccpE</i> OLR vollständig ersetzt, Tc ^R , Kan ^R	Diese Arbeit
pTH2c	pBT mit einem 2 kb Fragment des <i>ccpE</i> OLR und 1 kb der stromaufwärts liegenden Region mit dem NWMN_0640 OLR, Tc ^R	Diese Arbeit

pTH3	pBus1 mit einem 1,7 kb Fragment mit den <i>B. subtilis</i> <i>ccpC</i> Promotoren P1/P2 und dem <i>ccpC</i> OLR, Tc ^R	Diese Arbeit
pBus1_ <i>ccpE</i>	pBus1 mit einem 932 bp großen Fragment mit dem <i>ccpE</i> OLR, Tc ^R	Diese Arbeit
pTH4	pBus1 mit einem 1,7 kb fragment mit den <i>B. subtilis</i> <i>ccpC</i> Promotoren P1/P2 und dem <i>ccpE</i> OLR, Tc ^R	Diese Arbeit
pSB2025	<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> Shuttle-Vektor mit dem <i>cat</i> gene für Chloramphenicol-Resistenz (Cm ^R), sowie ein <i>gfp-lux</i> Reporterplasmid mit dem <i>agr</i> P3 Promoter	Qazi <i>et al.</i> , 2001
pCN34	<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> Shuttle-Vektor, Amp ^R in <i>E. coli</i> , Kan ^R in <i>S. aureus</i>	Charpentier <i>et al.</i> , 2004
pCN34_ <i>ccpA</i>	pCN34 mit <i>ccpA</i> und dessen nativem Promoter, Amp ^R in <i>E. coli</i> , Kan ^R in <i>S. aureus</i>	Leiba <i>et al.</i> , 2012
pCN34_ <i>ccpA</i> _Ala	pCN34 mit einem <i>ccpA</i> Derivat mit den CcpA_T18A/T33A Mutationen unter der Kontrolle des <i>ccpA</i> Promoters, Amp ^R in <i>E. coli</i> , Kan ^R in <i>S. aureus</i>	Leiba <i>et al.</i> , 2012
pCN34_ <i>ccpA</i> _Asp	pCN34 mit einem <i>ccpA</i> Derivat mit den CcpA_T18D/T33D Mutationen unter der Kontrolle des <i>ccpA</i> Promoters, Amp ^R in <i>E. coli</i> , Kan ^R in <i>S. aureus</i>	Leiba <i>et al.</i> , 2012

3.1.3 Oligonukleotide

Alle in Tab. 3.3 aufgeführten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) bezogen. Die Stammlösungen der Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100 pmol/μl in MilliQ-H₂O hergestellt und für die Gebrauchslösungen 1:10 mit MilliQ-H₂O verdünnt. Für die Stammlösungen (100 pmol/μl) und die 1:20 Verdünnungen für die Gebrauchslösungen der Real-Time PCR Primer wurde LiChrosolv[®] Wasser (Merck, Darmstadt) verwendet. Stamm- und Gebrauchslösungen wurden bei -20°C gelagert.

Tab. 3.3: Verwendete Oligonukleotide dieser Arbeit

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3') ^a
Oligonukleotide zur Klonierung und Sequenzierung	
MBH152	GCAAATTGAGCTCTATCTTTAGAGC
MBH153	gtcgtGATCCGAGCATGTTGCAATTGCC
MBH154	gtcggtagcCTGGCGTCGCCTAATTGATAGG
MBH155	gtcctcgaGTATGGCTGCAGCTTGAATTAC
MBH162	CCAATTCTCGTTTTTCATACCTC
MBH170	GACAAGGAGTTGGTGACTGTG
MBH225	gtcggatcCAGAATAGATTTGATGCTTCAGC
MBH226	gtcgggtACCAACTACGTTCAATTTAACCG
MHB239	ggggtcgacTATGAAGATTGAAGACTATCGTTTAC
MBH255	gtcggtagcTGATTTTCAATATCATATGTATCAC
MBH338	GCATGTcGaCCTCCTTTTTGTTATCAATAAG
MBH341	ctgtctAGATCAACGATATAGAGACAGGG

5'-RACE

5'-RACE-Adapter	GAUAUGCGCGAAUUCUGUAGAACGAACACUAGAAGAAA
NWMN_0640-RT	TCTACTGTACACGCATTACC
NWMN_0640-PCR	CGTGAATAAGCCTATAATACCC
RACE_PCR_5'	GATATGCGCGAATTCCTGTAGAACG

Real-Time PCR Primer

<i>ccpA</i> forward	AAAGGCAATTTGCCAGATGC
<i>ccpA</i> reverse	AATTGCTTCTTCGTGCTGATAC
<i>citZ</i> forward	CCGTAGGTTCTCTGAAAGGGC
<i>citZ</i> reverse	AACATCGTCATAACTTGTTCTGTTG
<i>hla</i> forward	AACCCGGTATATGGCAATCAACT
<i>hla</i> reverse	CTGCTGCTTTCATAGAGCCATTT
<i>citB</i> forward	CAAGATCATCAAGTGCCTATTCGT
<i>citB</i> reverse	CGTGATTACCACGTCTTGAACC
<i>ccpE</i> forward	CCGCTGATTCGTTGACAT
<i>ccpE</i> reverse	CAATTGCAACATGCTCGGAT
NWMN_0640 forward	AGAGGTGACGGTAGTTGGACAAA
NWMN_0640 reverse	TTGCAACCATTTATAATTGTCATCTG
<i>capA</i> forward	GAAAATACGCAACTTATCAACATCCA
<i>capA</i> reverse	TTTTTTCCGAATCTTGTGTTATGACC
<i>psmA</i> forward	ATCAACAACACTCATCACTATGTTAAATCAAC
<i>psmA</i> reverse	GCCATCGTTTTGTCTCCTGT
<i>gyrB</i> forward	GACTGATGCCGATGTGGA
<i>gyrB</i> reverse	AACGGTGGCTGTGCAATA
<i>Se icaD</i> forward	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG
<i>Se icaD</i> reverse	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA
<i>Se gyrB</i> forward	CTAATGCTGATTACGACGCGTAA
<i>Se gyrB</i> reverse	TCTGTAGGACGCATTATTGTTGAAA
<i>Bs ccpC</i> forward	TGTGGAAAAGTATCCGAATGCA
<i>Bs ccpC</i> reverse	CTGCTCCACCCGGTTATGA
<i>Bs citB</i> forward	TAATCGGCGCGAAACTTGTC
<i>Bs citB</i> reverse	CAGTAGCTGTTGTTCCGTTTGG
<i>Bs gyrB</i> forward	CATTGGCGAAACGGATCATA
<i>Bs gyrB</i> reverse	GGGTCCGGGACAAAATGTG

^a Kleinbuchstaben repräsentieren Nukleotide, die nicht mit der Zielsequenz übereinstimmen. Restriktionsschnittstellen zur Klonierung sind unterstrichen.

3.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die benötigten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), VWR (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Biozym (Hess. Oldendorf), Bio-Rad (München), Qiagen (Hilden), Invitrogen (Darmstadt), Peqlab (Erlangen), Millipore (Billerica, USA), PerkinElmer (Waltham, USA), Whatman (NJ, USA), Greiner Bio One (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nürnberg) und MP Biomedicals (Eschwege) bezogen.

3.1.5 Nährmedien

Die eingesetzten Bakterienstämme (Tab. 3.1) wurden nach allgemein gültigen Arbeitsprotokollen ausgestrichen und kultiviert. Die dabei verwendeten Nährmedien sind in Tab. 3.4 aufgeführt. Zu bestimmten Methoden gehörige Medien sind bei den jeweiligen Methoden aufgelistet. Die als Fertigprodukte bezogenen Nährmedien wurden nach Herstellerangaben in MilliQ-H₂O angesetzt und sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm). Bei der Verwendung der Nährmedien als Festmedium wurde 1,5% Agar zugegeben und dieses anschließend autoklaviert.

Tab. 3.4: Verwendete Nährmedien

Nährmedium / Agar	Zusammensetzung / Hersteller
Agar	BD Bacto™, Heidelberg
LB Broth Lennox (LB-L)	BD Difco™, Heidelberg
Tryptic Soy Broth (TSB)	BD Bacto™, Heidelberg
Typticase™ Soy Agar II (TSA) + 5% Schafsblut	BD, Heidelberg
TSS Minimalmedium	0,05 M Tris (pH 7,5) 40 mg/ml FeCl ₃ *6H ₂ O 40 mg/ml C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ *2H ₂ O 2,5 mM K ₂ HPO ₄ 0,02% (w/v) MgSO ₄ *7H ₂ O sterilfiltriert

3.1.6 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika sind in Tab. 3.5 aufgelistet. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte in der gewünschten einzusetzenden Konzentration nach Abkühlung der Medien auf ca. 50°C. Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

Tab. 3.5: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung (gelöst in)	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml (MilliQ-H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	10 mg/ml (100% EtOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Erythromycin	10 mg/ml (100% EtOH)	Fluka, Buchs, Schweiz
Kanamycin	50 mg/ml (MilliQ-H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	8 mg/ml (MilliQ-H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.7 Lösungen und Puffer

In Tab. 3.6 sind in dieser Arbeit verwendete Lösungen und Puffer aufgelistet. Zu bestimmten Methoden gehörige Lösungen und Puffer sind bei den jeweiligen Methoden aufgelistet. Zum Ansetzen der Lösungen und Puffer wurde sofern nicht anders angegeben MilliQ-H₂O, für Arbeiten mit RNA LiChrosolv[®] Wasser (Merck, Darmstadt) verwendet. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm), hitzestabile Lösungen autoklaviert.

Tab. 3.6: Allgemeine Lösungen und Puffer

Komponente	Konzentration / Menge
10x PBS	
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	14,2 g
KH ₂ PO ₄	2,7 g
H ₂ O	ad 1 l
autoklavieren; pH 7,2	
1x TE-Puffer	
Tris	1,21 g
EDTA	0,37 g
H ₂ O	ad 1 l
autoklavieren; pH 8,0	
TBS	
Tris	3 g
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
autoklavieren	
TBS-T	
Tween-20	0,1%
in TBS	
40% Glukose	
D(+)-Glucose	40 g
H ₂ O	ad 100 ml
sterilfiltrieren	
20% Glutamin	
L-Glutamin	20 g
H ₂ O	ad 100 ml
sterilfiltrieren	

3.1.8 Enzyme

In Tab. 3.7 sind die verwendeten Enzyme aufgelistet. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen handelt es sich um FastDigest™ Enzyme der Firma Fermentas (St. Leon-Rot), welche nach den Angaben des Herstellers verwendet wurden.

Tab. 3.7: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
FastStart High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
FastAP™	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lysostaphin	Genmedics, Reutlingen
RNase A	Qiagen, Hilden
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
SUPERase• In™ RNase Inhibitor	Ambion, Austin, USA
Tobacco Acid Pyrophosphatase	Epicentre Technologies, Madison, USA
T4 RNA Ligase 1	New England Biolabs, Ipswich, USA
DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.9 Kits

Tab. 3.8: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Qia-Prep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QiaQuick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin® RNA II Mini Kit	Machery-Nagel, Düren
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Power SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Turbo-DNA-free™	Ambion, Austin, USA
Citrate Synthase Assay Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNA 6000 Pico LabChip® Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
D-Glucose	R-Biopharm, Darmstadt
Acetic acid	R-Biopharm, Darmstadt
Ammonia	R-Biopharm, Darmstadt

3.1.10 Geräte

Tab. 3.9: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Helios Photometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gene Pulser, Pulse Controller, Capacity Extender	Bio-Rad, München
Gene Quant Pro Photometer	Biochrom, Berlin
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Molecular Imager ChemiDoc XRS System	Bio-Rad, München
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastPrep FP120	Qbiogene, Heidelberg
Sigma 4K15	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
StepOne™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermocycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer® compact	Eppendorf, Hamburg
Vitek Densicheck	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Vortex-Schüttler, VV 3	VWR, Darmstadt
Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Kippschüttler Rocky	Fröbel Labortechnik, Lindau
SDS Gelapparatur	von Keutz Labortechnik, Reiskirchen
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences, Freiburg
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Leica DMI4000 B	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Leica DFC420 C	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
BioFlux 200 Systems	Fluxion Biosciences, South San Francisco, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung und Konservierung der verwendeten Bakterienstämme

Die Kultivierung der verwendeten Bakterienstämme (Tab. 3.1) in Flüssigmedium erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, bei 37°C und 230 rpm (1:10 Verhältnis von Kultur zu Kultivierungsgefäß). Es wurden im Allgemeinen Vorkulturen als Übernachtskultur von Festmedien angeimpft und diese anschließend mit einer OD₆₀₀ von 0,05 für die Hauptkultur in frisches Medium überimpft. *S. epidermidis* wurde in TSB Medium angezogen. Für *S. aureus* wurden je nach Methode die Medien TSB und LB-L verwendet. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-L Medium bei 150 rpm. *B. subtilis* wurde je nach Methode in LB-L oder TSS Minimalmedium angezogen. Sofern angegeben, wurde den Nährmedien Glukose und/oder Glutamin in entsprechender Konzentration zugegeben. Sollte ein Wachstum unter Selektionsdruck erfolgen, wurde den Medien eine entsprechende Konzentration eines Antibiotikums zugesetzt.

Für die Anzucht der Bakterien auf Festmedien wurden TSA + 5% Schafsblut und LB-Agarplatten verwendet, welche, sofern nicht anders angegeben, bei 37°C inkubiert wurden. Sollte das Wachstum unter Selektionsdruck erfolgen, wurden LB-Agarplatten mit einer entsprechenden Konzentration eines Antibiotikums eingesetzt.

Glycerinkulturen zur dauerhaften Konservierung von Stämmen wurden angelegt, indem eine Übernachtskultur des Bakteriums im Verhältnis 1:5 mit 99,5% Glycerin vermischt wurde. Die Lagerung der Stämme erfolgte bei -70°C.

3.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus *S. aureus* und *B. subtilis*

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Isolierung von genomischer DNA aus *S. aureus* und *B. subtilis* basiert auf der Methode von Marmur (1961).

Für die DNA-Präparation wurden 10 ml LB-L mit einer OD₆₀₀ von 0,05 aus einer Übernachtskultur von *S. aureus* oder *B. subtilis* angeimpft und bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von OD₆₀₀ 0,6 geerntet, in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 8000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 2 ml 0,9% NaCl resuspendiert. Die Suspension wurde dann auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt (je 1 ml) und bei 15000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets konnten bei -20°C weggefroren oder direkt weiterverarbeitet werden. Dazu wurden die Bakterienpellets in 1 x TE-Puffer resuspendiert, 20 µl RNase A Lösung (10 mg/ml) zugegeben und bei 37°C inkubiert. Für die Lyse wurde bei *B. subtilis* Lysozym mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml, bei *S. aureus* zusätzlich zum Lysozym noch 2 µl Lysostaphin (2 mg/ml) zugegeben. Anschließend wurden 200 µl 2% SDS zugegeben, durch invertieren gemischt und die Proben für ca. 15 min inkubiert. Nach der Lyse wurden 100 µl Proteinase K - Lösung (20 mg/ml) zugegeben und die Ansätze für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Roti[®]-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) (Carl Roth, Karlsruhe) zugefügt und für 30 min geschüttelt. Die Ansätze wurden für 3 min bei 15000 x g zentrifugiert, die wässrige Oberphase abgehoben und die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion wiederholt, bis die Interphase klar war. Die Oberphase wurde dann schließlich in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß

überführt und zum Fällen der DNA wurden 2,5 Volumen 100% EtOH zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach etwa 20 min Inkubation bei -20°C erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 x g für 5 min, der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet zweimal mit 70% EtOH gewaschen. Die DNA-Pellets wurden bei 37°C getrocknet, in 60 µl MilliQ-H₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. aureus*, *E. coli* und *B. subtilis*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. aureus*, *E. coli* und *B. subtilis* wurde das „Qia-Prep Spin Miniprep Kit“ verwendet und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die Lyse der Bakterienzellen bei der Isolierung von Plasmid-DNA aus *B. subtilis* enthielt Puffer P1 zusätzlich Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/ml, bei *S. aureus* darüber hinaus noch 2 µl Lysostaphin (2 mg/ml). Die Ansätze wurden so für etwa 15 min bei 37°C inkubiert bis die Suspension als Zeichen einer erfolgreichen Lyse aufklarte. Die isolierten Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

3.2.4 Isolierung von RNA aus *S. epidermidis*, *S. aureus* und *B. subtilis*

Die verwendeten Lösungen bei der Isolierung von RNA wurden mit LiChrosolv[®] Wasser (Merck, Darmstadt) angesetzt. Es wurden RNase freie Eppendorf-Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen mit Filter verwendet. Die Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt. Die isolierte RNA wurde stets bei -70°C gelagert.

Für die Isolierung von RNA aus *S. epidermidis*, *S. aureus* und *B. subtilis* wurden aus der Bakterienkultur zu den entsprechenden Zeitpunkten Bakterienzellen mit einer OD₆₀₀ von 2,0 geerntet und im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Killing Buffer (Tab. 3.10) vermischt, um die Zellen umgehend abzutöten. Die Suspension wurde bei 4000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet schließlich in 100 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert. Zu diesem Zeitpunkt war ein Einfrieren der Probe bei -70°C möglich.

Tab. 3.10: Zusammensetzung des Killing Buffers

Komponente	Konzentration / Menge
Tris (pH 7,5)	20 mM
MgCl ₂	5 mM
NaN ₃	20 mM
Lagerung bei 4°C	

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin® RNA II Mini Kit“ mit kleinen Änderungen. Dabei wurden 500 µl RA1 mit 5 µl β-Mercaptoethanol zur Probe gegeben und die Bakterienzellen unter Verwendung der Lysing Matrix B (MP Biomedicals, Eschwege) im FastPrep FP120 für 2 x 30 s (dazwischen 5 min auf Eis) mit Speed 6,0 aufgeschlossen. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation bei 15000 x g für 2 min. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nochmals bei 15000 x g für 2 min zentrifugiert. 350 µl des Überstandes wurden anschließend auf einen NucleoSpin® Filter überführt und bei 11000 x g für 1 min zentrifugiert. Zu diesem Zeitpunkt war ein Einfrieren des Lysats bei -70°C möglich.

Zu dem Lysat wurden 350 µl 70% EtOH gegeben und durch vorsichtiges pipettieren vermischt. Dann wurde das Lysat auf eine NucleoSpin® RNA II Column gegeben und bei 11000 x g für 30 s zentrifugiert, um die RNA an die Säulenmembran zu binden. Im Anschluss wurden 350 µl MDB auf die NucleoSpin® RNA II Column gegeben, bei 11000 x g für 1 min zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und nochmals bei 11000 x g für 30 s zentrifugiert. Für den folgenden DNase Verdau wurden 10 µl DNase I und 90 µl DNase Reaction Buffer gemischt, auf die NucleoSpin® RNA II Column gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden 200 µl RA2 zugegeben, bei 11000 x g für 30 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 600 µl RA3 zugegeben, bei 11000 x g für 30 s zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, erneut 250 µl RA3 zugegeben, bei 11000 x g für 2 min zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen. Zum Trocken der Membran wurde nochmals bei 11000 x g für 2 min zentrifugiert. Für die Elution der RNA wurde die NucleoSpin® RNA II Column in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 60 µl RNase freies H₂O auf die Membran gegeben und bei 11000 x g für 1 min zentrifugiert.

Im Anschluss daran wurde ein zweiter DNase Verdau mittels „Turbo-DNA-free™“ Kit durchgeführt. Dabei wurden bis zu 10 µg der isolierten DNA in einem Ansatz mit 5 µl 10x Turbo DNase Puffer und 0,5 µl Turbo DNase bei 37°C für 20 min inkubiert.

Danach wurden nochmals 0,5 µl Turbo DNase zugegeben und die Ansätze für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl DNase Inactivation Reagent und der Ansatz wurde unter gelegentlichem Durchmischen für 5 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 x g für 90 s und schließlich wurde der Überstand mit der RNA vorsichtig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Die RNA-Integrität wurde mittels Agilent 2100 Bioanalyzer unter Verwendung des „RNA 6000 Pico LabChip® Kit“ nach den Angaben des Herstellers überprüft.

3.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der Konzentrationen von DNA und RNA erfolgte am NanoDrop 2000.

3.2.6 Ethanolfällung

Sollte DNA oder RNA aufkonzentriert werden, wurde die Methode der Ethanolfällung angewendet. Dabei wurde die DNA oder RNA Lösung mit 0,1 Volumen 3M Na-Acetat (pH 5,0) und 2,5 Volumen eiskaltem 100% EtOH vermischt und für 1 Stunde bei -20°C gefällt. Im Anschluss daran erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C für 30 min und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, bei 15000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde 2-3x wiederholt, das Pellet im Anschluss bei 37°C getrocknet und die DNA oder RNA in 50 µl MilliQ-H₂O bzw. RNase freiem H₂O gelöst. Die DNA wurde bei -20°C und die RNA bei -70°C gelagert.

3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die spezifische Amplifikation von DNA-Sequenzen. Dabei wird die zwischen zwei spezifischen Primern liegende DNA durch mehrere Zyklen von DNA-Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation exponentiell vermehrt. Die Annealing-Temperatur wurde stets 5-10°C unter der Schmelztemperatur der Primer, die Elongationszeit in Abhängigkeit zur Größe des zu amplifizierenden PCR

Produktes gewählt. Die PCR wurde mit dem FastStart High Fidelity PCR System nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Standard-PCR-Ansatz:

DNA (Plasmid oder genomisch)	5 - 250 ng
10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer (+ MgCl ₂)	5 µl
PCR Grade Nucleotide Mix (10 mM)	1 µl
Primer I (10 pmol/µl)	5 µl
Primer II (10 pmol/µl)	5 µl
FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5 Units / µl)	0,5 µl

Standard-PCR-Programm:

95°C 3 min initiale Denaturierung

35 Zyklen:

95°C 30 s Denaturierung
 x°C 30 s Annealing (5-10°C unter der Schmelztemperatur der Primer)
 72°C x min Elongation (1 min / 1 kb)

72°C 7 min finale Elongation

Sollte die PCR der Überprüfung von Transformanten dienen wurde eine „Colony PCR“ durchgeführt. Dafür wurde eine Bakterienkolonie zunächst in MilliQ-H₂O aufgenommen, durch einen Inkubationsschritt bei 95°C lysiert, bei 15000 x g für 1 min zentrifugiert und 2 µl des zellfreien Lysats als Template für die PCR verwendet.

Im Anschluss an eine PCR wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (beschrieben unter 3.2.8) auf die richtige Größe hin überprüft. Sollten die PCR-Produkte zur Klonierung verwendet werden, wurde diese anschließend mit dem „QiaQuick PCR Purification Kit“ nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Verschieden große DNA-Fragmente können mittels Gel-Elektrophorese aufgrund ihrer elektrischen Ladung aufgetrennt werden. Zur Auftrennung wurden abhängig von der Fragmentgröße 0,8 - 2% TBE-Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele

wurde Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) in der gewünschten Konzentration durch Erhitzen in einem entsprechenden Volumen 0,5 x TBE-Puffer (Tab. 3.11) gelöst und in die Gelkammer gegossen. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das Agarosegel in die Laufkammer gesetzt.

Für die Gelbeladung wurden die DNA-Proben mit 6 x Orange DNA Ladepuffer (Tab. 3.11) vermischt, welchem zum späteren Sichtbarmachen der DNA im Verhältnis 1:10 SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Darmstadt) (1:100 verdünnt) zugegeben wurde. Als Größenstandard wurde die 1 kb DNA Leiter (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Die Laufzeit des Gels war abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente und von der angelegten Spannung, wobei diese im Allgemeinen zwischen 80-120 V lag. Anschließend konnte die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden.

Tab. 3.11: Lösungen und Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Komponente	Konzentration / Menge
10 x TBE-Puffer	
Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA	9,3 g
H ₂ O	ad 1 l
autoklavieren, pH 8,3	
6 x Orange DNA Ladepuffer	
Orange-G	0,25% (w/v)
Glycerol	30% Glycerol

3.2.9 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, die DNA an spezifischen Basensequenzen erkennen und schneiden können. Dies ist unter anderem bei der Klonierung von PCR-Produkten in Plasmide hilfreich. Durch den Restriktionsverdau eines Plasmids und eines zu klonierenden PCR-Fragments mit den identischen Enzymen können diese im Anschluss über die komplementären Enden mit Hilfe des Enzyms T4 DNA Ligase ligiert werden (beschrieben unter 3.2.11).

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen handelte es sich um FastDigest[™] Enzyme der Firma Fermentas (St. Leon-Rot). Die Enzyme wurden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Sollte die DNA in der Folge für weitere enzymatische Reaktionen, wie zur Ligation, eingesetzt werden, wurde diese mit dem „QiaQuick PCR Purification Kit“ nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.10 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Eine Dephosphorylierung der Plasmid-DNA soll die Religation der durch den Restriktionsverdau entstandenen Enden verhindern. Die Dephosphorylierung von Plasmid-DNA wurde in dieser Arbeit mithilfe des Enzyms FastAP™ nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten („Inserts“) in den Klonierungsvektor, welche wie zuvor beschrieben mit Restriktionsendonukleasen verdaut worden sind, erfolgte mit Hilfe des Enzyms T4 DNA Ligase. Sie ist in der Lage, freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA unter ATP-Verbrauch zu verknüpfen.

Die Ligation mit der T4 DNA Ligase erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde ungefähr dreimal mehr Insert als Vektor-DNA eingesetzt (Konzentrationen und Größe der DNA-Fragmente wurden berücksichtigt), und das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug maximal 10 µl. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend für eine Transformation in *E. coli* (beschrieben unter 3.2.12) eingesetzt.

3.2.12 Transformation von *E. coli*

3.2.12.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* wurden 250 ml SOB Medium (Tab. 3.12) mit einer Übernachtskultur von *E. coli* mit einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und im Wasserbad bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 2500 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert, das Pellet in 80 ml eiskaltem TB-Medium (Tab. 3.12) resuspendiert und für 10 min auf Eis gekühlt. Danach erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 2500 x g und 4°C für 10 min und das

Pellet wurde in 20 ml TB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden 1,4 ml DMSO (Serva, Heidelberg) langsam durch Tropfen zugegeben und dann 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Tab. 3.12: Medien zur Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli*

Komponente	Konzentration / Menge
SOB Medium	
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
Trypton	2% (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
autoklavieren, dann Zugabe von:	
MgCl ₂ *6H ₂ O	20 mM
MgSO ₄ *7H ₂ O	20 mM
TB Medium	
PIPES	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
sterilfiltriert	

3.2.12.2 Transformation

Für die Transformation von *E. coli* wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, 1-10 µl Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz zugegeben, gemischt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 s bei 42°C im Wasserbad und die Probe wurde dann für 5 min wieder auf Eis inkubiert. Dann wurden 900 µl SOC Medium (Tab. 3.13) zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Schließlich wurden 100 µl des Transformationsansatzes unverdünnt sowie in 1:10 Verdünnung auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und diese bei 37°C über Nacht inkubiert.

Tab. 3.13: Zusammensetzung des SOC Mediums für die Transformation von *E. coli*

Komponente	Konzentration / Menge
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
Trypton	2% (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
autoklavieren, dann Zugabe von:	
MgCl ₂ *6H ₂ O	20 mM
MgSO ₄ *7H ₂ O	20 mM
Glukose	20 mM

3.2.13 Transformation von *S. aureus*

3.2.13.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen von *S. aureus* wurden 25 ml B2 (Tab. 3.14) + 0,5% Glukose mit 1 ml einer Übernachtskultur von *S. aureus* (B2 Medium) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 bei 150 rpm und 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 8000 rpm für 10 min zentrifugiert, das Pellet in 25 ml MilliQ-H₂O resuspendiert und erneut bei 8000 rpm für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Danach wurde das Pellet in 5 ml 10% Glycerol resuspendiert und bei 8000 rpm für 10 min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Pellet in 2,5 ml 10% Glycerol resuspendiert und dann für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 8000 rpm für 10 min und das Pellet wurde in 800 µl 10% Glycerol resuspendiert. Davon wurden 70 µl Aliquots angefertigt, welche entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert oder direkt zur Elektroporation (beschrieben unter 3.2.13.2) eingesetzt wurden.

Tab. 3.14: Zusammensetzung des B2 Mediums zur Herstellung kompetenter Zellen von *S. aureus*

Komponente	Konzentration / Menge
Casein Hydrolase	10 g
Hefeextrakt	25 g
K ₂ HPO ₄	1,2 g
NaCl	25 g
H ₂ O	ad 1 l
sterilfiltriert	

3.2.13.2 Transformation

Die Transformation von *S. aureus* erfolgte mittels Elektroporation. Für eine derartige Transformation von *S. aureus* mit Plasmid-DNA wurden frisch hergestellte oder auf Eis aufgetaute elektrokompente Zellen und ca. 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt.

Dabei wurden die elektrokompenten Zellen von *S. aureus* mit der entsprechenden Plasmid-DNA vermischt und in eine 0,1 cm Elektroporationsküvette (Bio-Rad, München) überführt. Anschließend erfolgte die Elektroporation mit dem Gene Pulser bei 100 Ohm, 25 µF, 2,3 kV. Im Anschluss wurde der Ansatz umgehend in 390 µl vorgewärmtes B2 (Tab. 3.14) + 0,5% Glucose überführt und für 1 h schüttelnd bei

37°C inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und für 1-2 Tage bei 37°C inkubiert.

3.2.14 Transformation von *B. subtilis*

3.2.14.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen von *B. subtilis* wurden 5 ml MNGE Medium (Tab. 3.15) mit 0,5 ml MilliQ-H₂O und 0,5 ml 10% (w/v) Casamino Acids (sterilfiltriert) mit 375 µl einer Übernachtskultur (in LB-L) von *B. subtilis* angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,3 bei 150 rpm und 37°C inkubiert. Danach wurden 5,5 ml MNGE Medium zur Kultur zugegeben und diese weiter für 1 h bei 150 rpm und 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit sind die Zellen kompetent und können direkt für die Transformation (beschrieben unter 3.2.14.2) eingesetzt werden.

Tab. 3.15: Medien und Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von *B. subtilis*

Komponente	Konzentration / Menge
MNGE Medium	
10 x MM	10 ml
40% Glukose	2,5 ml
40% KGlu	500 µl
1M MgSO ₄	300 µl
Trp-Lösung	1 ml
H ₂ O	ad 100 ml
10 x MM	
KH ₂ PO ₄	440 mM
K ₂ HPO ₄	600 mM
Natriumcitrat	30 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	150 mM
sterilfiltriert	
40% KGlu	
Glutamat	40 g
H ₂ O	ad 100 ml
sterilfiltriert	
Trp-Lösung	
Tryptophan	50 mg
H ₂ O	ad 1 ml
Mix-T	
5% (w/v) Hefeextrakt	500 µl
10% (w/v) Casamino Acids	250 µl
MilliQ-H ₂ O	300 µl
Trp-Lösung	50 µl

3.2.14.2 Transformation

Für die Transformation von *B. subtilis* wurden 400 µl kompetente Zellen mit 1-2 µg Plasmid-DNA in einem Falcon-Röhrchen vermischt und für 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurden 100 µl Mix-T (Tab. 3.15) zugegeben und der Ansatz weiter für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden 100 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.15 Phagentransduktion in *S. aureus*

Die Phagentransduktion stellt eine Möglichkeit dar, mittels Bakteriophagen Fremd-DNA zwischen verschiedenen *S. aureus* Stämmen zu übertragen. Die Phagentransduktion besteht aus zwei Schritten. Zunächst infiziert man den Spenderstamm, welcher die gewünschte DNA enthält, mit einem geeigneten Bakteriophagen. Mit den so behandelten Phagen kann dann der gewünschte Empfängerstamm infiziert werden und über Selektionsplatten können die Kolonien selektiert werden, welche die gewünschte DNA aufgenommen haben. In dieser Arbeit wurde stets der Bakteriophage $\phi 85$ verwendet.

Infektion des Spenderstammes:

Zunächst wurde vom Spenderstamm eine 10 ml Übernachtskultur in LB-L Medium angeimpft und bei 150 rpm und 37°C angezogen. Wenn nötig wurde ein entsprechendes Antibiotikum hinzugefügt. Dieser Kultur wurde dann am nächsten Morgen 50 µl einer 1 M CaCl_2 Lösung zugegeben. Das Phagenlysat (von M. Bischoff, Universität des Saarlandes, Homburg, zur Verfügung gestellt) wurde in Phagenpuffer (LB-L + 5 mM CaCl_2) verdünnt, um die Verdünnungen 10^{-1} - 10^{-7} zu erhalten. Anschließend wurden 300 µl der Übernachtskultur mit 100 µl der gewünschten Verdünnungen des Phagenlysates gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde jeder Ansatz mit 4 ml auf 55°C vorgewärmten LB-Softy (LB-L + 0,6% Agar) + 5 mM CaCl_2 gemischt und eine Blutagarplatte (TSA + 5% Schafsblut) damit beschichtet, welche anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Die Blutplatte mit der Verdünnung, welche eine konfluente Lyse zeigte, wurde weiterverwendet, wobei braun gefärbter Blutagar auf Bakterienwachstum und aufgeklärter LB-Softy auf Bakterienlyse hinweist. Auf die

entsprechende Platte wurden 2 ml Phagenpuffer gegeben, der LB-Softy abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde nach kurzem Vortexen bei 9000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand mit den Phagen durch ein 0,2 µm Filter (Sarstedt, Nürnberg) filtriert. Das Lysat wurde bei 4°C gelagert und hat eine Haltbarkeit von mehreren Jahren.

Infektion des Rezipientenstammes:

Die Durchführung dieses Schrittes erfolgte im Wesentlichen wie im vorangegangenen Schritt beschrieben, mit folgenden Ausnahmen. Hier wurde für die Übernachtskultur der gewünschte Rezipientenstamm verwendet und das im vorherigen Schritt gewonnene Phagenlysat für 10^{-1} - 10^{-3} Verdünnungen in Phagenpuffer verwendet. Dem LB-Softy wurde darüber hinaus in diesem Schritt kein CaCl_2 zugefügt und für die Selektion wurden anstelle von Blutagarplatten LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum verwendet. Diese wurden dann für 1-2 Tage bei 37°C inkubiert.

3.2.16 Konstruktion einer *S. aureus* $\Delta ccpE$ Mutante und dessen Komplementation

3.2.16.1 Konstruktion der *S. aureus* $\Delta ccpE$ Mutante

Für die Deletion von *ccpE* (NWMN_0641) in *S. aureus* Stamm Newman wurde die von Leibig *et al.* (2008) beschriebene Methode verwendet, welche über einen Allel-Austausch mittels eines Cre-lox basierenden Deletionssystems die Konstruktion einer markerlosen Deletionsmutante ermöglichte.

Zunächst erfolgte mittels PCR unter Verwendung zuvor isolierter genomischer DNA von *S. aureus* Stamm Newman eine Amplifizierung der flankierenden Regionen von *ccpE*. Dabei wurden von der oberhalb von *ccpE* liegenden Region mit den Primern MBH154 und MBH155 ein 638 bp großes *ccpE*-up Fragment amplifiziert. Von der unterhalb liegenden Region wurde mit den Primern MBH152 und MBH153 ein 847 bp großes *ccpE*-down Fragment amplifiziert. Das *ccpE*-up Fragment wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XhoI*, das *ccpE*-down Fragment mit *BamHI* und *SacI* verdaut. Anschließend wurde auch der Klonierungsvektor pBT mit *KpnI* und *XhoI* verdaut, in welchen damit das *KpnI/XhoI*-verdaute *ccpE*-up

Fragment ligiert werden konnte. Der Ligationsansatz wurde dann in *E. coli* DH5 α transformiert und die Selektion auf Transformanten mit dem Plasmid pBT_ *ccpE*-up erfolgte auf LB-Agarplatten mit 8 μ g/ml Tetracyclin bei 37°C. Das Plasmid wurde aus den erhaltenen Transformanten isoliert und mittels Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XhoI* das Vorhandensein des *ccpE*-up Fragments im Vektor pBT überprüft. Im Anschluss wurde das Plasmid pBT_ *ccpE*-up mit *Bam*HI und *Sac*I verdaut und das bereits zuvor ebenso verdaute *ccpE*-down Fragment in pBT_ *ccpE*-up kloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Selektion auf Transformanten mit dem Plasmid pBT_ *ccpE*-up-down erfolgte erneut auf LB-Agarplatten mit 8 μ g/ml Tetracyclin bei 37°C. Das Plasmid wurde wieder isoliert und mittels Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sac*I auf das Vorhandensein des *ccpE*-down Fragments überprüft. Danach wurde die 1,6 kb umfassende *lox66-aphAIII-lox71* Resistenzkassette (aus pBT2-arcA) über die Schnittstellen *XhoI* und *Bam*HI zwischen *ccpE*-up und *ccpE*-down in den Vektor pBT_ *ccpE*-up-down kloniert, woraus das Plasmid pTH2 resultierte, und dieses in *E. coli* DH5 α transformiert. Hier erfolgte die Selektion auf LB-Agarplatten mit 50 μ g/ml Kanamycin bei 37°C. Das Plasmid wurde aus den Transformanten isoliert und mittels Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *Bam*HI auf das Vorhandensein der *lox66-aphAIII-lox71* Resistenzkassette überprüft.

Das Plasmid pTH2 wurde dann mittels Elektroporation in elektrokompetente Zellen von *S. aureus* RN4220 transformiert. Dabei sollte eine homologe Rekombination über die beiden Fragmente *ccpE*-up und *ccpE*-down und damit die Deletion bzw. ein Austausch des Gens *ccpE* gegen die *lox66-aphAIII-lox71* Resistenzkassette erreicht werden. Die Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten mit 50 μ g/ml Kanamycin bei 37°C. Die erhaltenen Transformanten wurden dann sowohl auf LB-Agarplatten mit 50 μ g/ml Kanamycin als auch auf LB-Agarplatten mit 8 μ g/ml Tetracyclin überimpft und bei 37°C inkubiert. Bei einem Wachstum auf LB-Agarplatten mit 8 μ g/ml Tetracyclin handelte es sich vermutlich um Transformanten, bei denen lediglich ein „single-crossover“ und somit eine Integration von pBT in das Genom stattgefunden hat. Es wurden daher nur die ausschließlich auf Kanamycin wachsenden Transformanten weiterverwendet, bei denen mutmaßlich ein „double-crossover“ stattgefunden hat. Zum Nachweis der korrekten Integration der *lox66-aphAIII-lox71* Resistenzkassette in das Genom von RN4220 wurde mit zuvor isolierter genomischer DNA der

Transformanten eine PCR durchgeführt. Dabei wurden ein Primer in der *lox66-aphAIII-lox71* Resistenzkassette (MBH162) und ein Primer im oberhalb liegenden genomischen Bereich von RN4220 verwendet (MBH170). Das dadurch erhaltene PCR-Produkt belegte die korrekte Integration in einer der Transformanten. Die so erhaltene RN4220 $\Delta ccpE::lox66-aphAIII-lox71$ Mutante wurde als THa benannt und als Spenderstamm verwendet, um die *ccpE*-Deletion mittels Phagentransduktion in den Stamm Newman zu transduzieren, woraus Newman $\Delta ccpE::lox66-aphAIII-lox71$ hervorging.

Anschließend wurde das Plasmid pRAB1 in elektrokompetente Newman $\Delta ccpE::lox66-aphAIII-lox71$ Zellen elektroporiert. Die Selektion auf Transformanten mit dem Plasmid erfolgte auf LB-Agarplatten mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol bei 30°C. Bei pRAB1 handelt es sich um ein Temperatur-sensitives Plasmid welches eine Cre Rekombinase in *S. aureus* exprimiert. Diese Cre Rekombinase erkennt die den Kanamycin Resistenzmarker flankierenden *lox*-Abschnitte *lox66* und *lox71* und kann die Exzision des Resistenzmarkers katalysieren. In diesem Fall bleibt nur ein kurzer *lox72*-Abschnitt anstelle des ursprünglichen Gens zurück. Die einzelnen Schritte zur Exzision des Resistenzmarkers und der anschließenden Degradation von pRAB1 wurden wie in Leibig *et al.* (2008) beschrieben durchgeführt. Die daraus hervorgegangene markerlose Deletionsmutante Newman $\Delta ccpE::lox72$ wurde als TH01 benannt und mittels PCR-Amplifikation der betroffenen genomischen Region (Primer MBH152/MB154) und anschließender Sequenzierung des PCR-Fragments (4base lab GmbH, Reutlingen) erfolgreich bestätigt.

3.2.16.2 Konstruktion der *cis*-Komplementation der *S. aureus* $\Delta ccpE$ Mutante

Für die *cis*-Komplementation der *ccpE*-Deletion in Stamm TH01 wurde mittels PCR unter Verwendung zuvor isolierter genomischer DNA von *S. aureus* Stamm Newman und den Primern MBH225 und MBH226 ein 2 kb großes Fragment amplifiziert, welches das Wildtyp-Allel *ccpE* und 1 kb der oberhalb davon liegenden Region mit dem Gen NWMN_0640 umfasst, da NWMN_0640 und *ccpE* (NWMN_0641) ein Operon bilden. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Kpn*l verdaut und in den *Bam*HI/*Kpn*l verdauten Klonierungsvektor pBT kloniert, woraus Plasmid pTH2c resultierte. Der Ligationsansatz wurde in den *dam*⁻

dcm *E. coli* Stamm SCS110 (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) transformiert und die Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten mit 8 µg/ml Tetracyclin bei 37°C. Anschließend wurde das Plasmid isoliert und mittels Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Kpn*I das Vorhandensein des 2 kb Fragments im Vektor pBT überprüft. Das Plasmid pTH2c wurde dann in elektrokompetente *S. aureus* TH01 Zellen elektroporiert und auf LB-Agarplatten mit 8 µg/ml Tetracyclin bei 37°C selektioniert. Die durch die Integration des Plasmids pTH2c erhaltende *cis*-Komplementierung (TH01Δ*ccpE*::pTH2c) wurde mit dem Namen TH01c versehen und die Wiederherstellung des *ccpE* Wildtyp-Allels mittels PCR-Amplifikation der betroffenen genomischen Region (MBH225/MBH226) und anschließender Sequenzierung des PCR-Fragments (4base lab GmbH, Reutlingen) erfolgreich bestätigt.

3.2.17 Herstellung der Komplementationen der Δ*ccpA* Mutante KS66 in *S. aureus*

Die zur Herstellung einer *trans*-Komplementation mit dem *ccpA* Wildtyp-Allel, sowie einer phosphoablative und einer phosphomimetischen Komplementation der Δ*ccpA* Mutante KS66 benötigten Plasmide pCN34_*ccpA*, pCN34_*ccpA*_Ala und pCN34_*ccpA*_Asp wurden von V. Molle (CNRS, Universität Montpellier II, Montpellier) zur Verfügung gestellt, deren Konstruktion in Leiba *et al.* (2012) beschrieben ist. Die genannten Plasmide wurden mittels Elektroporation in elektrokompetente Zellen von *S. aureus* RN4220 transformiert und die Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin bei 37°C. Positive Transformanten wurden als Spenderstämme verwendet, um die Plasmide mittels Phagentransduktion in Stamm KS66 zu transduzieren, woraus die *trans*-Komplementation KS66*pCN34_*ccpA*, die phosphoablative (CcpA_T18A/T33A) Komplementation KS66*pCN34_*ccpA*_Ala und die phosphomimetische (CcpA_T18D/T33D) Version KS66*pCN34_*ccpA*_Asp hervorging.

3.2.18 Konstruktion der *Trans*-Komplementationsplasmide *B. subtilis ccpC* Promoter - *B. subtilis ccpC* und *B. subtilis ccpC* Promoter - *S. aureus ccpE*

Unter Verwendung zuvor isolierter genomischer DNA von *B. subtilis* Stamm AF21 und den Primern MBH341 und MBH255 wurde ein 1794 bp großes Fragment mit den *B. subtilis ccpC*-Promotoren P1/P2 und dem *ccpC* Gen amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Kpn*I verdaut und in den *Xba*I/*Kpn*I verdauten Shuttle-Vektor pBus1 ligiert, woraus Plasmid pTH3 resultierte. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und die Selektion auf Transformanten mit Plasmid pTH3 erfolgte auf LB-Agarplatten mit 8 μ g/ml Tetracyclin bei 37°C. Das Plasmid wurde aus den Transformanten isoliert und mittels Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *Xba*I/*Kpn*I sowie PCR (Primer MBH341/MBH255) und anschließender Auftrennung auf einem 0,8% TBE-Agarosegel auf das Vorhandensein des 1794 bp großen Fragments überprüft.

Ein 932 bp großes Fragment mit dem Gen *ccpE* wurde unter Verwendung der genomischen DNA von *S. aureus* Stamm Newman und den Primern MBH239 und MBH226 amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *Sal*I und *Kpn*I verdaut und in den *Sal*I/*Kpn*I verdauten Shuttle-Vektor pBus1 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und die Selektion auf Transformanten mit dem Plasmid pBus1_ *ccpE* erfolgte auf LB-Agarplatten mit 8 μ g/ml Tetracyclin bei 37°C. Das Plasmid wurde aus den Transformanten isoliert und mittels Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *Sal*I und *Kpn*I auf das Vorhandensein des 932 bp großen Fragments überprüft. Ein 824 bp großes Fragment mit den *B. subtilis ccpC*-Promotoren P1/P2 wurde unter Verwendung der genomischen DNA von *B. subtilis* Stamm AF21 und den Primern MBH341 und MBH338 amplifiziert und anschließend mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Sal*I verdaut. Dieses Fragment wurde dann in den *Xba*I/*Sal*I verdauten Vektor pBus1 mit dem ORF von *ccpE* ligiert, was in Plasmid pTH4 resultierte. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und die Selektion auf Transformanten mit pTH4 erfolgte auf LB-Agarplatten mit 8 μ g/ml Tetracyclin bei 37°C. Das Plasmid wurde aus den Transformanten isoliert und mittels Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *Xba*I/*Kpn*I sowie PCR (Primer MBH341/MBH226) und anschließender Auftrennung auf einem 0,8% TBE-Agarosegel auf das Vorhandensein des 1,7 kb großen Fragments überprüft.

Die Plasmide pTH3 und pTH4 wurden dann in kompetente Zellen von *B. subtilis* Stamm CJB9 und *S. aureus* Stamm RN4220 transformiert und die Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten mit 8 µg/ml Tetracyclin bei 37°C. Die positiven Transformanten RN4220*pTH3 und RN4220*pTH4 von RN4220 wurden als Spenderstämme verwendet, um die Plasmide mittels Phagentransduktion in den Stamm TH01 zu transduzieren.

3.2.19 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen von PCR-Fragmenten wurden von der 4base lab GmbH (Reutlingen) durchgeführt. Dazu wurden die Proben nach den Vorgaben der 4base lab GmbH vorbereitet und anschließend eingeschickt.

3.2.20 Reverse Transkription von RNA

Anhand der reversen Transkription kann aus RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden, welche anschließend mittels PCR und Real-Time PCR amplifiziert bzw. quantifiziert werden kann.

Für die reverse Transkription der zuvor isolierten RNA (beschrieben unter 3.2.4) wurde das „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ verwendet und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Von der cDNA wurden dann Aliquots erstellt und diese bei -20°C gelagert.

3.2.21 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) ermöglicht die Quantifizierung der Expression von Genen. Zunächst wird die Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Bakterienstämmen isoliert und für die qPCR in cDNA umgeschrieben. Mit der cDNA als Template wird dann unter Zugabe einer für das Zielgen spezifischen Primerkombination und des DNA-interkalierenden Farbstoffs SYBR Green eine PCR durchgeführt. Die vom in die synthetisierte Doppelstrang-DNA (dsDNA) interkalierten SYBR Green ausgehende Fluoreszenz wird während jedem PCR-Zyklus am Ende des Elongationsschrittes, also wenn die Synthese der neuen DNA-Moleküle abgeschlossen ist, gemessen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist dabei

proportional zur Menge der vorhandenen Ziel-dsDNA. Am Ende des Laufs wird ein Schwellenwert festgelegt, wobei der PCR-Zyklus, zu welchem das Signal diesen Schwellenwert erreicht, als C_T -Wert („cycle threshold“) bezeichnet wird. Je kleiner der C_T -Wert ist, desto höher ist somit Ausgangskonzentration des amplifizierten cDNA-Moleküls in der untersuchten Probe. Anschließend folgt noch eine Schmelzkurvenanalyse, anhand der die Spezifität der Amplifikate überprüft werden kann.

Für alle Primerpaare, welche in dieser Arbeit für die qPCR verwendet wurden, musste zunächst anhand einer Primer-Optimierung die optimale Konzentration bestimmt werden. Dazu wurde jedes Primerpaar in folgenden Konzentrationen in einen qPCR Lauf eingesetzt: 50 nM/50 nM, 50 nM/100 nM, 100 nM/50 nM, 100 nM/100 nM, 300 nM/300 nM sowie 900 nM/900 nM. Als optimal gilt am Ende die Konzentration, bei der die exponentielle Verdopplung der cDNA zu einem möglichst niedrigen C_T -Wert führt und gleichzeitig keine Amplifikation der Negativ-Kontrollen (Ansätze ohne cDNA) auftritt. Diese Primer-Konzentration wurde anschließend mit unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen (20 ng/μl, 4 ng/μl, 0,8 ng/μl, 0,16 ng/μl, 0,032 ng/μl, 0,0064 ng/μl und 0,00128 ng/μl) in einem weiteren qPCR Lauf getestet und auf eine Standardkurve aufgetragen, worüber die PCR-Effizienz ermittelt werden konnte. Lag die Steigung der Standardkurve zwischen einem Wert von -3,3 und -3,4, so betrug die PCR-Effizienz 100% und die Primer konnten in der ermittelten Konzentration verwendet werden. Für alle in dieser Arbeit verwendeten Primer erwies sich die Konzentration 300 nM/300 nM als optimal.

Die qPCR wurde mit dem StepOne™ Real-Time PCR System durchgeführt und die Auswertung mit der zugehörigen StepOne™ Software v2.2.1 vorgenommen. Die Reaktionsansätze mit einem Volumen von 20 μl wurden in Duplikaten gemessen, deren Mittelwerte gebildet wurde. Die Ansätze enthielten 20 ng der zu untersuchenden cDNA bzw. LiChrosolv® Wasser (Merck, Darmstadt) bei den Negativ-Kontrollen, genspezifische Primer (je 300 nM) und „Power SYBR® Green Master Mix“. Nach einer initialen Denaturierung von 10 min bei 95°C folgten 40 Zyklen, jeweils bestehend aus 15 s Denaturierung bei 95°C und einem Annealing- und Elongationsschritt von 60 s bei 60°C, wobei am Ende eines jeden Zyklus die Fluoreszenz gemessen wurde. Abschließend erfolgte noch die

Schmelzkurvenanalyse. Als Kontrolle für die Abwesenheit von genomischer DNA wurde auch die DNase verdaute RNA in einer qPCR mit dem Haushaltsgen *gyrB* getestet.

Die Expression der untersuchten Zielgene wurde in Relation zur Expression des Haushaltsgens *gyrB* gemessen, welches unter den in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen konstitutiv exprimiert wird (Valihrach & Demnerova, 2012). Der C_T -Wert des Haushaltsgens wurde vom C_T -Wert des jeweiligen Zielgens abgezogen (ΔC_T) und dieser in die Gleichung $2^{-\Delta C_T}$ eingesetzt, um so die n -fache Veränderung der mRNA Expression des Zielgens relativ zum Haushaltsgen zu ermitteln.

3.2.22 Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

RACE ist eine Methode zur Bestimmung der 5'- und 3'-Enden von RNAs und kann verwendet werden, um Transkriptionsstartpunkte zu bestimmen. Die Methode wurde in dieser Arbeit für die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes vom Gen NWMN_0640 in *S. aureus* Stamm Newman eingesetzt und im Wesentlichen wie in Kovács *et al.* (2006) beschrieben durchgeführt.

Dazu wurde zunächst aus einer 3 Stunden Kultur (LB-L Medium) von *S. aureus* Stamm Newman, wie unter 3.2.4 beschrieben, RNA isoliert. 7,5 µg der RNA wurden dann bei 55°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die RNA in einem 25 µl Reaktionsansatz mit 12,5 Units Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) in 1 x TAP Puffer und 20 Units SUPERase• In™ RNase Inhibitor bei 37°C für 60 min inkubiert. Parallel dazu wurden weitere 7,5 µg RNA unter gleichen Bedingungen inkubiert, außer dass in diesem Ansatz kein TAP hinzugegeben wurde.

Im Anschluss wurden 275 µl DEPC-H₂O (Ambion, Austin, USA) zu den Ansätzen gegeben und es wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden 300 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugegeben, 30 s gevortext und bei 15000 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Oberphase abgenommen, mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) sowie 2,5 Volumen eiskaltem 100% Ethanol gemischt und bei -20°C für mindestens 30 min inkubiert. Nun folgte eine Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C für 30 min. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet.

Die Pellets wurde in 27,5 µl DEPC-H₂O resuspendiert und bei 55°C für 5 min inkubiert. Dann wurden 500 pmol 5'-RACE-Adapter (Tab. 3.3) zugegeben, die Ansätze mit einem Volumen von 50 µl bei 95°C für 5 min inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Es folgte die Ligation des 5'-RACE-Adapters, indem den Ansätzen 50 Units T4 RNA Ligase 1 in 1x T4 RNA Ligase 1 Puffer und 40 Units SUPERase• In™ RNase Inhibitor (50 µl Reaktionsansatz) bei 17°C über Nacht inkubiert wurden. Es folgte erneut wie zuvor beschrieben eine Phenol-Chloroform-Extraktion und die Pellets wurden in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Je Ansatz wurden 8,2 µl der ligierten RNA für die reverse Transkription mit dem genspezifischen Primer NWMN_0640-RT mit dem „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ in einem Reaktionsvolumen von 60 µl nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. 2 µl der cDNA wurden mit einem zum 5'-RACE-Adapter komplementären (RACE_PCR_5') und einem genspezifischen (NWMN_0640-PCR) Primer mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde der genspezifische Primer so gewählt, dass er näher am gesuchten 5'-Ende lag als der in der reversen Transkription verwendete Primer. Die PCR-Produkte wurden zur Überprüfung auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt und schließlich zur Ermittlung der genauen Basenabfolge und des Transkriptionsstartpunktes sequenziert (Primer NWMN_0640-PCR) (4base lab GmbH, Reutlingen).

3.2.23 Untersuchung der Biofilmbildung

Biofilmbildung in 24-well Polystyrol-Platten:

Die Untersuchung der Biofilmbildung von *S. epidermidis* unter statischen Bedingungen erfolgte in 24-well Polystyrol-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz). Dazu wurden von den zu untersuchenden Bakterienstämmen unter Verwendung des Vitek Densicheck Bakteriensuspensionen mit einem McFarland (McF) von 0,5 von auf TSA + 5% Schafsblut angezogenen Bakterienkolonien eingestellt, mit denen anschließend 1 ml TSB + 1% Glukose je well in der gewünschten Verdünnung der Bakteriensuspensionen (1:32 bis 1:1024) beimpft wurde.

Nach einer Inkubation für 24 Stunden bei 37°C wurde das Medium vorsichtig abgenommen, ohne dabei den an die well-Oberfläche adhärierenden Biofilm zu beschädigen. Danach wurden die wells dreimal mit 1 ml 1x PBS gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Es folgte eine Anfärbung des Biofilms mit 800 µl

0,1% Safranin für 30 s. Anschließend wurden die wells dreimal mit 1 ml MilliQ-H₂O gewaschen und das Ergebnis fotografisch dokumentiert. Für die Quantifizierung der Biofilmbildung wurden die adhärenen Bakterienzellen unter Zugabe von 1 ml 30% Essigsäure gelöst. Davon wurde schließlich in einer Verdünnung von 1:10 die OD bei 530 nm bestimmt.

Biofilmbildung im Schüttelversuch in Glasröhrchen:

Die Untersuchung der Biofilmbildung von *S. epidermidis* und *S. aureus* im Schüttelversuch in Glasröhrchen erfolgte für *S. epidermidis* nach einem Wachstum für 24 h bei 150 rpm und 37°C in 2 ml TSB + 1% Glukose, für *S. aureus* nach 18 Stunden bei 150 rpm und 37°C in 2 ml TSB + 0,1% Glukose. Das Medium in den Glasröhrchen wurde mit 50 µl von wie zuvor beschrieben hergestellten Bakteriensuspensionen der zu untersuchenden Bakterienstämme mit einem McF von 0,5 angeimpft.

Nach der Inkubation für 24 bzw. 18 Stunden wurde das Medium auch hier vorsichtig abgenommen. Danach wurden die Glasröhrchen dreimal mit 2 ml 1x PBS gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Es folgte eine Anfärbung des Biofilms mit 1 ml 0,1% Safranin für 30 s. Anschließend wurden die Glasröhrchen dreimal mit 2 ml MilliQ-H₂O gewaschen und das Ergebnis fotografisch dokumentiert. Für die Quantifizierung der Biofilmbildung wurden die adhärenen Bakterienzellen unter Zugabe von 1 ml 30% Essigsäure gelöst. Davon wurde schließlich in einer Verdünnung von 1:10 die OD bei 530 nm bestimmt.

Biofilmbildung unter kontrollierten Flussbedingungen (BioFlux 200):

Die Untersuchung der Biofilmbildung unter kontrollierten Flussbedingungen wurde mit Hilfe des BioFlux 200 Systems in einer 48-well Mikrofluidik-Platte durchgeführt. Die Experimente wurden im Wesentlichen wie in Benoit *et al.* (2010) beschrieben durchgeführt, mit folgenden Änderungen. Die Mikrokanäle der Mikrofluidik-Platte wurden zunächst für 5 min bei einer Flussrate von 5 µN cm² mit TSB + 1% Glukose gespült und gefüllt. Anschließend folgte die Inokulation der Mikrokanäle mit einer wie zuvor beschrieben hergestellten Bakteriensuspensionen (McF von 0,5) der zu untersuchenden Bakterienstämme bei einer Flussrate von 2 µN cm² vom „outlet-well“ in Richtung „inlet-well“ bis die Bakteriensuspension den Beobachtungskanal erreicht hatte. Nach einer Inkubation für 15 min bei 37°C wurde dann frisches TSB + 1%

Glukose mit einer konstanten Flussrate von $5 \mu\text{N cm}^2$ bei 37°C vom „inlet-well“ in Richtung „outlet-well“ durch die Mikrokanäle gepumpt.

Die Biofilmbildung wurde nach 18 Stunden lichtmikroskopisch mit einem inversen Mikroskop (Leica DMI4000 B; Leica Mikrosysteme, Wetzlar) beobachtet und repräsentative Phasenkontrast-Bilder mit der digitalen Farbkamera Leica DFC420 C (Leica Mikrosysteme, Wetzlar) unter Verwendung der Leica Application Suite (LAS) v3.6 aufgenommen.

3.2.24 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es möglich, Proteine entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Anschließend können die Proteine mit Antikörpern in einer Western Blot Analyse spezifisch detektiert werden.

Zur Vorbereitung von Proteinproben für die SDS-PAGE wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten die OD_{600} der Bakterienkultur von *S. aureus* gemessen, je 1 ml der Bakterien geerntet und bei $8000 \times g$ und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets so in 1 x PBS resuspendiert, dass eine OD von 10 erreicht wurde. Zur Lyse der Bakterienzellen wurden dann 6 μl Lyse-Lösung (je 2 μl von 2 mg/ml Lysostaphin, 2 mg/ml Lysozym und 1U/ μl DNase I) zugegeben und bei 37°C für etwa 10 min inkubiert, bis die Suspension aufklarte. Es folgte eine Zentrifugation bei $15000 \times g$ und 4°C für 20 min und der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Jeweils 75 μl der Proben wurden mit 25 μl 4 x Laemmli Puffer gemischt und bei 60°C für 10 min denaturiert. Die Proteinproben wurden bei -20°C gelagert.

Für die SDS-PAGE wurde ein SDS-Polyacrylamidgel vorbereitet, welches für die Analysen dieser Arbeit aus einem 5% igen Sammelgel (oberer Teil) zur Konzentrierung der Probe, und einem 10% igen Trenngel (unterer Teil) zur Größenauftrennung bestand.

<u>Sammelgel (5%)</u>		<u>Trenngel (10%)</u>	
0,6 ml	Lösung A	1,65 ml	Lösung A
0,8 ml	Lösung C	1,25 ml	Lösung B
1,9 ml	H ₂ O	2,1 ml	H ₂ O
33,3 µl	10% APS	50 µl	10% APS
2,7 µl	TEMED	4,15 µl	TEMED

Zunächst wurde das Trenngelgemisch in die Gießvorrichtung pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Anschließend wurde ein Kamm eingesetzt und nach vollständiger Polymerisation wurde das fertige Gel in die mit SDS-Laufpuffer befüllte Gelkammer eingespannt. Es wurde eine Spannung von 110 V angelegt, bis das Bromphenolblau den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte. Die Gele konnten dann für die Western Blot Analyse weiter verwendet werden. Alle Lösungen und Puffer für die SDS-Page sind in Tab. 3.16 aufgelistet.

Tab. 3.16: Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE

Komponente	Konzentration / Menge
Lösung A	
Acrylamid/bis-Acrylamid	30% / 1,04%
Lösung B	
Tris/HCl (pH 8,8)	118,2 g
SDS	2 g
H ₂ O	ad 500 ml
Lösung C	
Tris/HCl (pH 6,8)	39,4 g
SDS	2 g
H ₂ O	ad 500 ml
SDS-Laufpuffer	
Glycin	14,4 g
SDS	1 g
Tris/Base	3 g
H ₂ O	ad 1 l
4 x Laemmli Puffer	
1 M Tris/HCl (pH 6,8)	5 ml
Glycerin	4 ml
Bromphenolblau	10 mg
SDS	0,5 g
0,5 M DTT	800 µl
H ₂ O	ad 10 ml

3.2.25 Western Blot Analyse

Beim Western Blot handelt es sich um eine Methode bei der Proteine mittels Antikörpern spezifisch nachgewiesen werden können. Dazu wurden die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben anhand der Blot-Apparatur Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell auf eine Protan® Nitrocellulose Transfer Membran (Whatman, NJ, USA) übertragen, die zuvor in Blot-Puffer inkubiert wurde. Zum Blotten wurde für 75 min eine von der Anzahl und Größe der Blots abhängige Stromstärke angelegt, welche 55 mA je Membran betrug. Nach dem Transfer wurden die noch freien Bindungsstellen der Membran geblockt, indem die Membran in 3% Magermilch in TBS-T für 1 h bei RT blockiert wurde. Es folgte die Inkubation mit dem für das zu detektierende Protein spezifischen primären Antikörper (1:300 in 3% Magermilch in TBS-T) über Nacht bei 4°C. Die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper SY490 und SYR237 sind unter 3.2.26 beschrieben. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 15 min bei RT mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG (Bio-Rad, München), 1:2500) in TBS-T für 1 h bei RT im Dunklen inkubiert. Die Membran wurde dann erneut dreimal für 15 min bei RT mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran mit einem dünnen Film des Western Lightning Plus ECL Substrats (PerkinElmer, Waltham, USA) bedeckt und die Detektion erfolgte mit dem Molecular Imager ChemiDoc XRS System.

3.2.26 Herstellung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Die Herstellung der polyklonalen Antikörper anti-CcpA und anti-CcpE wurde von der Firma Eurogentec (Liege, Belgien) durchgeführt. Durch die Immunisierung von Kaninchen mit 500 µg His-getaggttem rekombinanten CcpA bzw. CcpE konnte anti-CcpA-Antiserum (SY490) und anti-CcpE-Antiserum (SYR237) gewonnen werden. Zur Gewinnung der anti-CcpA-Antikörper und anti-CcpE-Antikörper wurden die Antiseren aufgereinigt.

Dazu wurde der aufzureinigende Antikörper mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet (beschrieben unter 3.2.24 und 3.2.25). Im Anschluss daran wurde die Protan® Nitrocellulose Transfer Membran für 60 s mit Poncaeu S (Tab 3.17) angefärbt, um die Banden sichtbar zu machen. Der Blot wurde mit TBS-T gewaschen und der gewünschte Bereich mit einem Skalpell ausgeschnitten. Der Blot

wurde dann in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 1 h in 3% Magermilch in TBS-T geblockt und anschließend 1 ml des anti-CcpA-Antiserum (SY490) bzw. anti-CcpE-Antiserum (SYR237) zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Serum abgenommen. Der Blot wurde dann dreimal mit 1 ml TBS-T gewaschen. Um die gebundenen Antikörper zu eluieren wurde der Blot für 7 min mit 1 ml 0,1 M Glycin-HCL Puffer (Tab 3.17) gewaschen. Anschließend wurde der so eluierte Antikörper abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 100 µl 2 M Tris (pH 8,0) zugegeben. Die Eluierung wurde je Blot dreimal wiederholt.

Tab. 3.17: Lösungen und Puffer für die Antikörperaufreinigung

Komponente	Konzentration / Menge
Ponceau S	
Ponceau S	0,1% (w/v)
Essigsäure	5%
0,1 M Glycin-HCL Puffer	
Glycin-HCl	1,11 g
H ₂ O	ad 100 ml
auf pH 2,7 einstellen autoklavieren	

3.2.27 Bestimmung der Konzentrationen von Glukose, Acetat und Ammoniak in Kulturüberständen

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Glukose, Acetat und Ammoniak in den Kulturüberständen wurden aus der Bakterienkultur stündlich über einen Zeitraum von 12 Stunden 2 ml entnommen, bei 15000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert, die Überstände in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und diese anschließend bei -20°C gelagert. Für die Bestimmung der Konzentrationen von Glukose, Acetat und Ammoniak in den so vorbereiteten Überständen wurden die Kits „D-Glucose“, „Acetic acid“ und „Ammonia“ nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.28 Proteinbestimmung nach Bradford

Anhand der Bradford Methode kann die Konzentration von Proteinen photometrisch quantifiziert werden (Bradford, 1976). In dieser Arbeit wurde dafür das Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, München) verwendet und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung der OD erfolgte bei 595 nm. Durch den Abgleich mit einer Standardkurve von definierten BSA-Konzentrationen konnte so die Proteinkonzentration in den zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

3.2.29 Bestimmung der Enzymaktivitäten von Aconitase und Citrat Synthase

3.2.29.1 Aconitase

Die Bestimmung der Aconitase-Aktivität wurde nach der Methode von Kennedy *et al.* (1983) mit folgenden Änderungen durchgeführt. Zunächst wurden aus den Bakterienkulturen zu den entsprechenden Zeitpunkten je 2 ml entnommen und bei 15000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in 850 µl ACN-Puffer (Tab. 3.18) resuspendiert und die Bakterienzellen unter Verwendung der Lysing Matrix B (MP Biomedicals, Eschwege) im FastPrep FP120 für 30 s mit Speed 6,0 aufgeschlossen. Die Lysate wurden dann bei 15000 x g und 4°C für 1 min zentrifugiert und die Überstände in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die Bestimmung der Aconitase-Aktivität wurden von jeder zu untersuchenden Probe jeweils 50 µl und 100 µl des zellfreien Lysats in einem Reaktionsmix mit einem Gesamtvolumen von 1 ml in einer UV-Küvette gemischt:

Reaktionsmix mit 50 µl zellfreiem Lysat

90 µl	1 M Tris (pH 8,0)
200 µl	100 mM DL-Isocitric acid trisodium salt hydrate
660 µl	LiChrosolv [®] Wasser
50 µl	Zelllysate

Reaktionsmix mit 100 µl zellfreiem Lysat

90 µl	1 M Tris (pH 8,0)
200 µl	100 mM DL-Isocitric acid trisodium salt hydrate
610 µl	LiChrosolv [®] Wasser
100 µl	Zelllysate

Der Reaktionsmix wurde dann für 2 min inkubiert und anschließend über eine Dauer von 10 min jede Minute die OD bei 240 nm bestimmt. Dabei wird 1 Unit Aconitase-Aktivität als die Menge an Enzym definiert, welche in einem Anstieg der OD₂₄₀ um 0,0033 Einheiten pro Minute resultiert. Die spezifische Aconitase-Aktivität wurde als Units/mg Gesamtprotein im zellfreien Lysat ermittelt. Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge im zellfreien Lysat erfolgte wie unter 3.2.28 beschrieben.

Tab. 3.18: Zusammensetzung des ACN-Puffers

Komponente	Konzentration / Menge
ACN-Puffer	
Tris (pH 8,0)	90 mM
Fluorocitrat	0,1 mM

3.2.29.2 Citrat Synthase

Die Bestimmung der Aktivität der Citrat Synthase wurde mit dem „Citrates Synthase Assay Kit“ mit kleineren Änderungen durchgeführt. Aus den Bakterienkulturen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten je 2 ml entnommen und bei 15000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in 500 µl CellLytic M Cell Lysis Reagent resuspendiert und die Bakterienzellen unter Verwendung der Lysing Matrix B (MP Biomedicals, Eschwege) im FastPrep FP120 für 30 s mit Speed 6,0 aufgeschlossen. Die Lysate wurden dann bei 15000 x g und 4°C für 1 min zentrifugiert und die Überstände in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Für die Bestimmung der Aktivität der Citrat Synthase wurden von jeder zu untersuchenden Probe 10 µl des zellfreien Lysats mit 0,1 mM 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 0,3 mM Acetyl Coenzyme A (CoA) in 1x Assay Buffer gemischt und in eine Küvette pipettiert. Der Reaktionsmix wurde dann für 20 s inkubiert und anschließend über eine Dauer von 90 s alle 10 s die OD bei 412 nm verfolgt, um die Hintergrundaktivität zu bestimmen. Anschließend wurden 50 µl einer 10 mM Oxaloacetate (OAA) Lösung zugegeben, der Reaktionsmix für 20 s inkubiert und anschließend über eine Dauer von 90 s alle 10 s die OD bei 412 nm bestimmt, wobei die Bildung von 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) gemessen wird. Die Enzymaktivität (Units) wurde als die Menge an gebildeten TNB in µmol pro min pro mg Gesamtprotein definiert. Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge im zellfreien Lysat erfolgte wie unter 3.2.28 beschrieben.

3.2.30 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm „R“ (R Development Core Team - R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich). Für die Auswertung wurden der Mann-Whitney-U-Test oder der Student's *t*-Test verwendet. Die Signifikanzen wurden folgendermaßen festgelegt: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung des Einflusses von CcpA auf die Biofilmbildung in *S. epidermidis*

4.1.1 Einfluss von CcpA auf die Transkription von *icaADBC*

S. epidermidis gilt als einer der bedeutendsten Verursacher von Biofilm-assoziierten Infektionen. Ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix der meisten Biofilme dieses Pathogens ist das interzelluläre Polysaccharid Adhäsion (PIA), welches durch die Genprodukte des *icaADBC* Operons synthetisiert wird. In *S. epidermidis* führt eine Repression des TCA-Zyklus zu einer erhöhten Transkription des *icaADBC* Operons (Sadykov *et al.*, 2008). Interessanterweise ist CcpA ein Glukose-abhängiger Repressor des TCA-Zyklus in vielen gram-positiven Bakterien.

Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss einer Deletion von *ccpA* auf die Transkription von *icaD* mittels qPCR untersucht, welches Teil des *icaADBC* Operons ist. Dazu wurden die Stämme 1457 (Wildtyp), 1457 Δ *ccpA* (Mutante) und 1457 Δ *ccpA*-compl (Komplementation) in TSB Medium + 1% Glukose angezogen und nach 2 und 6 Stunden erfolgten die Probenahmen. Die genannten Stämme lagen für diese Untersuchungen bereits vor und sind in Sadykov *et al.* (2011) näher beschrieben.

Die Ergebnisse der qPCR zeigten einen moderaten, aber signifikanten Einfluss der Deletion von *ccpA* auf die Transkription von *icaD*, was sich in einer 2 bis 3-fach reduzierten Menge an *icaD*-Transkript in der Δ *ccpA* Mutante im Vergleich zum Wildtyp äußerte (Abb. 4.1). Dieser Effekt war sowohl in der exponentiellen (2 Stunden) als auch der post-exponentiellen (6 Stunden) Wachstumsphase zu beobachten. Die Komplementation zeigte dagegen zu beiden untersuchten Zeitpunkten wieder eine zum Wildtyp vergleichbare *icaD* Transkription.

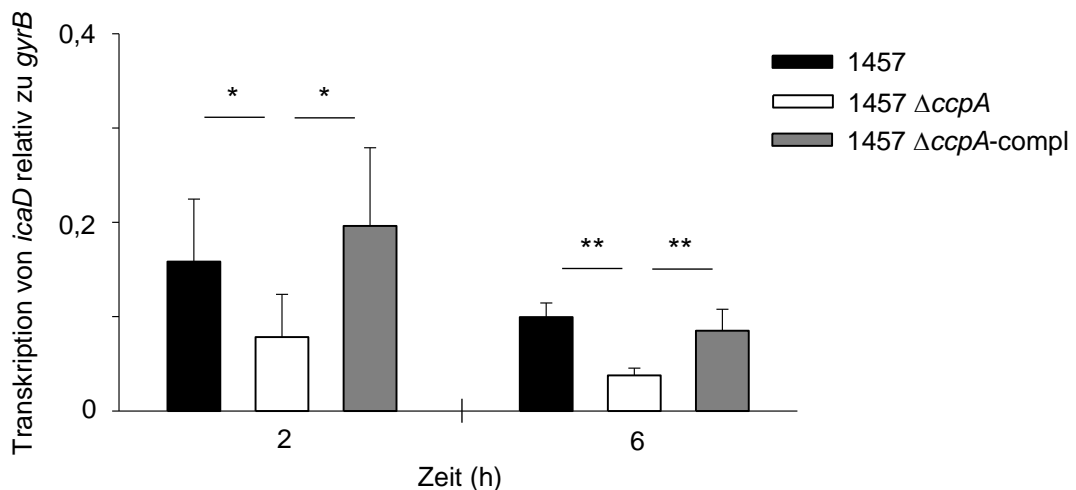


Abb. 4.1: Quantitative Transkriptionsanalyse von *icaD* in *S. epidermidis* Stamm 1457 (Wildtyp), 1457 Δ ccpA (Mutante) und 1457 Δ ccpA-compl (Komplementation) nach 2 und 6 Stunden Wachstum in TSB Medium bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

4.1.2 Einfluss von CcpA auf die Biofilmbildung

Aufgrund des signifikanten Einflusses von CcpA auf die Transkription von *icaD* stellte sich die Frage, ob die Deletion von *ccpA*, ähnlich wie in *S. aureus* (Seidl *et al.*, 2008a), auch in *S. epidermidis* zu einer verminderten Fähigkeit der Ausbildung eines Biofilms führt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Biofilm-Versuche unter statischen, Schüttel- und Flussbedingungen in TSB Medium + 1% Glukose durchgeführt.

Die ersten Experimente zur Biofilmbildung wurden unter statischen Bedingungen in 24-well Polystyrol-Platten durchgeführt, in denen die Bakterien für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden. Unter diesen Bedingungen bildet sich am Boden der Wells eine Biofilmschicht aus, welche im Anschluss qualitativ und mittels Anfärbung quantitativ ausgewertet werden kann.

Die Deletion von *ccpA* resultierte unter diesen Bedingungen in einer mit zunehmender Verdünnung des Start-Inokulums reduzierten Biofilmbildung im Vergleich zum Wildtyp, während die Komplementation den Phänotyp des Wildtyps

wiederherstellte (Abb. 4.2A). Die Quantifizierung der Biofilmbildung erfolgte durch eine Anfärbung mit 0,1% Safranin mit anschließender photometrischer Messung. Hier konnte ebenfalls eine signifikante, bis zu etwa 8-fache Reduktion (Verdünnungsstufe 1:1014) der Biofilmbildung in der $\Delta ccpA$ Mutante beobachtet werden, während die Biofilmbildung der Komplementante der des Wildtyps entsprach (Abb. 4.2B).

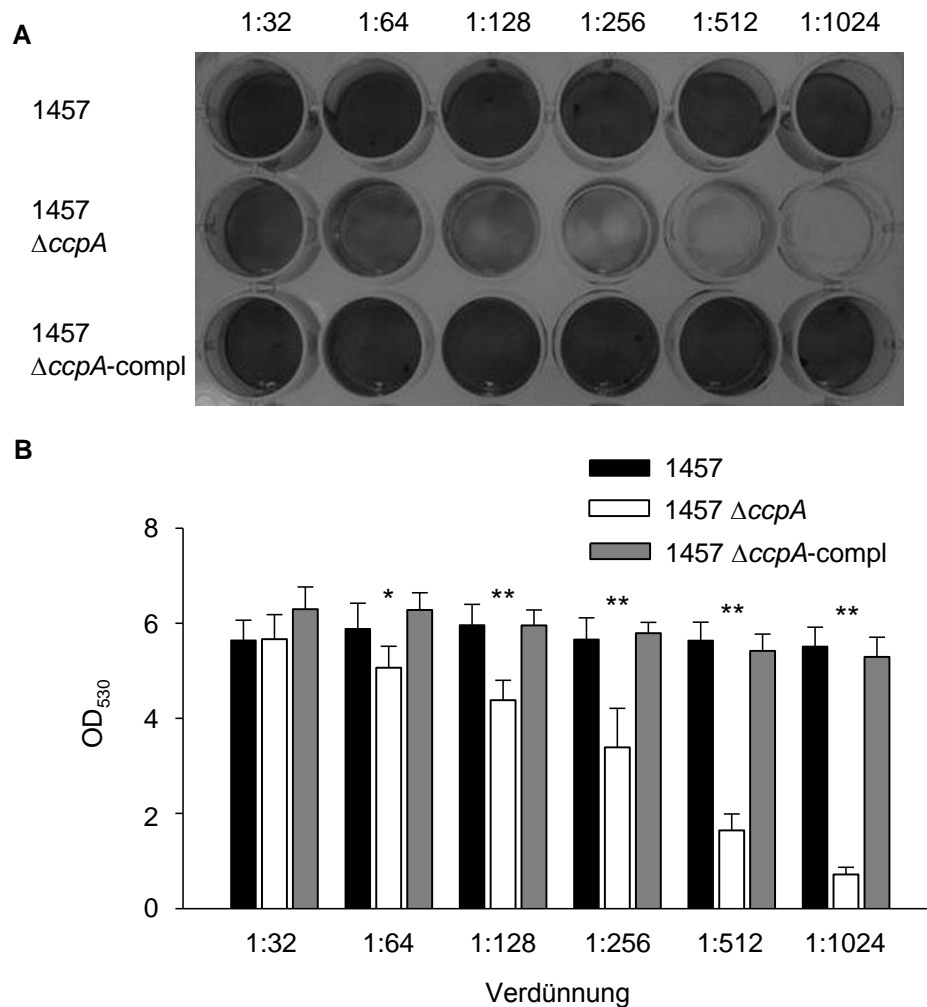


Abb. 4.2: (A) Biofilmbildung in verschiedenen Verdünnungsstufen des Inokulums von *S. epidermidis* Stamm 1457 (Wildtyp), 1457 $\Delta ccpA$ (Mutante) und 1457 $\Delta ccpA$ -compl (Komplementation) unter statischen Bedingungen nach 24 Stunden Wachstum in TSB + 1% Glukose bei 37°C. (B) Quantifizierung (OD₅₃₀) der Biofilmbildung. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Für eine Bestätigung der Ergebnisse aus den statischen Biofilm-Versuchen wurden im Anschluss Schüttelversuche in Glasröhrchen durchgeführt, in denen die Bakterien für 24 h bei 37°C im Inkubationsschüttler angezogen wurden. Unter diesen Bedingungen bildet sich eine Biofilmschicht an der Oberfläche der Glasröhrchen, welche, analog zu den statischen Bedingungen, qualitativ und quantitativ ausgewertet werden kann.

Wie zuvor zeigte sich eine deutlich verringerte Biofilmbildung in der $\Delta ccpA$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp, während die Komplementante den Phänotyp des Wildtyps wiederherstellen konnte (Abb. 4.3A). Die anschließende Quantifizierung ergab erneut eine signifikante, 4-fache Reduzierung des Biofilms in 1457 $\Delta ccpA$ im Vergleich zum Wildtyp und der Komplementante (Abb. 4.3B).

Aufgrund der Repression des TCA-Zyklus durch CcpA in Anwesenheit von Glukose kommt es unter aeroben Bedingungen zu einer Anreicherung von Acetat und in der Folge zu einer Abnahme des pH-Wertes im Medium. Die pH-Werte im Medium der $\Delta ccpA$ Mutante dagegen sind aufgrund der fehlenden Repression des TCA-Zyklus alkalischer, da hier das Acetat bereits zur frühen Wachstumsphase über diesen Stoffwechselweg verstoffwechselt werden kann (Sadykov *et al.*, 2011). Um auszuschließen, dass der unterschiedliche pH-Wert zwischen dem Wildtyp und der $\Delta ccpA$ Mutante ein möglicher Faktor für den beobachteten Biofilm-Phänotyp war, wurden die Schüttelversuche mit einem Start-pH-Wert von 6 bzw. 7 durchgeführt. Wie in Abb. 4.3 zu sehen, führte der niedrigere Start-pH-Wert von 6 allgemein zu einer geringeren Biofilmbildung, wobei sich auch unter diesen Bedingungen die verminderte Fähigkeit der Ausbildung eines Biofilms in der $\Delta ccpA$ Mutante zeigte. Die Quantifizierung ergab entsprechend dem Start-pH-Wert von 7 eine signifikante, 4-fache Reduktion des Biofilms in 1457 $\Delta ccpA$, während Stamm 1457 $\Delta ccpA$ -compl den Phänotyp des Wildtyps wieder komplementierte. Der Effekt von CcpA auf die Biofilmbildung war somit unter den getesteten Bedingungen unabhängig vom extrazellulären pH-Wert.

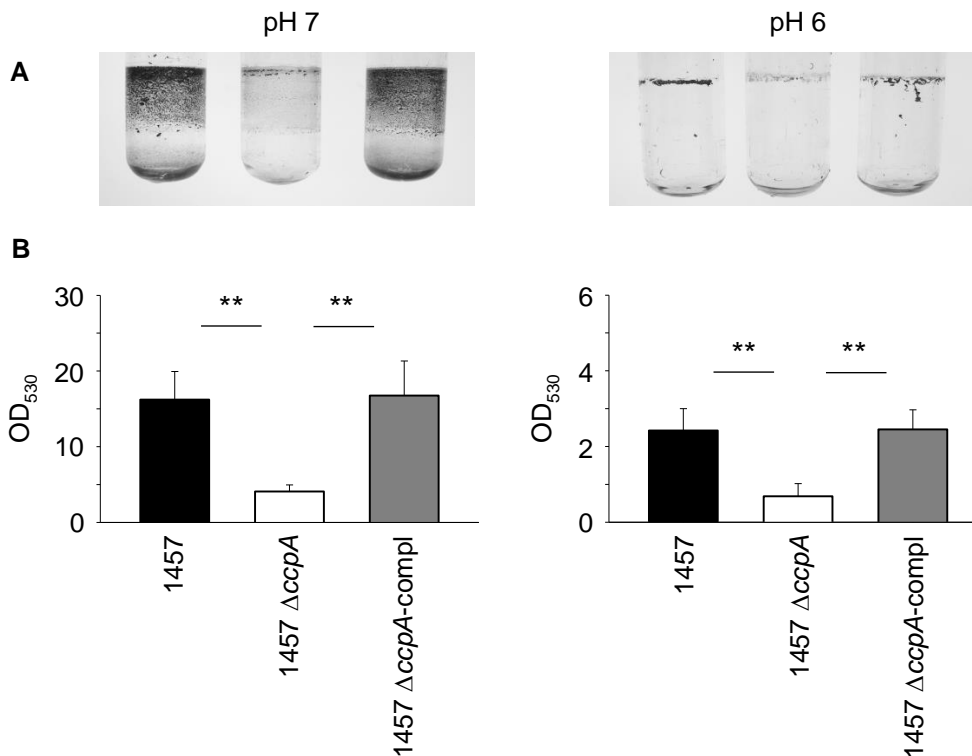


Abb. 4.3: (A) Biofilmbildung von *S. epidermidis* Stamm 1457 (Wildtyp), 1457 Δ ccpA (Mutante) und 1457 Δ ccpA-compl (Komplementation) im Schüttelversuch. Die Kulturen wurden dabei in Glasröhrchen in TSB + 1% Glukose mit einem Start-pH-Wert von 6 bzw. 7 für 24 Stunden bei 37°C und 150 rpm im Inkubationsschüttler angezogen. (B) Quantifizierung (OD₅₃₀) der Biofilmbildung. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

Um den Effekt der Deletion von *ccpA* auf die Fähigkeit der Biofilmbildung auch unter kontrollierten Flussbedingungen zu testen, wurden entsprechende Experimente mit Hilfe des BioFlux 200 Systems in einer 48-well Mikrofluidik-Platte durchgeführt. Anhand dieses Systems kann die Entwicklung des Biofilms in Echtzeit unter dem Mikroskop beobachtet werden, ohne dabei den Prozess zu stören. Durch den Mediumfluss wirken darüber hinaus Scherkräfte auf den Biofilm ein, was auch unter natürlicherweise vorkommenden dynamischen Bedingungen häufig der Fall sein kann. Nach 18 Stunden Wachstum bei 37°C und einer Flussrate von 5 μ N cm² wurde der ausgebildete Biofilm dokumentiert.

Wie in Abb. 4.4 zu sehen, hat die Deletion von *ccpA* auch unter Flussbedingungen einen deutlichen Einfluss auf die Fähigkeit der Biofilmbildung von *S. epidermidis* Stamm 1457. Während der Wildtyp und die Komplementation innerhalb der 18 Stunden einen klar ausgeprägten Biofilm entwickelten, führte die Deletion von *ccpA*

zu einem Verlust dieses Phänotyps. In der Flusskammer von 1457 $\Delta ccpA$ waren nur vereinzelte Ansammlungen adhärenter Bakterienzellen zu beobachten.

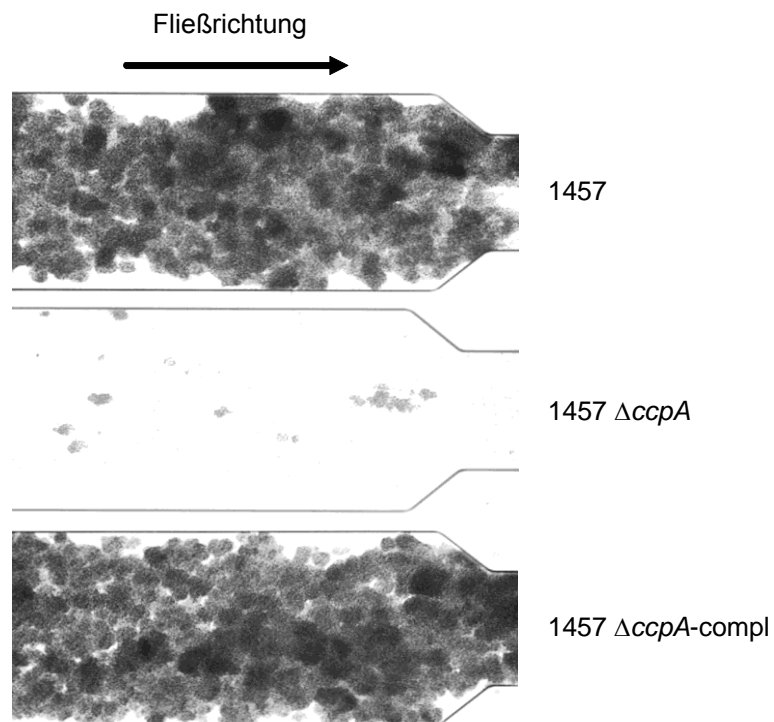


Abb. 4.4: Biofilmbildung von *S. epidermidis* Stamm 1457 (Wildtyp), 1457 $\Delta ccpA$ (Mutante) und 1457 $\Delta ccpA$ -compl (Komplementation) unter kontrollierten Flussbedingungen nach 18 Stunden Wachstum in TSB + 1% Glukose bei 37°C. Das Flussexperiment wurde mit Hilfe des BioFlux 200 Systems in einer 48-well Mikrofluidik-Platte durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Deletion von *ccpA* nach 2 und 6 Stunden Wachstum in einer reduzierten Transkription von *icaD* resultierte. Darüber hinaus führte die Deletion von *ccpA* unter allen getesteten Bedingungen zu einer stark reduzierten Fähigkeit der Biofilmbildung in *S. epidermidis* Stamm 1457. Dabei war dieser Effekt unter Flussbedingungen besonders deutlich ausgeprägt. Zusätzlich wurde festgestellt, dass der CcpA-Effekt auf die Biofilmbildung unter den getesteten Bedingungen unabhängig von einem sinkenden extrazellulären pH-Wert zu sein scheint.

4.2 Überprüfung der physiologischen Relevanz einer Phosphorylierung von CcpA durch Stk1 in *S. aureus*

4.2.1 *Trans*-Komplementation der $\Delta ccpA$ Mutante KS66 mit dem *ccpA* Wildtyp-Allel, sowie einer phosphoablative und phosphomimetischen Variante von CcpA

In vitro Untersuchungen der Arbeitsgruppe V. Molle (CNRS, Montpellier, Frankreich) wiesen darauf hin, dass CcpA von Stk1 in seiner DNA-Bindedomäne an Threonin-18 und Threonin-33 phosphoryliert werden kann und dass dies zu einem Verlust der Bindefähigkeit an seine *cre* Sequenzen führt (Leiba *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die physiologische Relevanz einer derartigen Phosphorylierung von CcpA in Hinblick auf bekannte CcpA-Phänotypen in *S. aureus* untersucht werden. Die für die Versuche nötige Mutante (KS66; SA113 $\Delta ccpA$) lag bereits vor und ist in Seidl *et al.* (2008a) beschrieben. Die *trans*-Komplementante mit dem Wildtyp-Allel (KS66*pCN34_ *ccpA*), sowie eine phosphoablative (CcpA_T18A/T33A) Komplementation (KS66*pCN34_ *ccpA_Ala*) und eine phosphomimetische (CcpA_T18D/T33D) Version (KS66*pCN34_ *ccpA_Asp*) wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Die dazu benötigten Plasmide wurden von V. Molle zur Verfügung gestellt (beschrieben in Leiba *et al.*, 2012) und im Rahmen dieser Arbeit in den *S. aureus* Stamm RN4220 elektroporiert und anschließend über Phagentransduktion in Stamm KS66 transduziert. Während bei der phosphoablative Komplementation durch den Austausch von Threonin zu Alanin keine Phosphorylierung von CcpA mehr möglich ist, wird bei der phosphomimetischen Komplementation durch den Austausch von Threonin zu Asparaginsäure eine permanente funktionelle Phosphorylierung nachgeahmt.

4.2.2 Auswirkung der Phosphorylierung von CcpA auf die Expression von CcpA

Zunächst wurde die Expression von CcpA in den zu untersuchenden Stämmen SA113, KS66, KS66*pCN34_ *ccpA*, KS66*pCN34_ *ccpA_Ala* und KS66*pCN34_ *ccpA_Asp* mittels Western Blot Analyse mit einem gegen CcpA gerichteten polyklonalen Antikörper untersucht. Zur Untersuchung dienten

zytosolische Proteinextrakte von 6 Stunden Kulturen nach einem Wachstum in TSB Medium + 0,1% Glukose.

Die Ergebnisse bestätigten, dass CcpA in der $\Delta ccpA$ Mutante KS66 nicht mehr nachweisbar war (Abb. 4.5A). Dagegen zeigten das mit dem Wildtypallel komplementierte Derivat KS66*pCN34_ccpA und die phosphoablative Komplementante KS66*pCN34_ccpA_Ala eine höhere Proteinmenge an CcpA im Vergleich zum Wildtyp SA113. Interessanterweise konnte für die phosphomimetische Komplementante KS66*pCN34_ccpA_Asp eine deutlich erhöhte Menge an CcpA im Vergleich zu allen anderen Stämmen beobachtet werden.

Die Ergebnisse der anschließenden quantitativen Transkriptionsanalyse bestätigten die Beobachtungen der Western Blot Analyse (Abb. 4.5B). Während in der $\Delta ccpA$ Mutante KS66, passend zu den Daten des Western Blots, kein *ccpA*-Transkript nachgewiesen werden konnte, war die Menge an mRNA von *ccpA* in KS*pCN34_ccpA und der phosphoablative Komplementante KS66*pCN34_ccpA_Ala etwa viermal höher im Vergleich zum Wildtyp. Die phosphomimetische Komplementante KS66*pCN34_ccpA_Asp zeigte dagegen eine etwa 67-fach höhere Transkription von *ccpA* im Vergleich zu SA113 und lässt damit eine negative Autoregulation dieses DNA-Bindeproteins in *S. aureus* vermuten.

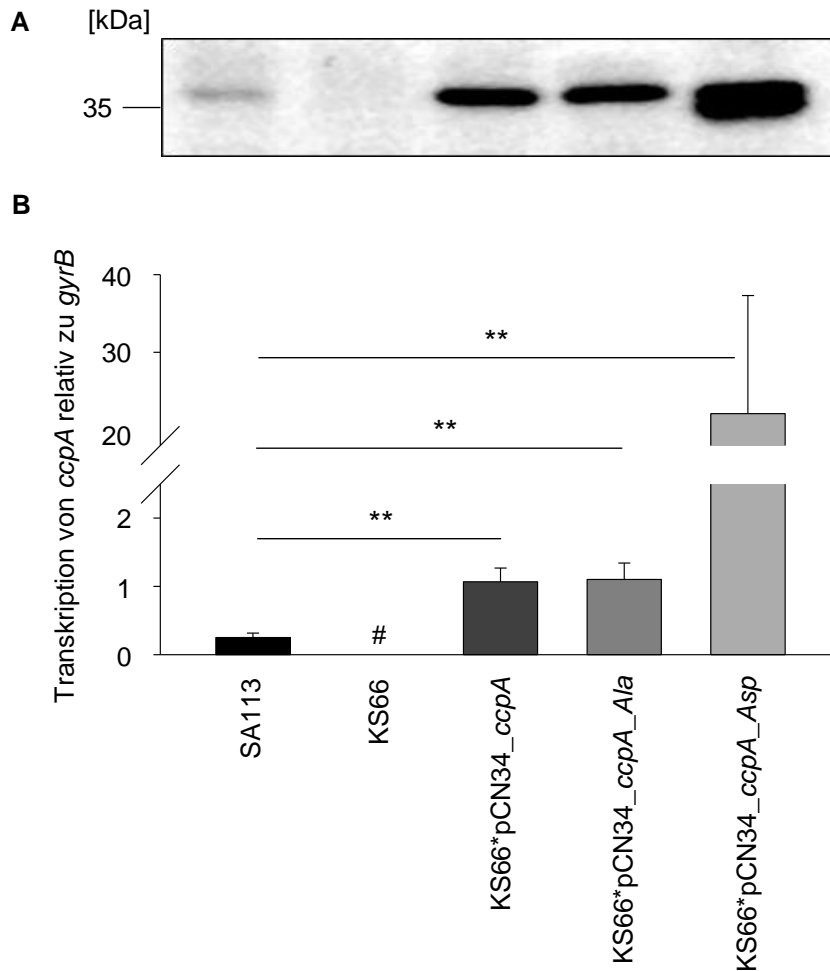


Abb. 4.5: **(A)** Western Blot Analyse zytosolischer Proteinextrakte von *S. aureus* Stamm SA113, der Δ *ccpA* Mutante KS66 und dessen Komplementanten mit dem Wildtypallel (KS66*pCN34_ccpA), sowie der phosphoablative CcpA Variante CcpA_T18A/T33A (K66*pCN34_ccpA_Ala) und der phosphomimetischen CcpA Variante CcpA_T18D/T33D (KS66*pCN34_ccpA_Asp) nach 6 Stunden Wachstum in TSB + 0,1% Glukose bei 37°C. Verwendet wurde der gegen CcpA gerichtete polyklonale Antikörper SY490. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Wiederholungen. **(B)** Quantitative Transkriptionsanalyse von *ccpA* in *S. aureus* Stamm SA113 und den Komplementationen nach 3 Stunden Wachstum in TSB + 0,1% Glukose bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen zwischen SA113 und den Komplementanten wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$. #, Transkriptmenge unter dem Detektionslimit.

4.2.3 Auswirkung der Phosphorylierung von CcpA auf die Transkription CcpA-regulierter Gene

Im nächsten Schritt sollte die Auswirkung der Phosphorylierung von CcpA auf bereits bekannte, von CcpA regulierte Gene, untersucht werden. Dafür wurden quantitative Transkriptionsanalysen der CcpA-regulierten Gene *citZ* und *hla* durchgeführt, welche für die Citrat Synthase des TCA-Zyklus bzw. das α -Hämolysin kodieren. Die Probenahmen erfolgten nach 3 Stunden (*citZ*) und 8 Stunden (*hla*) Wachstum in TSB-Medium + 0,1% Glukose.

Im Einklang mit der Literatur (Seidl *et al.*, 2008a) konnte für die *citZ* Transkription in der exponentiellen Wachstumsphase (3 Stunden), in der CcpA als Repressor von *citZ* fungiert, eine signifikant erhöhte (etwa 4-fach) Menge an *citZ* mRNA in der Δ *ccpA* Mutante KS66 im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abb. 4.6A). Für *hla*, welches vermehrt zu späteren Zeitpunkten des Wachstums transkribiert wird, konnte zum Zeitpunkt 8 Stunden, innerhalb der post-exponentiellen Phase, ebenfalls in Übereinstimmung mit der Literatur (Seidl *et al.*, 2006) in KS66 eine signifikante Reduktion (etwa 7-fach) der Transkription im Vergleich zu SA113 beobachtet werden (Abb. 4.6B). Die mit dem Wildtypallel und der phosphoablative Variante komplementierten Derivate KS66*pCN34_ *ccpA* sowie KS66*pCN34_ *ccpA*_Ala zeigten dagegen wieder eine zum Wildtyp vergleichbare Menge an Transkripten von *citZ* und *hla*. Die Komplementation von KS66 mit der phosphomimetischen CcpA Variante CcpA_T18D/T33D (KS66*pCN34_ *ccpA*_Asp) hingegen führte zu keiner Veränderung der Transkription von *citZ* und *hla* im Vergleich zur Δ *ccpA* Mutante KS66.

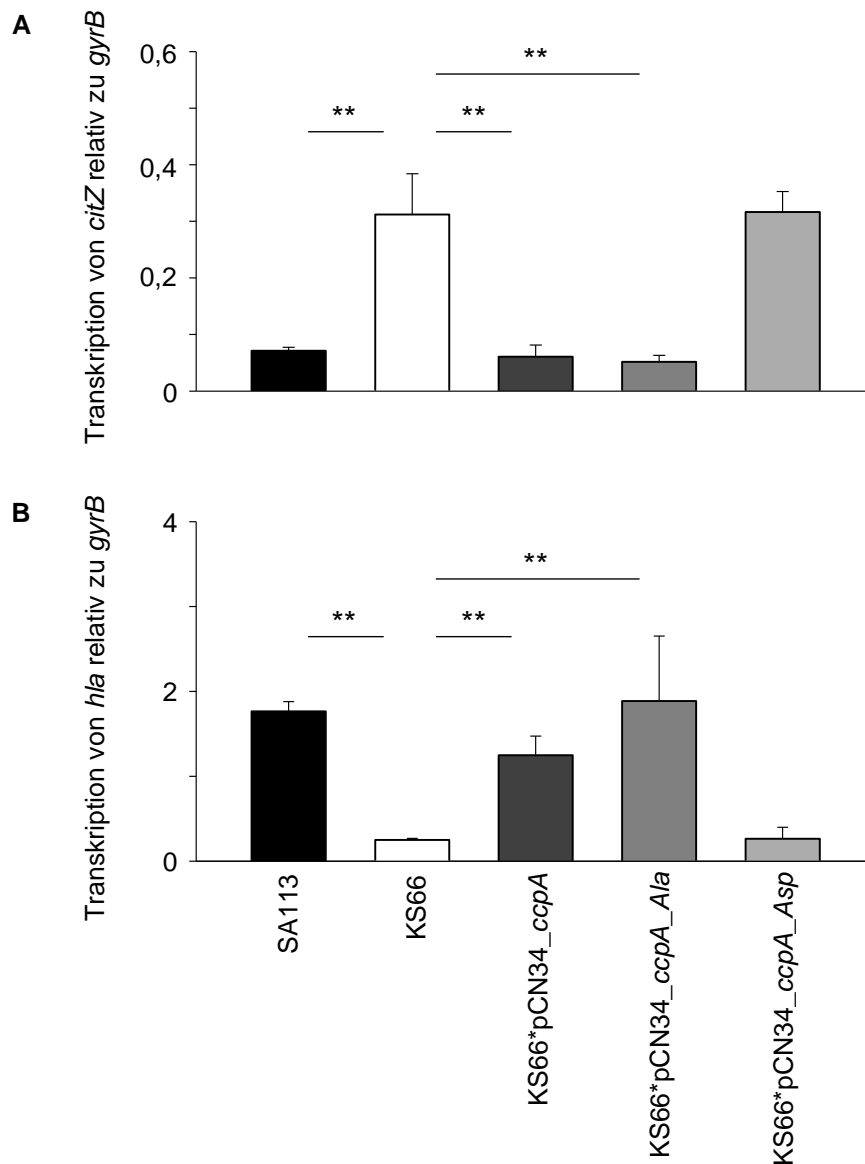


Abb. 4.6: Quantitative Transkriptionsanalyse mittels qPCR von *citZ* (**A**) und *hla* (**B**) in *S. aureus* Stamm SA113, der Δ *ccpA* Mutante KS66 und dessen Komplementanten mit dem Wildtypallel (KS66*pCN34_ccpA), sowie der phosphoablative CcpA Variante CcpA_T18A/T33A (KS66*pCN34_ccpA_Ala) und der phosphomimetischen CcpA Variante CcpA_T18D/T33D (KS66*pCN34_ccpA_Asp) nach 3 Stunden (*citZ*) und 8 Stunden (*hla*) Wachstum in TSB + 0,1% Glukose bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen zwischen KS66 und SA113 sowie den Komplementanten wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

4.2.4 Auswirkung der Phosphorylierung von CcpA auf die Biofilmbildung

CcpA ist als essentieller Faktor für die Biofilmbildung von *S. aureus* beschrieben (Seidl *et al.*, 2008a). Daher stellte sich die Frage, ob die Phosphorylierung von CcpA durch Stk1 auch einen relevanten Effekt auf die Biofilmbildung von *S. aureus* hat. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Schüttelversuche mit den *S. aureus* Stämmen SA113, KS66, KS66*pCN34_ccpA, K66*pCN34_ccpA_Ala und KS66*pCN34_ccpA_Asp durchgeführt, welche in Glasröhrchen mit TSB + 0,1% Glukose für 24 h bei 37°C im Inkubationsschüttler angezogen wurden.

Wie in Abb. 4.7 zu erkennen, bildete SA113 unter diesen Wachstumsbedingungen vornehmlich einen Biofilm an der Oberfläche des Glasröhrchens aus, während die $\Delta ccpA$ Mutante KS66 weiterhin ohne relevante Aggregatbildung in planktonischer Form vorlag und somit keine Fähigkeit der Biofilmbildung zu beobachten war. Die Komplementante KS66*pCN34_ccpA sowie die phosphoablative Variante KS66*pCN34_ccpA_Ala konnten dagegen den beim Wildtyp zu beobachtenden Phänotyp wiederherstellen. Die phosphomimetische Komplementante KS66*pCN34_ccpA_Asp hingegen zeigte einen zur $\Delta ccpA$ Mutante KS66 vergleichbaren Phänotyp und somit einen Verlust der Fähigkeit zur Biofilmbildung.

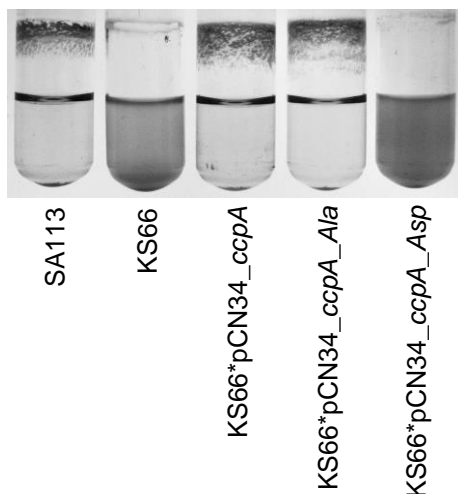


Abb. 4.7: Biofilmbildung von *S. aureus* Stamm SA113, der $\Delta ccpA$ Mutante KS66 und dessen Komplementanten mit dem Wildtypallel (KS66*pCN34_ccpA), sowie der phosphoablative CcpA Variante CcpA_T18A/T33A (KS66*pCN34_ccpA_Ala) und der phosphomimetischen CcpA Variante CcpA_T18D/T33D (KS66*pCN34_ccpA_Asp) im Schüttelversuch. Die Kulturen wurden in TSB + 0,1% Glukose für 18 Stunden bei 37°C und 150 rpm im Inkubationsschüttler in Reagenzgläsern angezogen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Wiederholungen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Phosphorylierung von CcpA durch Stk1 in einem Phänotyp vergleichbar zu einer $\Delta ccpA$ Mutante resultierte. So führte die Phosphorylierung zu einer deutlich erhöhten Transkription und Expression von *ccpA*. Darüber hinaus resultierte die Phosphorylierung in einer zur $\Delta ccpA$ Mutante vergleichbar erhöhten bzw. verminderten Transkription der CcpA-regulierten Gene *citZ* und *hla*, sowie einem Verlust der Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms.

4.3 Charakterisierung des neuen KKR- Regulators CcpE in *S. aureus*

4.3.1 Identifizierung eines putativen Homologs von CcpC aus *B. subtilis*

Zur Identifizierung weiterer in die Kohlenstoffkatabolismus-Regulation involvierter Faktoren in *S. aureus* wurde ein bioinformatischer Vergleich der Genome des *B. subtilis* Stammes 168 (Genbank Zugangsnummer AL009126.3) und des *S. aureus* Stammes Newman (Genbank Zugangsnummer AP009351.1) durchgeführt. Dabei konnte mit dem bisher nicht näher charakterisierten Gen NWMN_0641 (im Rahmen dieser Arbeit in *ccpE* umbenannt) ein mögliches *ccpC*-Homolog identifiziert werden, dessen Genprodukt CcpE (Katabolit-Kontrollprotein E) eine 61% Ähnlichkeit und 35% Identität zu CcpC (BSU14140) aus dem *B. subtilis* Stamm 168 aufwies (Abb. 4.8). Ferner wurde auch dieses Gen als putatives Mitglied der LTTR-Familie (LysR-type transcriptional regulator) in verschiedenen *S. aureus* Genomsequenzierungsprojekten annotiert. Anhand der Daten einer Microarray-basierten Transkriptomanalyse in Stamm Newman (Bischoff *et al.*, 2004) und einer bioinformatischen Analyse der Genregion zeigte sicher darüber hinaus, dass *ccpE* scheinbar mit dem oberhalb von NWMN_0641 liegenden Gen NWMN_0640 ein Operon bildet und beide Gene von einem Promoter vor NWMN_0640 kontrolliert werden.


```

CcpC  MQLQELHMLVVLAEELNMRKAAERLFVSPALSQRQLQTIKAWGTFKIFLRSQKGLTVTPA 60
      *::: .*:.* * .:***** *:*****:*****:*****:*.**:*:* * .*.
CcpE  MKIEDYRLLITLDETCLRKAAILYISQPAVTQRLKAIENAFGVDIFIRTKKQLITTE 60

CcpC  GEKIIQFANDVTLEQERIRENIDELEGEIHGTLKLVASIIIGQHWLPKVLKTYVEKYPNA 120
      * **:*.*.*: .: . : :::: **:*:*:.. :*:*** **:*.* * :*:*.
CcpE  GTMIEHARDMLKRERLFFDKMQAHIGEVNGTISIGCSSLIGQTLLEPEVLSLYNAQFPNV 120

CcpC  KISLITGWSSEMLKSLYEDQVHIGIIRGNPEWKGRKDYLMTDHLVLDTEISCIEDIAHT 180
      *.: .* *:* *:* :.* *:* * * * * : : :*:.*. *:* :. *
CcpE  EIQVQVG-STEQIKANHRD-YHVMITRGNKVMNLANTHLFNDDHYFIFPKN---RRDDVT 175

CcpC  ERPFIQFKSDSTYFQEIQHWHWQKFKTSPKQITLVDQIETCKQMALHGIGYAILPSVTLQ 240
      : **:*:*:*.* *:::*:*.*:~::~: . : ** **:* : **:* * : *:* :***.: :
CcpE  KLPFIEFQADPIYINQIKEWYNDNLEQDYHATITVDQVATCKEMLISGVGVTTILPEIMMK 235

CcpC  NEDK-VNKMPLLDKMGHPIGRDTWLLGYEPAFELKQVQAFVQVIKDMLDQENPF 293
      * .* : : :~::~:*.*: : . :*: **:*:*:~::~: .:~::~: * .
CcpE  NISKEQEFEFKVEIDNEPLIRSTFMSYDPSMLQLPQVDSFVNLMASFVEQPKA- 288

```

Abb. 4.8: Bioinformatischer Vergleich der Aminosäuresequenzen von CcpC aus *B. subtilis* Stamm 168 (BSU14140) und CcpE (NWMN_0641) aus *S. aureus* Stamm Newman mittels ClustalW2. (*), identische Aminosäuren; (.) und (:), konservierte Residuen.

Im Folgenden wurde eine $\Delta ccpE$ Deletionsmutante und dessen Komplementation im *S. aureus* Stamm Newman erstellt.

4.3.2 Herstellung einer markerlosen Deletionsmutante von *ccpE*

Für die Deletion von *ccpE* in *S. aureus* Stamm Newman wurde die von Leibig *et al.* (2008) beschriebene Methode verwendet. Anhand dieser Methode wurde über einen Allel-Austausch mittels eines Cre-lox basierenden Deletionssystems eine markerlose Deletionsmutante von *ccpE* hergestellt, welche als TH01 benannt wurde. Von dieser Mutante wurde mittels des Integrationsplasmids pTH2c, welches die Gene NWMN_0640 und *ccpE* enthält, eine *cis*-Komplementierung der *ccpE* Deletion in Stamm TH01 erstellt, welche mit dem Namen TH01c versehen wurde. Ein Überblick der verwendeten Klonierungsstrategie wird in Abb. 4.9 gegeben. Mittels Sequenzierung der betroffenen genomischen Region wurde im Anschluss die Deletion von *ccpE* im Stamm TH01 sowie die Richtigkeit der Komplementation von Stamm TH01c erfolgreich bestätigt.

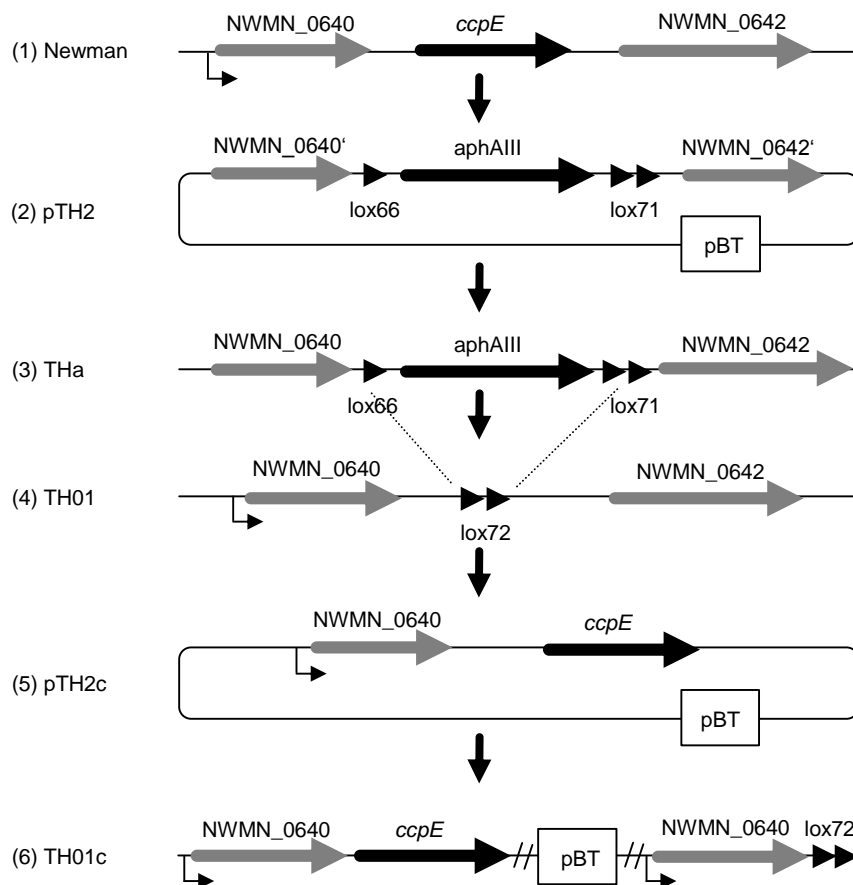


Abb. 4.9: Schematische Darstellung der Genregion von *ccpE* in *S. aureus* Stamm Newman sowie der Strategie zur Herstellung der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und seiner *cis*-komplementierten Version TH01c. (1) Genetische Anordnung der *ccpE*-Region in *S. aureus* Stamm Newman. Die offenen Leserahmen sind als horizontale Pfeile und die Promotoren als abgeknickte Pfeile gekennzeichnet. (2) Ein 3,1 Kilobasen großes Fragment bestehend aus der *lox66-aphAIII-lox71* Resistenzkassette und den flankierenden Regionen von *ccpE* wurde in den Vektor pBT kloniert, was in Plasmid pTH2 resultierte. (3) Das nicht in *S. aureus* replizierende Plasmid pTH2 wurde in den restriktionsnegativen *S. aureus* Stamm RN4220 elektroporiert und die Transformanten auf Kanamycin-haltigen (50 mg/l) Agarplatten selektiert. Auf diese Weise konnte das Kanamycin-resistente, aber Tetracyclin-empfindliche Derivat THa (RN4220 $\Delta ccpE::lox66-aphAIII-lox71$) erhalten werden, in dem der *ccpE* offene Leserahmen (OLR) durch *lox66-aphAIII-lox71* per „double-crossover“ ersetzt wurde. (4) Die mit der *lox66-aphAIII-lox71* Kassette markierte *ccpE* Deletion wurde mithilfe von Phage 85 in den Stamm Newman transduziert und die markerlose $\Delta ccpE$ -Mutante TH01 durch Behandlung eines positiven Kandidaten von Newman $\Delta ccpE::lox66-aphAIII-lox71$ mit einer Cre Rekombinase erhalten (beschrieben in Leibig *et al.*, 2008). Die gepunkteten Linien zwischen (3) und (4) markieren die durch die Cre Rekombinase entfernte Region. (5) Ein zwei Kilobasen großes Fragment, bestehend aus dem OLR von *ccpE* und einer Kilobase der oberhalb des *ccpE* OLR gelegenen DNA-Region mit dem OLR von *NWMN_0640* wurde in den Vektor pBT kloniert, was in Plasmid pTH2c resultierte. (6) Das nicht in *S. aureus* replizierende Plasmid pTH2c wurde in TH01 elektroporiert und Transformanten auf Tetracyclin-haltigen (8 mg/l) Agarplatten selektioniert, um so den Stamm TH01c zu erhalten, in dem das Plasmid pTH2c per „single-crossover“ innerhalb der homologen DNA-Region oberhalb der *ccpE*-Deletion inserierte.

4.3.3 Genetische Organisation von *ccpE* in *S. aureus*

Wie zuvor beschrieben, bildet *ccpE* mit dem oberhalb liegenden Gen NWMN_0640 vermutlich ein Operon, in dem beide Gene von einem Promoter vor NWMN_0640 kontrolliert werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Transkription von NWMN_0640 und *ccpE* mittels Northern Blot Analyse in den Stämmen Newman, TH01 und TH01c untersucht, wobei nach einem Wachstum von 3, 6, 9 und 12 Stunden in LB-L Medium die Probenahmen erfolgten. Diese Analysen wurden von Bettina Schulthess am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich durchgeführt.

Aus der Northern Blot Analyse lässt sich erkennen, dass die Hybridisierung mit einer *ccpE*-spezifische Sonde zu allen untersuchten Zeitpunkten in Transkripten der Größen 4,1, 2,9, 2,3 und 1,5 Kilobasen resultierte (Abb. 4.10A). Die Transkripte mit den Größen 2,9 und 1,5 Kilobasen zeigten dabei ein identisches Laufverhalten zu den 16S und 23S rRNAs und stellen damit wahrscheinlich Degradationsprodukte größerer Transkripte dar. Darüber hinaus konnten in der Mutante TH01 keine *ccpE*-spezifischen Transkripte mehr detektiert werden, welche in der Komplementante TH01c wieder vergleichbar zum Wildtyp zu beobachten waren. Eine Hybridisierung mit einer NWMN_0640-spezifischen Sonde resultierte im Wildtyp in einem annähernd identischen Transkriptmuster im Vergleich zur *ccpE*-spezifischen Sonde, was die Annahme unterstützt, dass beide Gene zusammen transkribiert werden. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und einer Analyse der genetischen Organisation der *ccpE* Region in *S. aureus* Stamm Newman (Abb. 4.10B) lässt sich schließen, dass die identifizierten Transkripte von einem einzelnen Promoter vor NWMN_0640 kontrolliert werden. Dabei wird ein 2,3 Kilobasen großes, die offenen Leseraster von NWMN_0640 und *ccpE* enthaltendes Transkript sowie ein 4,1 Kilobasen umfassendes, die offenen Leseraster von NWMN_0640, *ccpE*, NWMN_0642 und NWMN_0643 enthaltendes Transkript gebildet. Darüber hinaus bestätigte auch die Hybridisierung mit der NWMN_0640-spezifischen Sonde die Deletion von *ccpE* in Stamm TH01. So konnten in diesem Stamm Transkripte der Größen 3,3 und 1,5 Kilobasen identifiziert werden, welche das Resultat der Deletion von etwa 800 Basenpaaren des *ccpE* Gens sind (Abb. 4.10A). Auch hier resultierte die Komplementation in der Wiederherstellung des im Wildtyp vorzufindenden Transkriptionsmusters. Zusätzlich zeigte die Komplementante noch entsprechend

größere Transkripte, welche vermutlich aus der verwendeten Klonierungsstrategie resultieren, bei der es aufgrund der Integration des Plasmids pTH2c zu einer Verdopplung des NWMN_0640 Gens kam. Ferner ließ sich eine Wachstumsphasen-abhängige Veränderung der Transkriptmengen von NWMN_0640 und *ccpE* beobachten, wobei die höchste Transkription im Wildtyp zum Zeitpunkt 9 Stunden zu beobachten war.

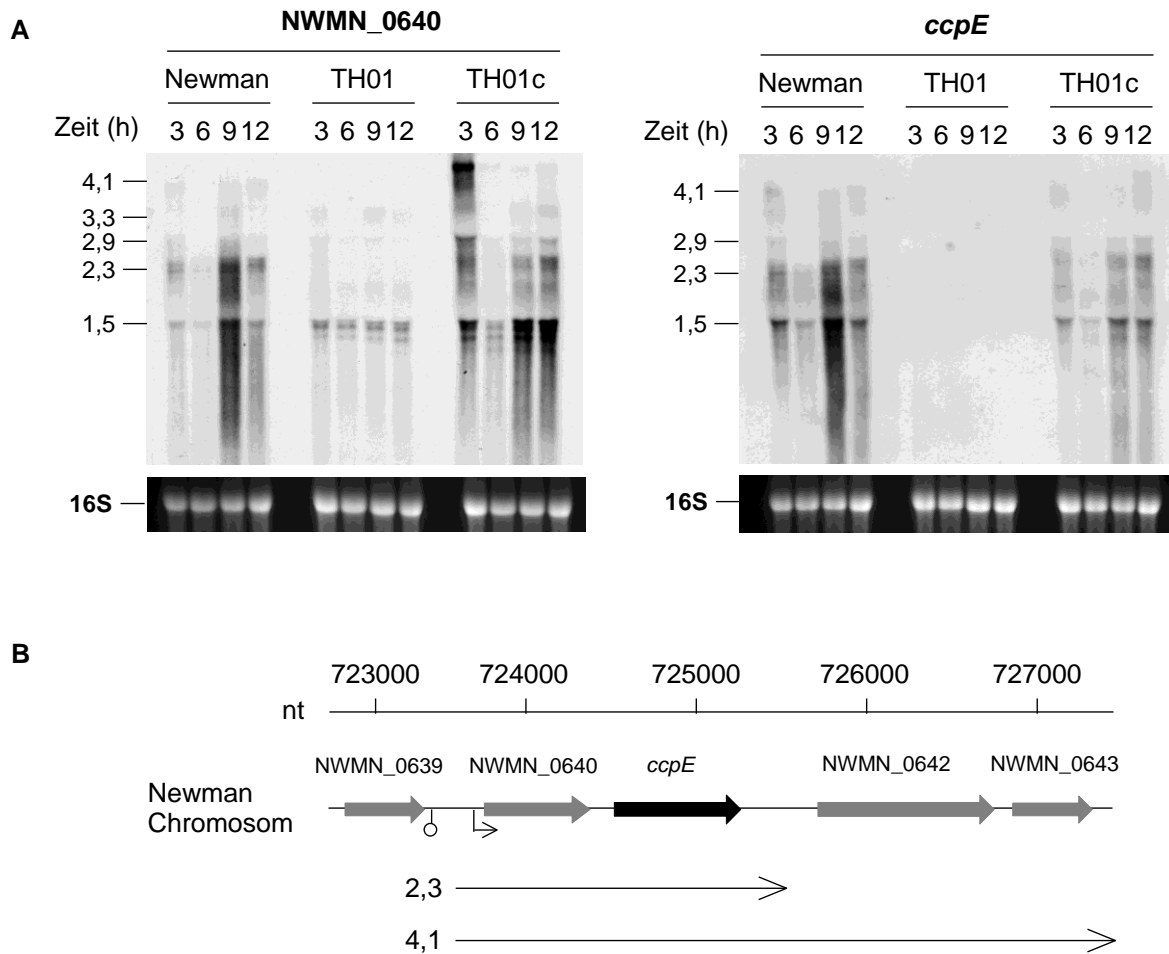
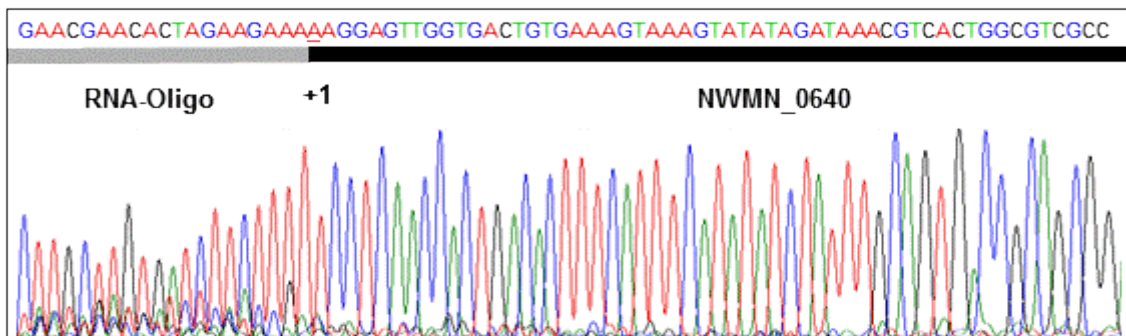


Abb. 4.10: (A) Northern Blot Analyse der Transkription von NWMN_0640 und *ccpE* in *S. aureus* Stamm Newman, der Δ *ccpE* Mutante TH01 und dessen Komplementante TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C. Die Transkript-Größen sind an den linken Rändern der Blots angegeben. Die mit Ethidiumbromid gefärbte 16S rRNA ist zur Überprüfung einer gleichmäßigen Beladung der RNA unter den Blots angegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Wiederholungen. Die Northern Blot Analyse wurde von Bettina Schulthess am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich durchgeführt. (B) Schematische Darstellung der genomischen Region von *ccpE* in *S. aureus*. OLRs, Promotoren, Terminatoren und mittels Northern Blot identifizierte Transkripte sind gekennzeichnet. Notationen der OLRs und Nukleotidnummern (nt) entsprechen denen der genomischen Regionen im Stamm Newman (Genbank-Zugangsnummer AP009351.1).

4.3.3.1 Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes von NWMN_0640

Zur genauen Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes von NWMN_0640 wurde die 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) Methode nach Kovács *et al.* (2006) angewendet. Das daraus resultierende PCR-Fragment wurde anschließend sequenziert. Ein Sequenzausschnitt des sequenzierten PCR-Produktes um die Fusionsstelle des NWMN_0640 Transkripts mit dem RNA-Oligo ist in Abb. 4.11A dargestellt. Dabei ist die erste auf die Sequenz des RNA-Oligos folgende Base der ermittelte Transkriptionsstartpunkt von NWMN_0640. Wie in Abb. 4.11B zu sehen ist, befindet sich der ermittelte Transkriptionsstartpunkt 14 Basenpaare stromaufwärts des angenommenen Startpunktes vom offenen Leserahmen (OLR) von NWMN_0640 sowie direkt stromaufwärts einer putativen ribosomalen Bindungsstelle. Vor dem Transkriptionsstartpunkt konnte darüber hinaus mit der Nukleotidsequenz ATGACA-17-TATAAT eine Pribnow-Box und -35 Region identifiziert werden, die gut mit den für σ^A in *S. aureus* beschriebenen Konsensus-Sequenzen übereinstimmt (Deora & Misra, 1996; Rao *et al.*, 1995).

A



B

```

723300-TATCGCATCTTAAATCAGTAATCGAAAAATATGCTTTAAAAATAAAAGTGATCAATGAAGTGGTTTGAAGGTTGTTA
(NWMN_0639) K S V I E K Y A L K *
-----
ATAAACCTTTGAGTCACTTCATTTTATATGTATTCTTGATTGAATCAGAATAGATTTGATGCTTCAGCTGTTTTAATGAAA
TAGCAITTAATGATTTTGAAAAAGATAAGAGTGTGTTATTATATTTTGAAAAATCACITTTATGAAGAAATGTGTGTACTAT
CTAATTAATATTGTCTATTTTAAGTAAATTGAAGCGAGTTGTAGTAAAAATAATAAATAATTTTCATATGATTAACAAAAACT
-35 -10
ATAAACTGTATCATGAC ATGACA TCATTATGTAGTTTA TATAAT AATGACAAGGAGTTGGTGA CTGTGAAAGTAAAG
(NWMN_0640) M K V K
-----
TATATAGATAAACGTC ACTGGCGTCGCTTAATTGATAGGGAATACACAGAGGTAAAAGTTAATAATAATAGGTTTAA-723795
Y I D K R H W R R L I D R E Y T E V K V N N N R F

```

Abb. 4.11: (A) Sequenzausschnitt der 5'-RACE Produkte zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von NWMN_0640. Die Sequenz des RNA-Oligos ist mit einem grauen und die des NWMN_0640 Transkripts mit einem schwarzen Balken markiert. Der Transkriptionsstartpunkt von NWMN_0640 ist mit +1 markiert. (B) Nukleotidsequenz der Region vor dem offenen Leserahmen von NWMN_0640. Der mittels 5' RACE identifizierte Transkriptionsstartpunkt ist mit einem abgeknickten Pfeil gekennzeichnet. Die putativen -35 und -10 Bindestellen sind durch Boxen und die Terminator Sequenzen durch gestrichelte Linien hervorgehoben.

4.3.4 Einfluss der Deletion von *ccpE* auf die Transkription von NWMN_0640 und *ccpE*

Die Ergebnisse der Northern Blot Analyse ergaben vorrangig einen qualitativen Nachweis der Transkription von NWMN_0640 und *ccpE*. Daher wurde als nächster Schritt der Effekt der Deletion von *ccpE* auf die Transkription der beiden Gene NWMN_0640 und *ccpE* mittels qPCR zusätzlich noch quantitativ untersucht. Dazu wurden die Stämme Newman, TH01 und TH01c in LB-L Medium bei 37°C und 230 rpm im Inkubationsschüttler angezogen und nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum Proben für die RNA-Extraktion entnommen.

Wie zu erwarten, war für die $\Delta ccpE$ Mutante TH01 zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Transkription von *ccpE* zu beobachten, was die erfolgreiche Deletion des Gens bestätigte (Abb. 4.12A). Darüber hinaus scheint *ccpE* innerhalb des untersuchten Zeitraums im Wildtyp Newman, entgegen der Beobachtungen in der Northern Blot Analyse, relativ konstant transkribiert zu werden. Nur während der späteren Wachstumsphase war eine minimale Abnahme der Menge an *ccpE* zu erkennen. Die Komplementante TH01c konnte den für den Wildtyp beobachteten Phänotyp wiederherstellen und zeigte vergleichbare Mengen an *ccpE* wie der Ausgangsstamm Newman. Dagegen zeigte sich für das oberhalb liegende Gen NWMN_0640 nach 3 und 6 Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen Newman und TH01 (Abb. 4.12B). Auch NWMN_0640 scheint über den untersuchten Zeitraum im Stamm Newman, entgegen der Beobachtung in der Northern Blot Analyse, relativ konstant transkribiert zu werden. Auch hier wurde in diesem Ansatz erst nach 12 Stunden eine minimale Abnahme der Transkription beobachtet. Die *cis*-Komplementation von TH01 mit *ccpE* resultierte durch die Verdopplung von NWMN_0640 aufgrund der verwendeten Klonierungsstrategie zu allen untersuchten Zeitpunkten erwartungsgemäß in einer etwa 2-fach erhöhten Menge an NWMN_0640 Transkript in Stamm TH01c im Vergleich zu Newman und TH01. Interessanterweise ließ sich darüber hinaus für die $\Delta ccpE$ Mutante TH01 nach 9 und 12 Stunden Wachstum eine signifikant reduzierte (etwa 2-fach) Transkription von NWMN_0640 gegenüber dem Ausgangsstamm Newman beobachten.

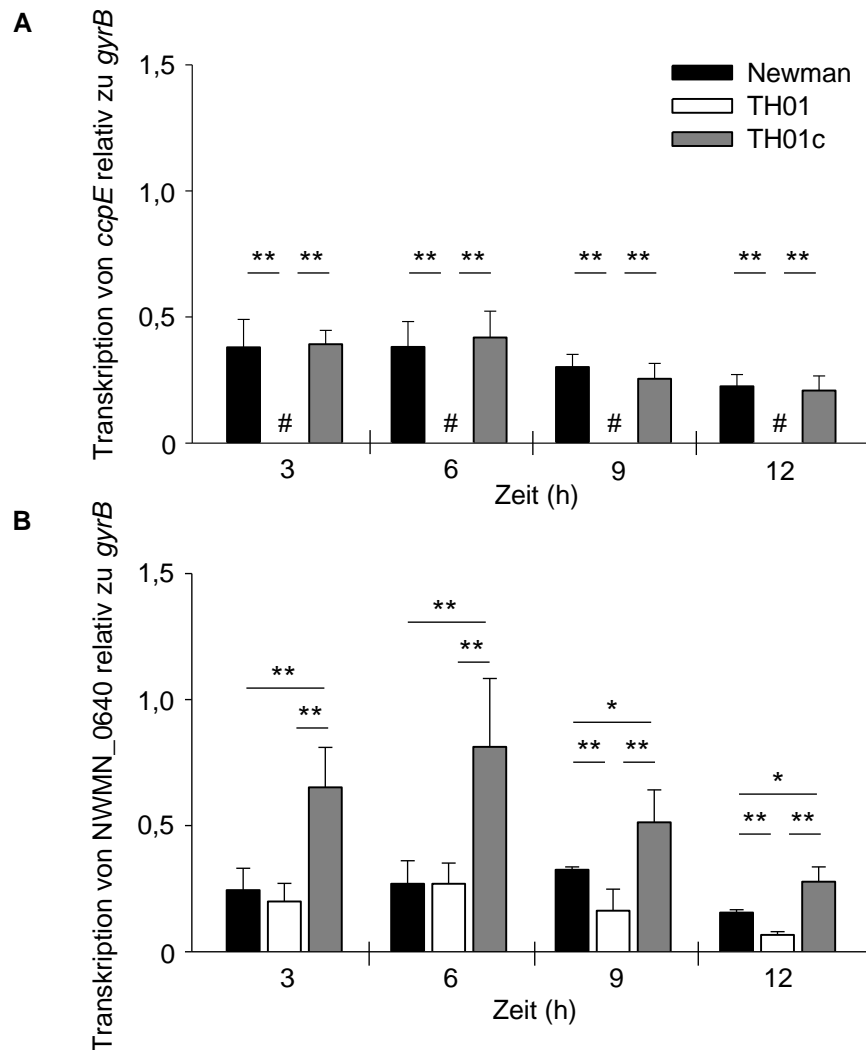


Abb. 4.12: Quantitative Transkriptionsanalyse von *ccpE* (A) und NWMN_0640 (B) in *S. aureus* Stamm Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementante TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$. #, Transkriptmenge unter dem Detektionslimit.

4.3.5 Expression von CcpE während des Wachstums

Die Expression von CcpE während der verschiedenen Wachstumsphasen wurde in den zytosolischen Proteinextrakten von Newman, TH01 und TH01c aus 3, 6, 9 und 12 Stunden alten Kulturen, welche in LB-L Medium angezogen wurden, mittels Western Blot Analyse mit einem gegen CcpE gerichteten polyklonalen Antikörper untersucht.

Wie in Abb. 4.13 zu sehen ist, konnte bei Newman und TH01c zu allen Zeitpunkten ein *ccpE*-spezifisches Signal der erwarteten Masse von etwa 33 kDa identifiziert werden. In der Δ *ccpE* Mutante war dieses Signal erwartungsgemäß zu keinem der untersuchten Zeitpunkte mehr nachweisbar. Ferner war eine vergleichbare Zunahme der Proteinmenge an CcpE im Wildtyp und der Komplementante mit fortlaufendem Wachstum zu den späteren Zeitpunkten nach 9 und 12 Stunden zu beobachten.

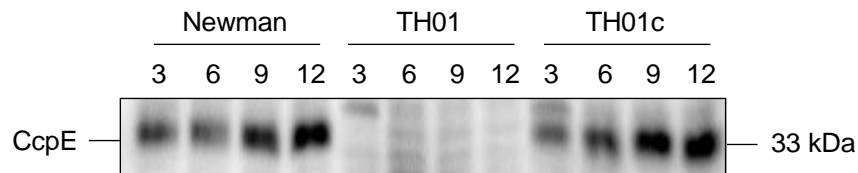


Abb. 4.13: Western Blot Analyse zytosolischer Proteinextrakte von *S. aureus* Stamm Newman, der Δ *ccpE* Mutante TH01 und dessen Komplementante TH01c nach 3, 6, 9, und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C. Verwendet wurde der gegen CcpE gerichtete polyklonale Antikörper SYR237. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Wiederholungen.

4.3.6 Einfluss von CcpE auf die Wachstumseigenschaften von *S. aureus*

Im nächsten Schritt sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Deletion von *ccpE* auch eine physiologische Auswirkung auf *S. aureus* hat. Dazu wurden die Wachstumsraten und extrazellulären pH-Werte in den LB-L Überständen der Newman, TH01 und TH01c Kulturen über eine Wachstumsdauer von 12 Stunden bei 37°C ermittelt.

Wie in Abb. 4.14 zu erkennen, zeigten alle drei untersuchten Stämme während der exponentiellen Phase eine vergleichbare Wachstumsrate. Analog dazu zeigten sich auch in den pH-Werten der Kulturüberstände in dieser Wachstumsphase keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Derivaten. Ab dem Beginn der post-exponentiellen Phase (5 Stunden) zeigte die Δ *ccpE* Mutante TH01 jedoch ein signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, welches auch nach 12 Stunden deutlich unterhalb der Wildtyp-Kultur lag. Die Komplementante zeigte dagegen zu allen untersuchten Zeitpunkten ein dem Wildtyp entsprechendes Wachstum. Entsprechend zum reduzierten Wachstum war in der Kultur von TH01 ab dem Zeitpunkt 5 Stunden fortlaufend ein signifikant geringerer pH-Wert des Wachstumsmediums von bis zu 0,5 im Vergleich zu Stamm Newman zu beobachten,

während die Komplementante TH01c wieder zum Wildtyp vergleichbare pH-Werte aufwies. Dabei zeigte sich insgesamt für alle drei untersuchten Stämme ab dem Zeitpunkt 5 Stunden ein kontinuierlicher Anstieg des pH-Werts im Wachstumsmedium, welcher in der Mutante TH01 jedoch geringer ausfiel.

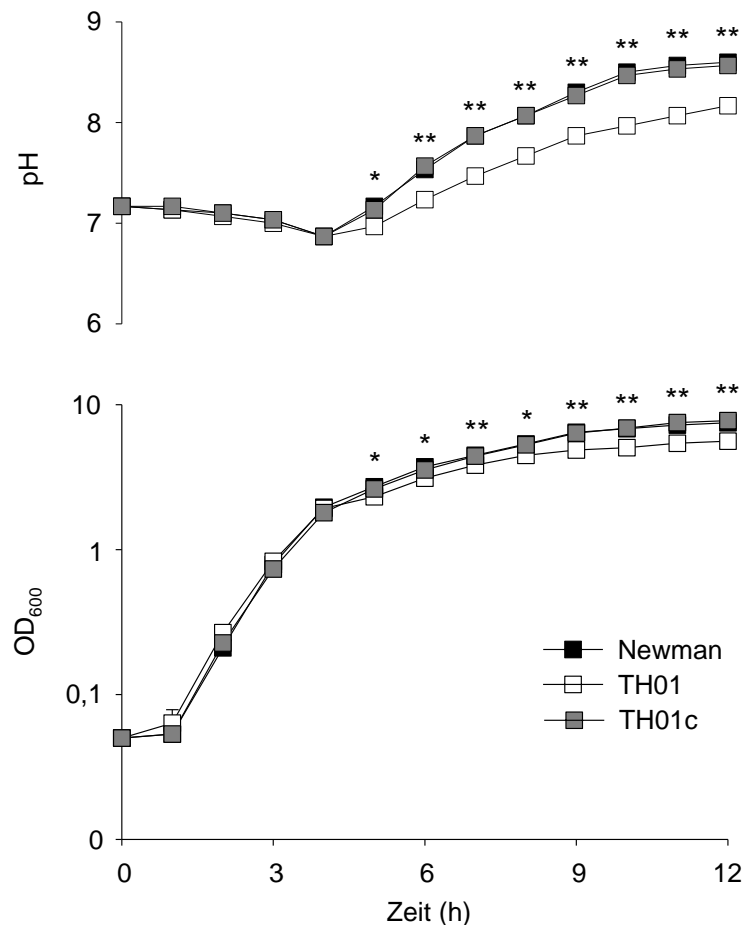


Abb. 4.14: Wachstumseigenschaften der *S. aureus* Stämme Newman, TH01 und TH01c. Dargestellt sind die extrazellulären pH-Werte in den Wachstumsmedien und die Werte der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) über eine Wachstumsperiode von 12 Stunden in LB-L Medium bei 37°C. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Student's-*t*-Tests für den Vergleich von Newman mit TH01 und TH01c mit TH01 ermittelt. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

4.3.7 Einfluss von CcpE auf die Transkription der TCA-Zyklus Gene *citZ* und *citB*

CcpE wurde als putatives Homolog von CcpC aus *B. subtilis* identifiziert, welches in dieser Spezies in die Regulation der TCA-Zyklus Gene *citZ* und *citB* involviert ist (Kim *et al.*, 2003; Jourlin-Castelli *et al.*, 2000). Daher stellte sich die Frage, ob CcpE in *S. aureus* ebenfalls in die Regulation der Expression der TCA-Zyklus Gene *citZ* und *citB* involviert ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine quantitative Transkriptionsanalyse mittels qPCR der Stämme Newman, TH01 und TH01c nach 3, 6, 9, und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C durchgeführt.

Wie in Abb. 4.15 zu erkennen, wurde *citZ* im Wildtyp in relativ konstanten Mengen über den gesamten Wachstumsverlauf transkribiert. Es konnte darüber hinaus während der exponentiellen Phase (3 Stunden) eine signifikant reduzierte (5-fach) Transkription von *citZ* in der Mutante TH01 im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Dagegen zeigte sich zu den späteren Zeitpunkten (6, 9 und 12 Stunden) während der post-exponentiellen und frühen stationären Wachstumsphase kein signifikanter Einfluss auf die *citZ* Transkription mehr. Die Komplementante TH01c produzierte zu allen untersuchten Zeitpunkten zum Wildtyp vergleichbare Mengen an *citZ*.

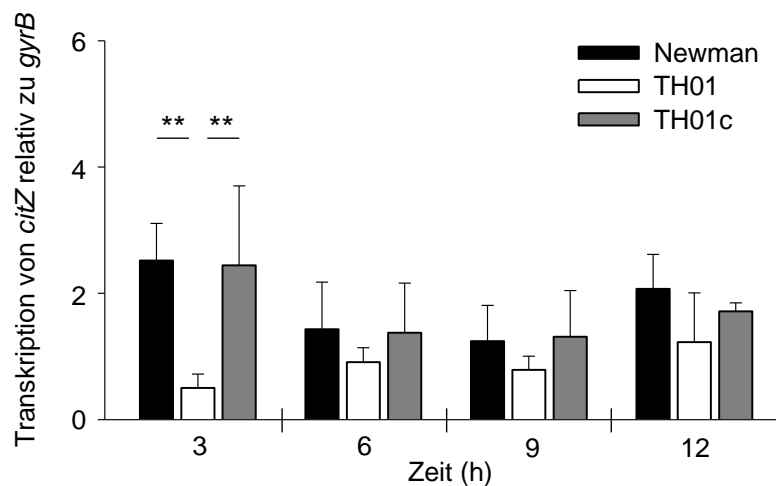


Abb. 4.15: Quantitative Transkriptionsanalyse von *citZ* in *S. aureus* Stamm Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementante TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

In Gegensatz zu *citZ* konnte für *citB* eine Wachstumsphasen-abhängige Transkription beobachtet werden. Die höchste Transkription konnte in diesem Medium während der exponentiellen Wachstumsphase (3 Stunden) beobachtet werden und nahm dann im Verlauf des weiteren Wachstums stetig ab (Abb. 4.16). Interessanterweise konnte hier zu allen untersuchten Zeitpunkten, unabhängig von der Wachstumsphase, eine deutliche, signifikante, bis zu 50-fache Reduktion der Transkription von *citB* in der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 im Vergleich zum Wildtyp sowie der Komplementante TH01c beobachtet werden. Die Menge an *citB* war in der Mutante nur noch in sehr geringen Mengen nachweisbar.

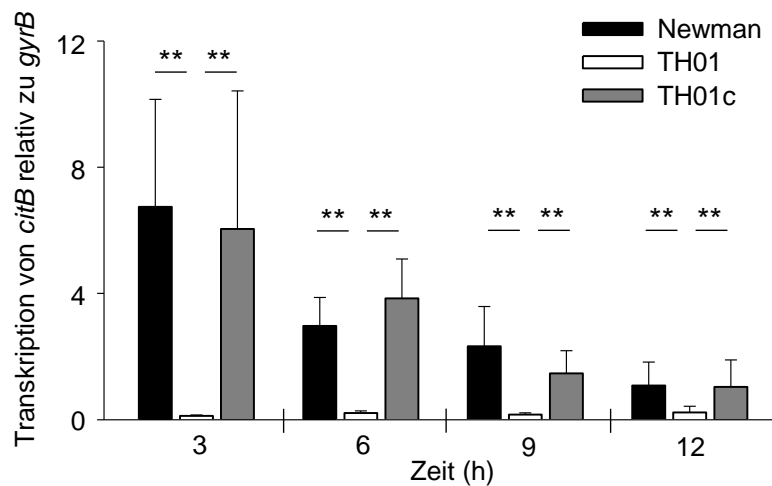


Abb. 4.16: Quantitative Transkriptionsanalyse von *citB* in *S. aureus* Stamm Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementation TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass CcpE einen drastischen Einfluss auf die Transkription von *citB* hat, während dieser putative Regulator dagegen scheinbar nur einen geringen Effekt auf die Transkription von *citZ* aufweist.

4.3.8 Einfluss von CcpE auf die Aktivität der TCA-Zyklus Enzyme Citrat Synthase und Aconitase

Die reduzierte Transkription von *citB* und zum Teil auch von *citZ* in der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 lässt vermuten, dass dies auch einen Einfluss auf die Aktivität der entsprechenden Genprodukte Aconitase bzw. Citrat Synthase hat. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden die Aktivitäten dieser beiden Enzyme in den Stämmen Newman, TH01 und TH01c nach 3, 6, 9, und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C bestimmt.

Analog zu den transkriptionellen Daten von *citZ* zeigte sich nur während des exponentiellen Wachstums eine signifikant reduzierte Aktivität (etwa 2-fach) für die Citrat Synthase in der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 im Vergleich zum Wildtyp, während zu den späteren Zeitpunkten kein signifikanter Einfluss auf die Aktivität mehr zu

beobachten war (Abb. 4.17). Darüber hinaus zeigte sich die Aktivität der Citrat Synthase relativ konstant über den gesamten Wachstumsverlauf. Die Komplementation von *ccpE* in Stamm TH01c führte zu allen untersuchten Zeitpunkten zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps.

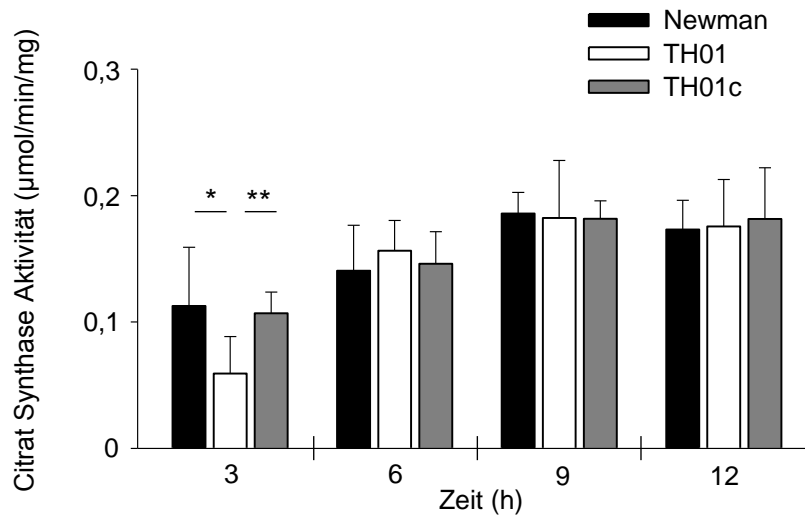


Abb. 4.17: Aktivität des TCA-Zyklus Enzyms Citrat Synthase in *S. aureus* Stamm Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementante TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Für die Aconitase hingegen zeigte sich, unabhängig von der Wachstumsphase, eine signifikante und mit einer bis zu 10-fachen Reduktion sehr deutliche Verminderung von dessen Aktivität in der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 im Vergleich zum Wildtyp Newman (Abb. 4.18), wobei der Wildtyp unter diesen Wachstumsbedingungen ein Aktivitätsmaximum in der post-exponentiellen Phase (6 Stunden) aufwies. Die Komplementante TH01c wies zu allen vier untersuchten Zeitpunkten eine zum Wildtyp vergleichbare Aktivität auf. Die drastische Reduktion der Aktivität der Aconitase zu allen untersuchten Zeitpunkten, sowie die geringe Restaktivität des Enzyms in der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 erwies sich dabei konsistent zu den zuvor ermittelten transkriptionellen Daten von *citB*.

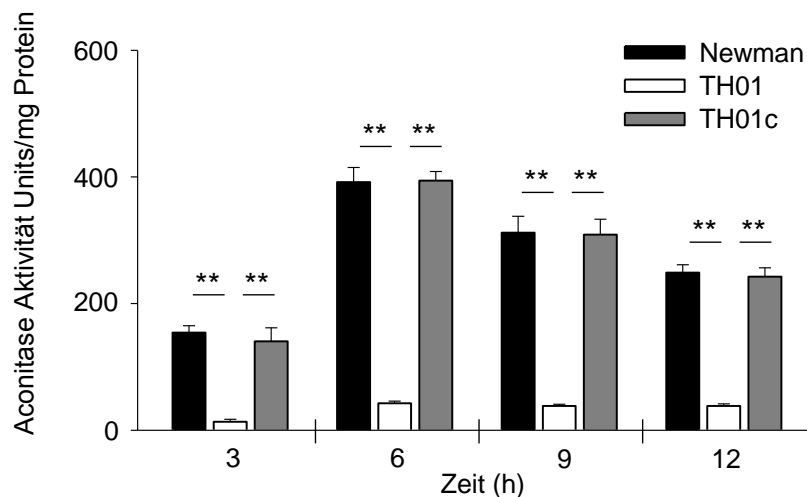


Abb. 4.18: Aktivität des TCA-Zyklus Enzyms Aconitase in *S. aureus* Stamm Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementation TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Deletion von *ccpE* nur in der exponentiellen Phase zu einer reduzierten Transkription von *citZ* und Aktivität der Citrat Synthase führte, im weiteren Wachstumsverlauf hingegen kein signifikanter Effekt mehr zu beobachten war. Für die Transkription von *citB* sowie die Aktivität der Aconitase zeigte sich ein anderes Bild. Hier führte die Deletion von *ccpE* zu einer drastisch reduzierten Transkription von *citB* und Aktivität der Aconitase über den gesamten Wachstumsverlauf.

4.3.9 Effekt von CcpE auf die Wachstumseigenschaften und die Aktivität des TCA-Zyklus von *S. aureus* in Anwesenheit von Glukose

In früheren Arbeiten konnte mit CcpA ein Repressor der Transkription der Gene *citZ* und *citB* des TCA-Zyklus in Anwesenheit von Glukose identifiziert werden (Seidl *et al.*, 2009; Seidl *et al.*, 2008a). Um eine mögliche Interferenz mit CcpA zu vermeiden, wurden die zuvor beschriebenen Versuche in LB-L Medium ohne Glukose durchgeführt. Im Folgenden sollten nun die Auswirkungen der Deletion von *ccpE* auf die Wachstumseigenschaften von *S. aureus* unter Bedingungen, in denen Glukose verfügbar ist, untersucht werden. Dazu wurden die *S. aureus* Stämme Newman,

TH01 und TH01c über 12 Stunden in LB-L mit 0,1% Glukose angezogen und die Wachstumsraten sowie die extrazellulären pH-Werte stündlich bestimmt.

Die Zugabe von Glukose resultierte in einem insgesamt verstärkten Wachstum, wobei sich während der exponentiellen Phase keine Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen zeigten (Abb. 4.19). Zum Beginn des post-exponentiellen Wachstums zeigte die Mutante unter diesen Bedingungen ab dem Zeitpunkt 6 Stunden ein signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp Newman, welches sich in einer geringeren OD_{600} von bis zu 3,5 äußerte. Die Komplementante dagegen zeigte über den gesamten Zeitraum von 12 Stunden ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum. Entsprechend zum verminderten Wachstum war für die Mutante TH01 ab dem Zeitpunkt 6 Stunden auch ein signifikant reduzierter pH-Wert des Wachstumsmediums von bis zu 1,5 im Vergleich zu den Stämmen Newman und TH01c zu beobachten. Darüber hinaus zeigte sich insgesamt für alle drei untersuchten Stämme nach 6 Stunden Wachstum ein kontinuierlicher Anstieg des pH-Werts im Medium, welcher in der Mutante TH01 jedoch deutlich geringer ausfiel.

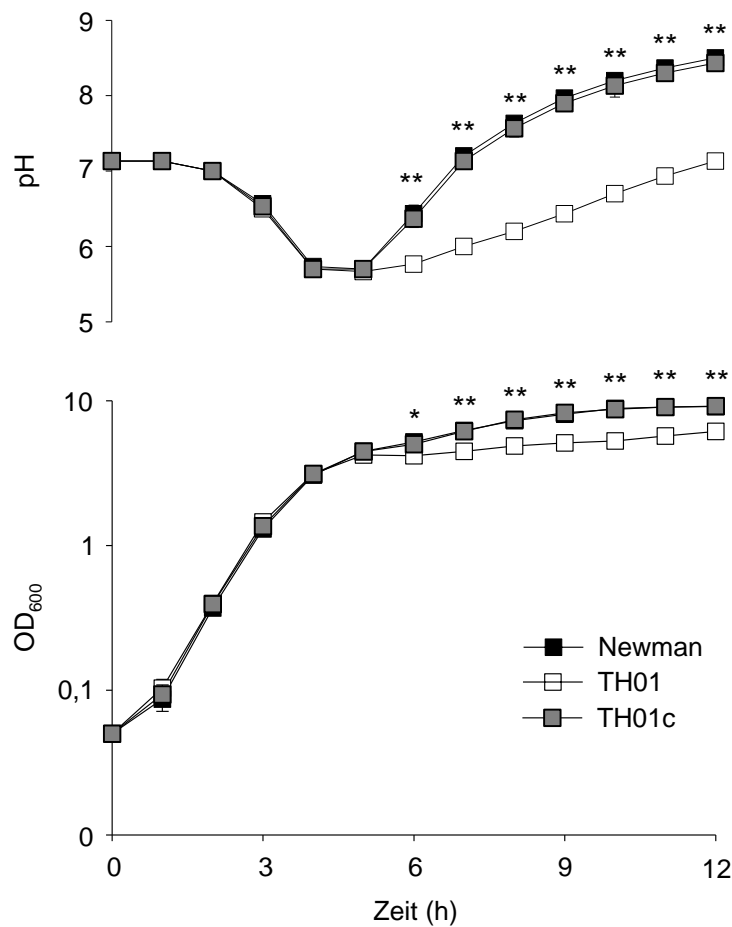


Abb. 4.19: Wachstumseigenschaften der *S. aureus* Stämme Newman, TH01 und TH01c. Dargestellt sind die extrazellulären pH-Werte in den Wachstumsmedien und die Werte der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) über eine Wachstumsperiode von 12 Stunden in LB-L Medium + 0,1% Glukose bei 37°C. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Student's-*t*-Tests für den Vergleich von Newman mit TH01 und TH01c mit TH01 ermittelt. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Bei einem Wachstum von *S. aureus* in Anwesenheit von Glukose sollte bei ausreichender Sauerstoffversorgung dessen Verstoffwechslung typischerweise in einer Anreicherung der organischen Säure Acetat im Wachstumsmedium resultieren, die wahrscheinlich für den beobachteten Abfall des pH Wertes in den Kulturüberständen ursächlich ist. In den späteren Wachstumsphasen hingegen sollte aufgrund der Wiederaufnahme und Verstoffwechslung des Acetats und einer verstärkten Verstoffwechslung von Aminosäuren ein Anstieg der Ammoniak-Konzentration zu beobachten sein (Somerville *et al.*, 2002). Daher wurden auch die

Konzentrationen von Glukose, Acetat und Ammoniak in den Kulturüberständen stündlich über eine Wachstumsperiode von 12 Stunden bestimmt.

Wie in Abb. 4.20 zu sehen, wurde die gesamte Glukose bereits in den ersten 5 Stunden Kultur von allen hier getesteten Derivaten aus dem Medium aufgenommen. Dabei hatte die Deletion von *ccpE* keine Auswirkung auf den Glukose-Konsum der Bakterienzellen.

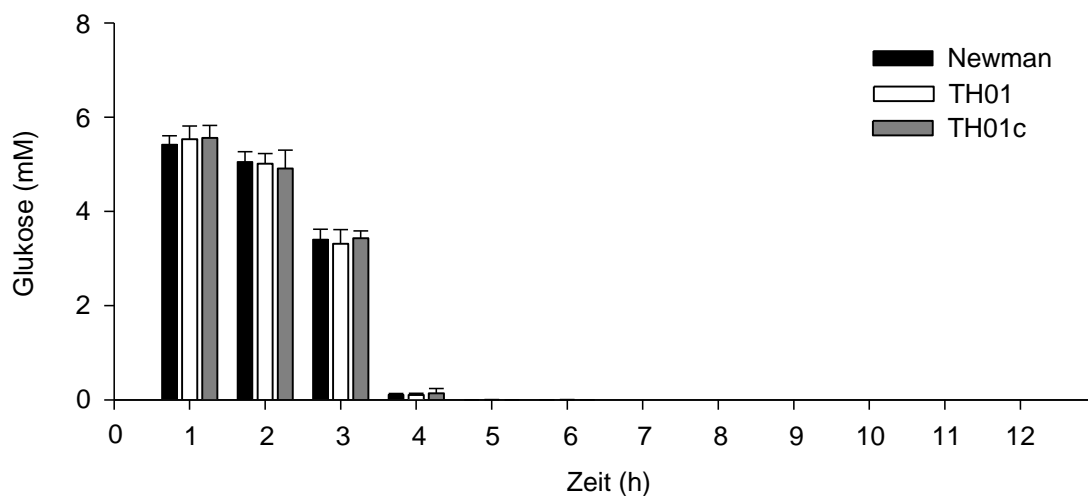


Abb. 4.20: Konzentration von Glukose in den Kulturüberständen des *S. aureus* Stammes Newman, der Δ *ccpE* Mutante TH01 und dessen Komplementante TH01c über eine Wachstumsperiode von 12 Stunden in LB-L Medium + 0,1% Glukose bei 37°C. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

Gegenläufig zur Glukoseabnahme zeigte sich in den Kulturüberständen während der exponentiellen Phase bis hin zur frühen post-exponentiellen Phase ein kontinuierlicher Anstieg an Acetat, welches zum Zeitpunkt 5 Stunden sein Maximum erreichte, an dem die gesamte Glukose im Medium aufgebraucht war (Abb. 4.21). Bis zu diesem Zeitpunkt konnte kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen an Acetat zwischen den Stämmen Newman, TH01 und TH01c beobachtet werden. Im weiteren Wachstumsverlauf, ab dem Beginn der post-exponentiellen Wachstumsphase nach 6 Stunden, nahm die Konzentration von Acetat in den Kulturüberständen des Wildtyps und der Komplementante in vergleichbarer Menge wieder ab und nach 12 Stunden war für diese Stämme fast kein Acetat mehr

nachweisbar. Für die $\Delta ccpE$ Mutante TH01 hingegen zeigte sich ein anderes Bild. Hier konnte im Gegensatz zu Newman und TH01c kaum eine Abnahme der Acetat-Konzentration beobachtet werden. Nach 12 Stunden war in den Kulturüberständen der Mutante ein etwa um den Faktor 50 höherer Acetatgehalt detektierbar als in den Wildtyp- und TH01c-Kulturüberständen.

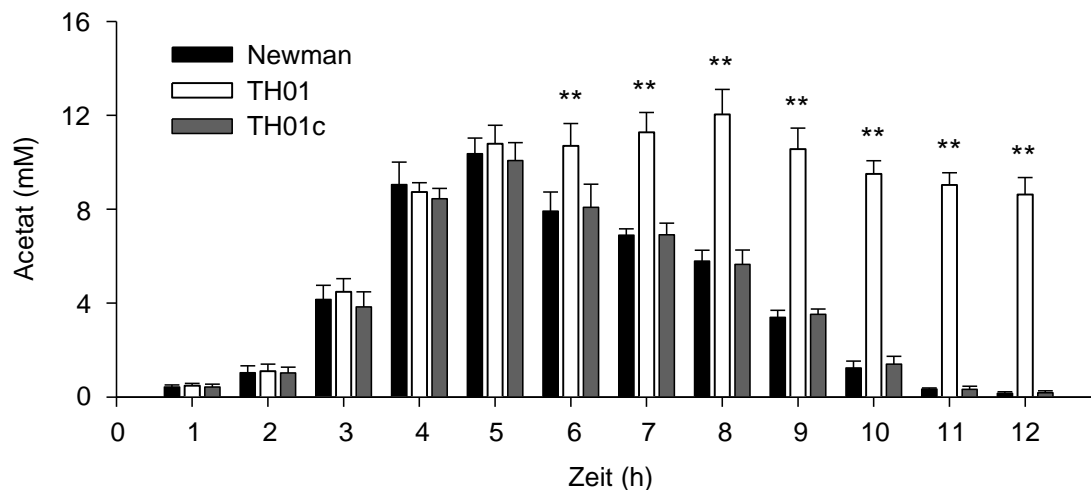


Abb. 4.21: Konzentration von Acetat in den Kulturüberständen des *S. aureus* Stammes Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementante TH01c über eine Wachstumsperiode von 12 Stunden in LB-L Medium + 0,1% Glukose bei 37°C. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

In Hinblick auf die Ammoniakbildung zeigte sich, wie in Abb. 4.22 zu sehen, während des exponentiellen Wachstums für alle drei Stämme nur ein geringfügiger Anstieg der Konzentration an Ammoniak, der, ebenso wie für Acetat beobachtet, gegenläufig zur Glukoseabnahme verlief. Nachdem die Glukose aufgebraucht war, konnte mit dem Beginn der post-exponentiellen Wachstumsphase aber eine kontinuierlich ansteigende Ammoniak-Konzentration in den Kulturüberständen von Wildtyp und Komplementante beobachtet werden. Zwar zeigte die $\Delta ccpE$ Mutante TH01 auch einen zunehmenden Anstieg der Konzentration an Ammoniak ab der post-exponentiellen Phase, dieser war aber im Vergleich zu Newman und TH01c signifikant geringer (bis zu 2-fach) ausgeprägt. Die Komplementante zeigte zu allen Zeitpunkten eine zum Wildtyp vergleichbare Konzentration an Ammoniak in den Kulturüberständen.

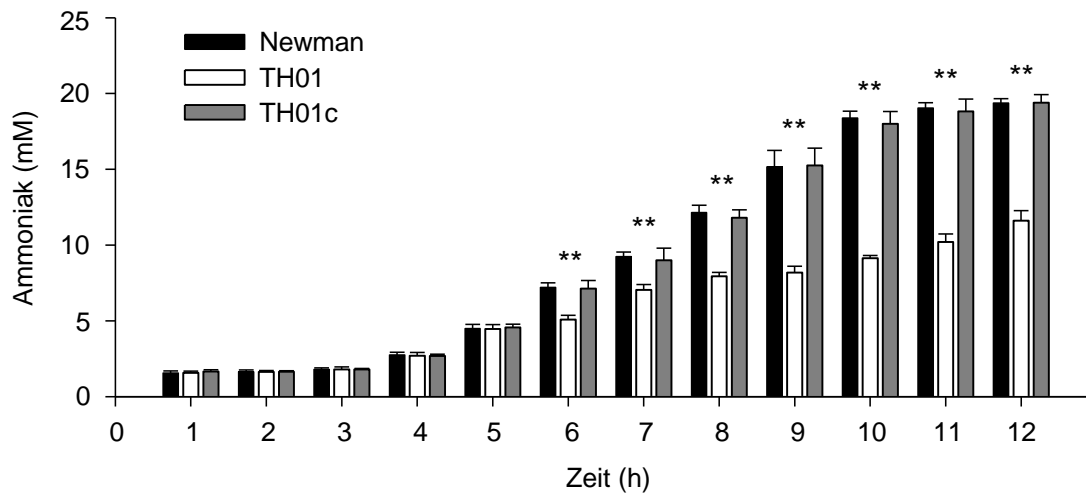


Abb. 4.22: Konzentration von Ammoniak in den Kulturüberständen des *S. aureus* Stammes Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementante TH01c über eine Wachstumsperiode von 12 Stunden in LB-L Medium + 0,1% Glukose bei 37°C. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

Im nächsten Schritt wurde für die Stämme Newman, TH01 und TH01c die Transkription von *citB* sowie die Aktivität der Aconitase während der exponentiellen Phase (3 Stunden), dem Übergang zur post-exponentiellen Phase (5 Stunden) und der späteren post-exponentiellen Phase (8 Stunden) nach einem Wachstum in LB-L Medium + 0,1% Glukose bestimmt.

Bei der quantitativen Transkriptionsanalyse zeigte sich auch unter diesen Bedingungen zu allen Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der Transkription von *citB* in der Mutante TH01 im Vergleich zum Wildtyp und der Komplementante (Abb. 4.23). Dabei war die Menge an *citB* Transkript während der exponentiellen Phase (3 Stunden) erwartungsgemäß sehr gering, da zu diesem Zeitpunkt eine Glukose-abhängige Repression über CcpA zu erwarten war. Beim Übergang in die post-exponentielle Wachstumsphase (5 Stunden) konnte ein drastischer Anstieg der Transkription von *citB* im Wildtyp und der Komplementante beobachtet werden, während die $\Delta ccpE$ Mutante TH01 zu diesem Zeitpunkt eine signifikant geringere (15-fach) Menge an *citB* mRNA im Vergleich zu Newman und TH01c aufwies. Dieser

Effekt zeigte sich auch nach 8 Stunden, wobei die Transkription von *citB* zu diesem Zeitpunkt aber insgesamt wieder etwas zurückging.

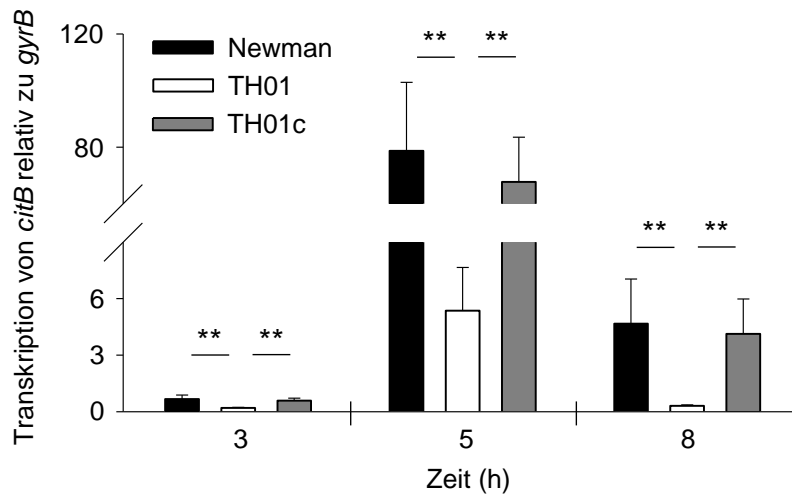


Abb. 4.23: Quantitative Transkriptionsanalyse von *citB* in *S. aureus* Stamm Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementation TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium + 0,1% Glukose bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

Die transkriptionellen Unterschiede in der *citB* Transkription spiegelten sich auch in der Aktivität der Aconitase wieder. Wie in Abb. 4.24 zu erkennen, zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der Aconitase-Aktivität in der Mutante TH01 im Vergleich zum Wildtyp und der Komplementante. Die Komplementante TH01c zeigte hingegen zu allen Zeitpunkten eine zum Wildtyp vergleichbare Aktivität des Enzyms. Entsprechend der transkriptionellen Daten war auch die Aktivität der Aconitase nach 3 Stunden während der exponentiellen Phase sehr gering. Zum Übergang in die post-exponentielle Phase, nach 5 Stunden, und im weiteren Verlauf konnte eine deutlich erhöhte Aktivität des Enzyms im Wildtyp und der Komplementante nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich hier, anders als bei der *citB* Transkription, zwischen der post-exponentiellen Phase und der frühen stationären Phase keine markante Abnahme der Aconitase-Aktivität in den Wildtyp- und TH01c Kulturen. Die Mutante zeigte aber auch zu diesen Zeitpunkten im Einklang mit den transkriptionellen Daten eine signifikante und bis zu 15-fach verringerte Aktivität der Aconitase.

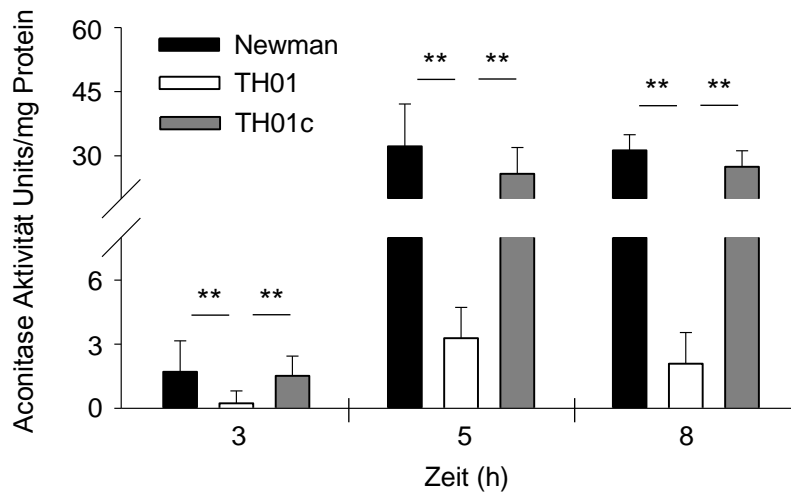


Abb. 4.24: Aktivität des TCA-Zyklus Enzyms Aconitase in *S. aureus* Stamm Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementante TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium + 0,1% Glukose bei 37°C. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Deletion von *ccpE* auch in Anwesenheit von Glukose zu einem verminderten Wachstum ab der post-exponentiellen Phase führte, sobald die gesamte Glukose aus dem Medium aufgebraucht war. Ferner zeigte sich ein Anstieg der Konzentration an Acetat bis zur post-exponentiellen Phase, welche in der Folge wieder abnahm. Im späteren Wachstumsverlauf konnte ein Anstieg der Ammoniak-Konzentration beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte sich auch unter diesen Bedingungen eine deutlich reduzierte Transkription von *citB* und Aktivität der Aconitase in der Mutante TH01, wobei die Werte nach 3 Stunden insgesamt sehr niedrig waren.

4.3.10 Überprüfung von CcpE aus *S. aureus* in Hinblick auf eine funktionelle Homologie zu CcpC aus *B. subtilis*

Der auf Citrat reagierende Regulator CcpC aus *B. subtilis* gilt als ein Repressor der *citB* Transkription (Jourlin-Castelli *et al.*, 2000). Da die Deletion von *ccpE* in *S. aureus* hingegen zu einer deutlich reduzierten Menge an *citB*-Transkript führt, darf davon ausgegangen werden, dass CcpE aus *S. aureus* als ein Aktivator der *citB*

Transkription fungiert und damit wahrscheinlich kein funktionales Homolog von CcpC ist. Um diese Hypothese zu prüfen, sollte anhand von *trans*-Komplementationsexperimenten untersucht werden, ob *ccpE* aus *S. aureus* eine *B. subtilis* Δ *ccpC* Mutante bzw. *ccpC* aus *B. subtilis* die *S. aureus* Δ *ccpE* Mutante TH01 komplementieren kann. Dazu wurden Plasmide mit *ccpC* aus *B. subtilis* unter der Kontrolle seines nativen Promoters (pTH3) sowie *ccpE* aus *S. aureus* unter der Kontrolle der *B. subtilis* *ccpC*-Promotoren P1 und P2 (pTH4) konstruiert. Diese wurden anschließend in TH01 und die bereits vorhandene *B. subtilis* *ccpC* Mutante CJB9 (beschrieben in Jourlin-Castelli *et al.*, 2000) transformiert und mittels PCR auf ihre Richtigkeit überprüft.

Zur weiteren Untersuchung wurden die *B. subtilis* Stämme AF21 (Wildtyp), CJB9 (AF21::*ccpC*), CJB9*pTH3 und CJB9*pTH4 in dem für *B. subtilis* geeigneten TSS Minimalmedium + 0,2% Glutamin und 0,5% Glukose, sowie die *S. aureus* Stämme Newman, TH01, TH01*pTH3 und TH01*pTH4 in LB-L Medium bei 37°C bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase angezogen und Proben zur RNA-Extraktion genommen. Von diesen Proben wurde mittels quantitativer Transkriptionsanalyse zunächst die Transkription von *citB* bestimmt. Wie in Abb. 4.25 zu sehen, zeigte sich dabei wie in der Literatur beschrieben (Jourlin-Castelli *et al.*, 2000) eine 10-fach erhöhte Transkription von *citB* in der Mutante CJB9 im Vergleich zum Wildtyp AF21. Während die Komplementierung von Stamm CJB9 mit Plasmid pTH3 wieder eine zum Wildtyp vergleichbare Menge an *citB*-Transkript zeigte, resultierte die Komplementation mit *ccpE* aus *S. aureus* über das Plasmid pTH4 dagegen nicht in einer Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps, was sich in einer 8-fach erhöhten Transkription von *citB* äußerte. Ein vergleichbares Resultat war für die *S. aureus* *trans*-Komplementationen zu beobachten. Hier konnte nur bei dem mit dem *ccpE*-enthaltenden Plasmid pTH4 transformierten TH01 Derivat eine dem Wildtyp entsprechende *citB* Transkription beobachtet werden. Die Komplementante TH01*pTH3 mit *ccpC* aus *B. subtilis* zeigte dagegen weiterhin eine deutlich reduzierte Transkription (8-fach) von *citB*, vergleichbar zu TH01.

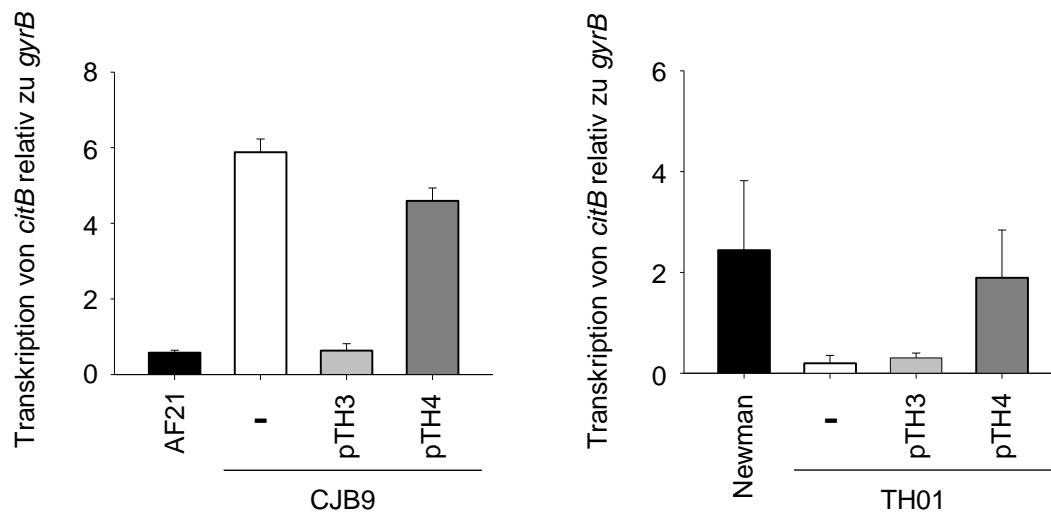


Abb. 4.25: Quantitative Transkriptionsanalyse von *citB* der *B. subtilis* Stämme AF21, CJB9 (AF21::*ccpC*), CJB9*pTH3 (*B. subtilis ccpC* unter der Kontrolle seiner nativen Promotoren P1/2) und CJB9*pTH4 (*S. aureus ccpE* unter der Kontrolle der *B. subtilis ccpC*-Promotoren P1/2), nach einem Wachstum in TSS Minimalmedium + 0,2% Glutamin und 0,5% Glukose, sowie der *S. aureus* Stämme Newman, TH01, TH01*pTH3 und TH01*pTH4 nach einem Wachstum in LB-L Medium bis zur mittleren exponentiellen Phase bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Um auszuschließen, dass die im Vergleich zum Wildtyp nach wie vor erhöhte *citB*-Transkription in Stamm CJB9*pTH4 Resultat einer möglicherweise nicht vorhandenen Transkription oder Translation von *ccpE* war, wurde dessen Transkription mittels qPCR und die Translation anhand einer Western Blot Analyse untersucht. Dabei konnte im Stamm CJB9*pTH4 eine große Menge an *ccpE*-Transkript nachgewiesen werden. Auch in TH01*pTH4 wurde erwartungsgemäß eine Transkription von *ccpE* beobachtet, welche etwa 3-fach höher als im Wildtyp Newman war (Abb. 4.26B). Anhand der Western Blot Analyse konnte darüber hinaus sowohl in CJB9*pTH4 als auch in TH01*pTH4 die Produktion von CcpE nachgewiesen werden (Abb. 4.26A). Hier zeigte sich übereinstimmend zu den transkriptionellen Daten eine vermehrte Produktion von CcpE in TH01*pTH4 im Vergleich zum Wildtyp Newman, sowie sehr großen Mengen an CcpE-Protein in der Komplementante CJB9*pTH4. Somit wird CcpE im *B. subtilis* Derivat CJB9*pTH4 zwar in großen Mengen produziert, dies führt jedoch nicht zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch für die Transkription von *ccpC* gemacht (Abb. 4.26B). In der Komplementante CJB9*pTH3

konnte *ccpC*-Transkript nachgewiesen werden und der *citB* Transkriptionsphänotyp des Wildtyps wiederhergestellt werden. In TH01*pTH3 führte die Komplementation zwar auch zu einer Transkription von *ccpC*, jedoch konnte in diesem Derivat keine Wiederherstellung der Transkriptmenge von *citB* vergleichbar zum Wildtyp Newman festgestellt werden.

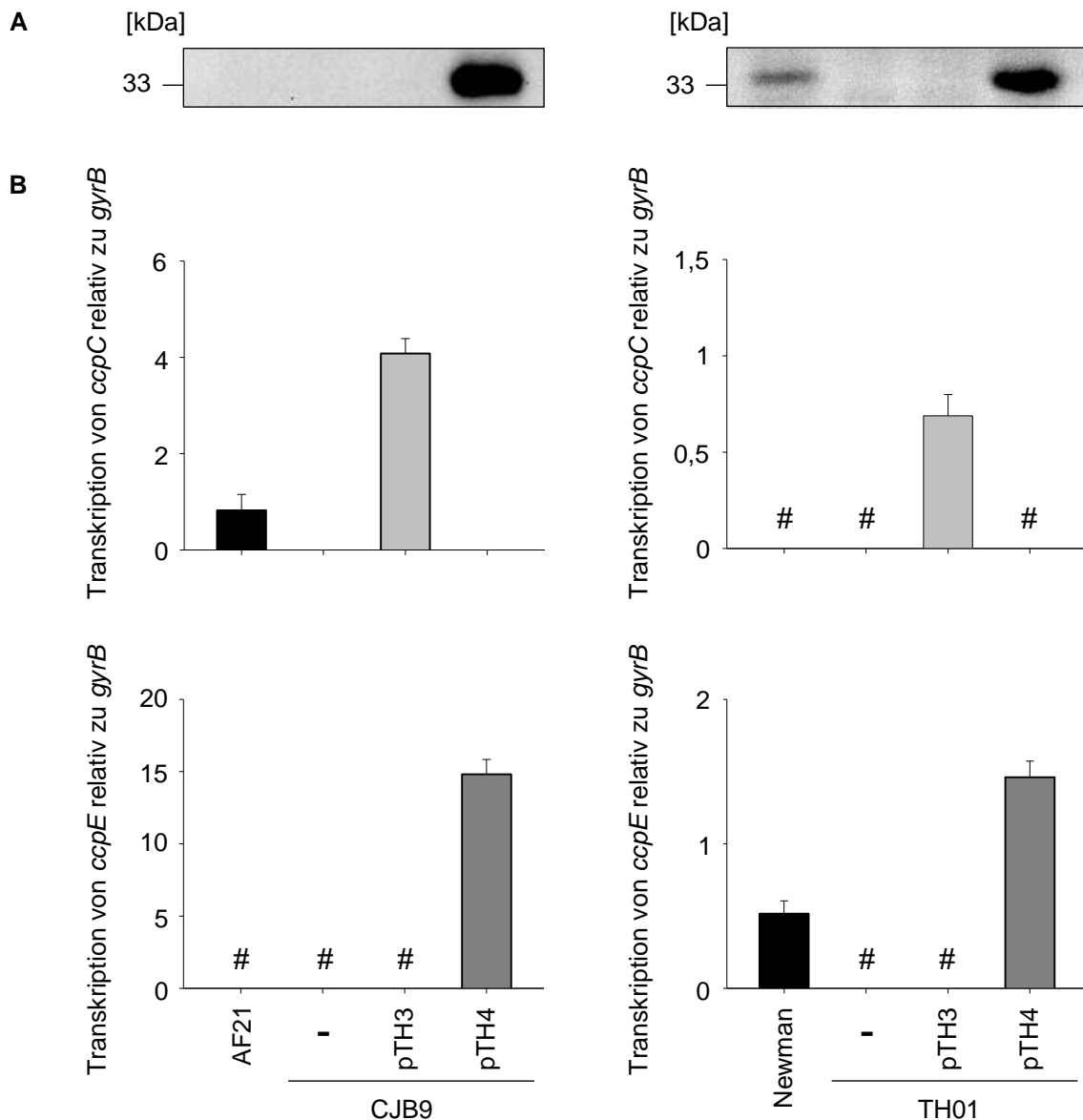


Abb. 4.26: (A) Western Blot Analyse zytosolischer Proteinextrakte der *B. subtilis* Stämme AF21, CJB9 (AF21::*ccpC*), CJB9*pTH3 (*B. subtilis ccpC* unter der Kontrolle seiner nativen Promotoren P1/2) und CJB9*pTH4 (*S. aureus ccpE* unter der Kontrolle der *B. subtilis ccpC*-Promotoren P1/2), sowie der *S. aureus* Stämme Newman, TH01, TH01*pTH3 und TH01*pTH4 nach 6 Stunden Wachstum in LB-L Medium. Verwendet wurde der gegen CcpE gerichtete polyklonale Antikörper SYR237. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Wiederholungen. (B) Quantitative Transkriptionsanalyse von *ccpC* und *ccpE* der *B. subtilis* Stämme nach einem Wachstum in TSS Minimalmedium + 0,2% Glutamin und 0,5% Glukose, sowie der *S. aureus* Stämme nach einem Wachstum in LB-L Medium bis zur mittleren exponentiellen Phase bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. #, Transkriptmenge unter dem Detektionslimit.

4.3.11 Einfluss von CcpE auf Virulenzfaktoren von *S. aureus*

Wie zuvor schon erwähnt hat die Aktivität des TCA-Zyklus in *S. aureus* auch eine Auswirkung auf die Virulenz dieses Bakteriums (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009). Aufgrund der zuvor gemachten Beobachtungen sollte daher die Auswirkung der Deletion von *ccpE* auf verschiedene, wichtige Virulenzfaktoren von *S. aureus* untersucht werden.

Es ist seit längerem bekannt, dass die Expression von RNAIII, Teil des *agr*-Systems von *S. aureus*, unter anderem von der Aktivität des TCA-Zyklus beeinflusst wird (Zhu *et al.*, 2009; Somerville *et al.*, 2002). Daher sollte der Effekt der Deletion von *ccpE* auf die Expression von RNAIII untersucht werden. Dazu wurde anhand eines Reporterassays mit den Stämmen Newman**pSB2035*, TH01**pSB2035* und TH01c**pSB2035* (von M. Bischoff, Universität des Saarlandes, Homburg, zur Verfügung gestellt), welche das Plasmid *pSB2035* (*agr* P3 Promoter-*gfp-luxABCDE*) trugen, die Expression von RNAIII über ein Wachstum von 12 Stunden in LB-L Medium zu den Zeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Stunden bestimmt. Wie in Abb. 4.27 zu sehen, zeigte sich zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikante, etwa 2 bis 3-fach erhöhte Expression von RNAIII in der Δ *ccpE* Mutante TH01**pSB2035* im Vergleich zum Wildtyp Newman**pSB2035* und der Komplementante TH01c**pSB2035*. Während die Expression in der exponentiellen Wachstumsphase nach 3 Stunden am niedrigsten war, stieg sie zu den späteren Zeitpunkten nach 6 und 9 Stunden, insbesondere in der Mutante, stark an. Nach 12 Stunden zeigte sich hingegen wieder eine leichte Abnahme der Expression.

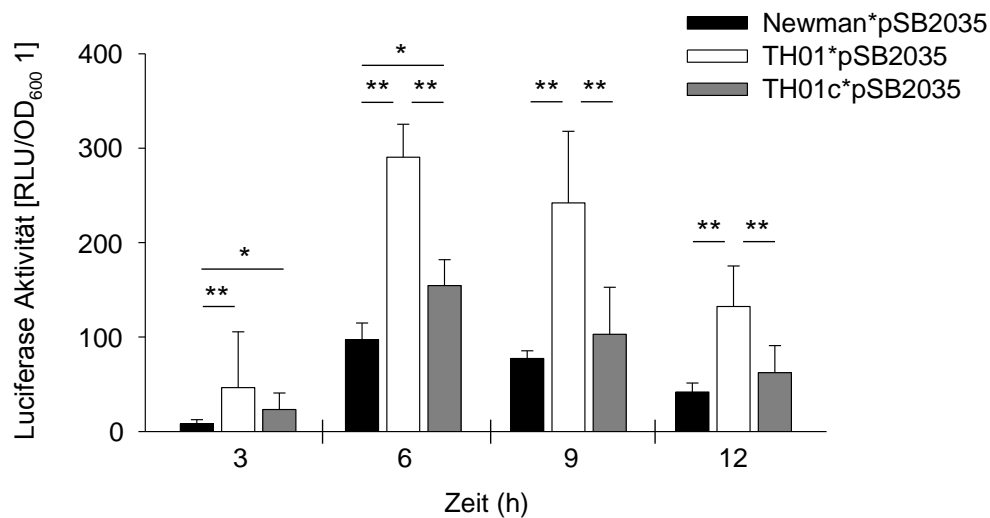


Abb. 4.27: Luciferase-Aktivität zur Bestimmung der Expression von RNAIII in den Wachstumskulturen der *S. aureus* Stämme Newman*pSB2035, TH01*pSB2035 und TH01c*pSB2035. Die Bakterien wurden über 12 Stunden in LB-L Medium bei 37°C angezogen und die Messungen erfolgten zu den Zeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Stunden. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte der ermittelten Lumineszenzwerte, dargestellt als „relative light units“ (RLU) per OD₆₀₀ von 1 mit den jeweiligen Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Da RNAIII als positiver Regulator von sekretorischen Virulenzfaktoren wie dem α -Hämolyysin (*hla*) bekannt ist (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009), wurde im Folgenden die Transkription von *hla* in den hier untersuchten Stämmen per qPCR quantitativ bestimmt (Abb. 4.28). Dabei zeigte sich während der exponentiellen Wachstumsphase (3 Stunden), im Einklang mit der Literatur (Seidl *et al.*, 2006), nur eine sehr geringe Transkription von *hla* in allen drei untersuchten Stämmen und es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Zu den Zeitpunkten 6, 9 und 12 Stunden konnte dagegen ein drastischer Anstieg der Mengen an *hla* mRNA (bis zu 120-fach) in der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 beobachtet werden. Dabei war die Transkription in TH01 im Vergleich zum Wildtyp und der Komplementante TH01c während der späteren Wachstumsphasen signifikant erhöht. Zwar zeigten Newman und TH01c nach 3 Stunden zu den Zeitpunkten 6 und 9 Stunden auch eine ansteigende Transkription von *hla*, diese fiel im Vergleich zur Mutante mit einem Faktor von bis zu 6 aber deutlich geringer aus. Darüber hinaus zeigte die Komplementante TH01c zu allen Zeitpunkten zum Wildtyp vergleichbare Mengen an *hla* Transkripten.

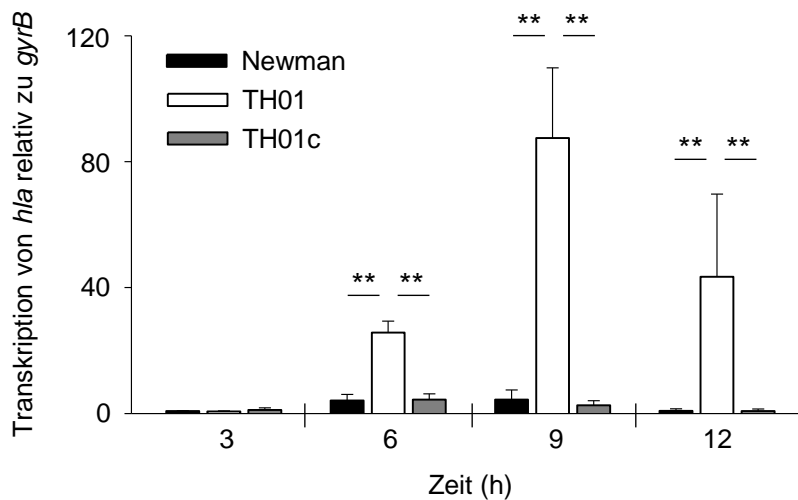


Abb. 4.28: Quantitative Transkriptionsanalyse von *hla* in *S. aureus* Stamm Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementation TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *S. aureus* ist das kapsuläre Polysaccharid (CP), das als Kapsel die Zellwand des Bakteriums verhüllt und dieses so vor der Phagozytose durch Zellen des Immunsystems schützen kann. Die Ausbildung der Kapsel ist dabei scheinbar eng mit der Aktivität des TCA-Zyklus verknüpft (Sadykov *et al.*, 2010a). Vor diesem Hintergrund sollte die Auswirkung der Deletion von *ccpE* auf die Fähigkeit der Kapselbildung im *S. aureus* Stamm Newman, welcher CPs vom Serotyp 5 produziert, untersucht werden. Dazu wurde eine quantitative Transkriptionsanalyse von *capA* (kodiert für das „CP synthesis enzyme A“) des *cap* Operons mittels qPCR in Newman, TH01 und TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium durchgeführt. Während die Transkription von *capA* zum Zeitpunkt 3 Stunden in der exponentiellen Phase noch recht gering war, stieg sie mit fortlaufendem Wachstum zur post-exponentiellen Phase nach 6 Stunden im Wildtyp Newman und der Komplementante TH01c deutlich an und erreichte sein Maximum nach 9 Stunden (Abb. 4.29). In der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 hingegen war zu allen untersuchten Zeitpunkten nur eine geringe Transkription von *capA* zu beobachten. Nach 6, 9 und 12 Stunden Wachstum war eine signifikant reduzierte Menge (bis zu 16-fach) an *capA* mRNA in TH01 im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar. Die

Komplementante TH01c zeigte dagegen zu allen Zeitpunkten wieder zum Wildtyp Newman vergleichbare Mengen an Transkript.

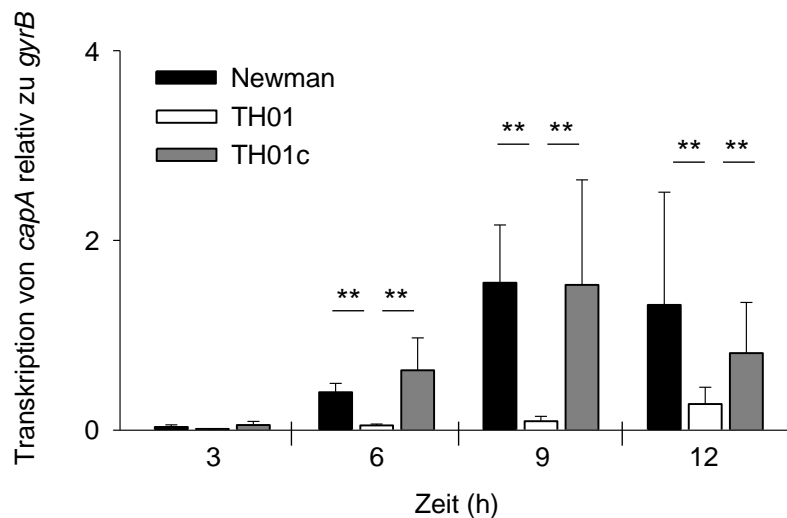


Abb. 4.29: Quantitative Transkriptionsanalyse von *capA* in *S. aureus* Stamm Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementante TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

In der jüngeren Vergangenheit konnte mit den sogenannten PSMs („phenol-soluble modulins“) ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *S. aureus* identifiziert werden. Bei den PSMs handelt es sich um eine Gruppe von kurzen, amphipathischen und α -helikalen Peptiden. Dabei weist insbesondere die Gruppe der PSM α Peptide eine besonders starke leukolytische, und proinflammatorische Aktivität auf. Die Expression des *psm α* Operons, welches für die vier Peptide PSM α 1 bis PSM α 4 kodiert, wird über den durch das *agr*-System kodierten Regulator AgrA stimuliert (Queck *et al.*, 2008). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit auch ein möglicher Einfluss der Deletion von *ccpE* auf die Transkription dieses Virulenzfaktors von *S. aureus* untersucht werden. Wie in Abb. 4.30 zu sehen, zeigte sich, gegenläufig zum beobachteten Effekt von CcpE auf die RNAlII Transkription, zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikant reduzierte (bis zu 10-fach) Transkription von *psm α* in der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 im Vergleich zum Wildtyp Newman und der Komplementante TH01c. Die Komplementante zeigte zu allen Zeitpunkten wieder zum Wildtyp vergleichbare Mengen an Transkript. Über den untersuchten Zeitraum war die

Expression von *psmA* zum Beginn der post-exponentiellen Phase nach 6 Stunden am höchsten und nahm im späteren Wachstumsverlauf wieder stetig ab.

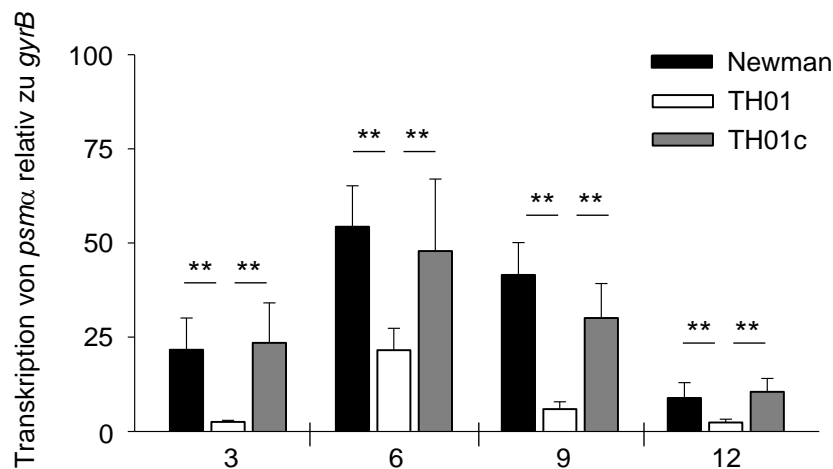


Abb. 4.30: Quantitative Transkriptionsanalyse von *psmA* in *S. aureus* Stamm Newman, der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 und dessen Komplementation TH01c nach 3, 6, 9 und 12 Stunden Wachstum in LB-L Medium bei 37°C. Die Menge an mRNA ist in Relation zur Transkription von *gyrB* dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Statistische Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. **, $P < 0,01$.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Deletion von *ccpE* neben seinem Einfluss auf die Aktivität des TCA-Zyklus auch einen Effekt auf die Transkription wichtiger Virulenzfaktoren von *S. aureus* hat. So ist die Transkription der wichtigen Virulenzfaktoren RNAlII, *hla*, *capA* und *psmA* in der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 signifikant beeinflusst.

5 Diskussion

5.1 Der Einfluss von CcpA auf die Biofilmbildung in *S. epidermidis*

Die Biofilmforschung von *S. epidermidis* rückte in den vergangenen Jahren vermehrt in den Fokus der Forschung, da dieser sein hohes pathogenes Potential vornehmlich durch seine Fähigkeit zur Ausbildung anhaftender, mehrlagiger Biofilme an verschiedenste Biomaterialien erlangt (Rohde *et al.*, 2010).

Mit PIA konnte eine wichtige Komponente zur interzellulären Adhäsion und Biofilmmakkumulation des Staphylokokken-Biofilms identifiziert werden (Mack *et al.*, 1996). Die für die Bildung von PIA benötigten Proteine werden unter anderem über den *icaADBC*-Lokus kodiert. Dabei zeigte sich insbesondere unter nährstoffreichen Bedingungen, wie etwa in Anwesenheit von Glukose, während denen der TCA-Zyklus reprimiert ist, eine verstärkte Biofilmbildung von *S. epidermidis* (Dobinsky *et al.*, 2003; Mack *et al.*, 1992). Passend dazu beobachteten Vuong *et al.* (2005), dass eine Repression des TCA-Zyklus mittels Fluorocitrat, welches das Enzym Aconitase inhibiert, in einer erhöhten Produktion von PIA resultiert. Anschließend konnte dieselbe Arbeitsgruppe anhand einer Aconitase-Mutante (1457-*acnA*) zeigen, dass die daraus resultierende Inaktivierung des TCA-Zyklus zu einer deutlich erhöhten Transkription von *icaADBC* und Produktion von PIA führte (Sadykov *et al.*, 2008). Die Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass durch eine modifizierte Aktivität des TCA-Zyklus entstandene metabolische Veränderungen von Regulatoren der *icaADBC*-Transkription wahrgenommen werden (Sadykov *et al.*, 2010b). Daher untersuchten Sadykov *et al.* (2008) in diesem Kontext einen möglichen Einfluss der zwei DNA-Bindeproteine IcaR und SarA sowie des alternativen Sigmafaktor σ^B auf die Produktion von PIA, von denen ein regulatorischer Einfluss auf die Transkription von *icaADBC* bekannt ist. Dabei resultierte die Inaktivierung des TCA-Zyklus mittels Fluorocitrat auch in den Mutantenstämmen 1457-*icaR* und 1457-*sigB* wie zuvor beobachtet in einer erhöhten Produktion von PIA, was gegen einen Einfluss dieser beiden Regulatoren auf den beobachteten Effekt spricht. In einer 1457-*sarA* Mutante führte die Zugabe von Fluorocitrat dagegen zu einer unveränderten Produktion von PIA, was darauf hindeutet, dass SarA für die Synthese von PIA benötigt wird. Die Autoren schlossen aus ihren Befunden, dass es aber noch einen weiteren Regulator

geben muss, welcher auf durch den TCA-Zyklus induzierte metabolische Veränderungen reagiert.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des KKR-Regulators CcpA als möglicher weiterer Regulator auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* untersucht. Bereits kürzlich zeigten Sadykov *et al.* (2010b) anhand einer Metabolomstudie in *S. epidermidis*, dass ein reprimierter TCA-Zyklus zu einer erhöhten Konzentration an Glukose-6-Phosphat führt. Für Bakterien der Abteilung Firmicutes wird angenommen, dass ein Anstieg der Konzentration an Glukose-6-Phosphat in einer zunehmenden Phosphorylierung von HPr durch das Enzym HPrK/P und in der Folge einer verstärkten Komplexbildung von HPr-Ser46-P mit CcpA führt, was letztlich in einer zunehmenden Aktivierung dieses Regulators resultiert (rezensiert in Görke & Stülke, 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Deletion von *ccpA* im *S. epidermidis* Stamm 1457 zu einer leicht aber signifikant reduzierten Transkription von *icaD* des *icaADBC*-Operons sowie einem Verlust der Biofilmbildung bei einem Wachstum in glukosehaltigem Medium führt. Diese Daten stehen in Einklang mit den Beobachtungen von Seidl *et al.* (2008a) in der verwandten Spezies *S. aureus*. Auch in *S. aureus* führte die Deletion von *ccpA* zu einer reduzierten Transkription von *icaADBC* und Produktion von PIA in glukosehaltigem Medium. Der Effekt fiel in dieser Spezies jedoch deutlicher aus. Darüber hinaus zeigte sich auch in *S. aureus* der Verlust der Fähigkeit zur Biofilmbildung als Folge der Deletion von *ccpA*. Ferner konnte dieselbe Arbeitsgruppe zeigen, dass CcpA als Repressor der TCA-Zyklus Gene *citZ* und *citB* fungiert. Die Autoren schlossen aus ihren Beobachtungen, dass der Effekt von CcpA auf die Transkription von *icaADBC* von indirekter Natur und eine Konsequenz der Repression des TCA-Zyklus über dessen Gene *citZ* und *citB* ist. Auch Somerville & Proctor (2009) postulierten, dass die CcpA-vermittelte Aktivierung der *icaADBC* Transkription von der Aktivität des TCA-Zyklus beeinflusst wird. In *S. epidermidis* fungiert CcpA in Anwesenheit von Glukose ebenso als Repressor von *citZ* und *citB* (Sadykov *et al.*, 2011). Daher wäre auch in *S. epidermidis* die CcpA-abhängige Repression des TCA-Zyklus eine mögliche Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der *ica* Transkription in der *ccpA*-Mutante. Wäre dies der Fall, sollte eine Inaktivierung des TCA-Zyklus in der *ccpA*-Mutante erneut in einer erhöhten *ica* Transkription und Produktion von PIA resultieren. Bereits gelaufene

Untersuchungen dazu ergaben jedoch, dass eine Inaktivierung der Aconitase in der *ccpA*-Mutante nicht in einer erhöhten *ica* Transkription (Sadykov *et al.*, 2011) und Produktion von PIA (Sadykov *et al.*, 2010b) resultierte, was zumindest in *S. epidermidis* gegen diesen genannten Erklärungsansatz spricht.

Die Ergebnisse von Sadykov *et al.* (2011) zeigten darüber hinaus, dass die Repression des TCA-Zyklus durch CcpA zu einer Anreicherung von Acetat und einem sinkenden pH-Wert im Medium führt. Die fehlende CcpA-abhängige Repression des TCA-Zyklus in der *ccpA*-Mutante resultierte hingegen in einem alkalischeren pH-Wert des Wachstumsmediums. Da für *S. aureus* kürzlich gezeigt werden konnte, dass die Biofilmbildung vom pH-Wert des Mediums beeinflusst werden kann (Zmantar *et al.*, 2010), wurden die statischen Biofilm-Versuche in dieser Arbeit bei unterschiedlichen pH-Werten (pH6 und pH7) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass auch die Biofilmbildungsfähigkeit von *S. epidermidis* durch den pH-Wert beeinflusst wird, die *ccpA*-Mutante aber in beiden Fällen eine vergleichbar verminderte Biofilmbildung im Vergleich zum Wildtyp aufwies, so dass davon ausgegangen werden darf, dass der Effekt von CcpA auf die Biofilmbildung weitestgehend unabhängig vom pH-Wert zu sein scheint.

Die genauen Mechanismen der CcpA-abhängigen Biofilmbildung in *S. epidermidis* bleiben aber zunächst unklar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch unter Berücksichtigung der Befunde anderer Arbeitsgruppen, dass die Modifikation der Transkription von *icaADBC* und Produktion von PIA in Reaktion auf metabolische Veränderungen durch eine verminderte oder verstärkte Aktivität des TCA-Zyklus von CcpA beeinflusst werden. Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass CcpA im Rahmen dieser Arbeit als ein positiver Faktor der Biofilmbildung von *S. epidermidis* identifiziert werden konnte.

5.2 Physiologische Relevanz der Phosphorylierung von CcpA durch Stk1 in *S. aureus*

Nach derzeitigem Kenntnisstand ist die regulatorische Aktivität von CcpA in Anwesenheit von Glukose, wie zuvor beschrieben, durch eine Komplexbildung mit HPr-Ser46-P bedingt, welcher dann durch eine Bindung an seine *cre* Erkennungssequenzen die Transkription verschiedener Gene modulieren kann (rezensiert in Görke & Stülke, 2008). In den vergangenen Jahren wurden jedoch Beobachtungen gemacht, die darauf hinweisen, dass CcpA scheinbar auch in Abwesenheit von Glukose eine regulatorische Aktivität aufweist. So identifizierten Seidl *et al.* (2009) im Rahmen ihrer Transkriptom- und Proteomstudie in *S. aureus* eine Reihe von Genen die unabhängig von Glukose über CcpA reguliert wurden. Des Weiteren beobachteten Li *et al.* (2010) bei ihren Untersuchungen, dass CcpA zumindest unter *in vitro* Bedingungen auch in Abwesenheit von HPr-Ser46-P eine Bindung an seine *cre* Sequenzen zeigt. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob und über welche anderen Wege CcpA in seiner DNA-Bindeaktivität beeinflusst werden kann.

Ein möglicher Modulator der CcpA-Aktivität in *S. aureus* könnte die Serin/Threonin Proteinkinase Stk1 sein. In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Stk1 einen Einfluss auf zentrale metabolische Prozesse und die Virulenz von *S. aureus* hat (Ohlsen & Donat, 2010; Tamber *et al.*, 2010; Donat *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnten verschiedene Arbeitsgruppen beobachten, dass Stk1 einen Einfluss auf die Aktivität wichtiger globaler Regulatoren dieses Pathogens wie MgrA, LuxS und SarA hat (Sun *et al.*, 2012; Cluzel *et al.*, 2010; Didier *et al.*, 2010). Didier *et al.* (2010) fanden bei ihren Untersuchungen in *S. aureus* heraus, dass eine Phosphorylierung von SarA in einer verminderten DNA-Bindefähigkeit dieses Regulators resultiert. Kürzlich konnten Leiba *et al.* (2012) für *S. aureus* zeigen, dass der KKR-Regulator CcpA durch Stk1 an den Aminosäuren Threonin-18 und Threonin-33 innerhalb seiner DNA-Bindedomäne phosphoryliert werden kann. Auch hier konnte, wie bei SarA, eine verminderte DNA-Bindefähigkeit von CcpA als Folge einer Phosphorylierung beobachtet werden. Weiterhin zeigten Leiba *et al.* (2012) in Bestätigung der Beobachtungen von Li *et al.* (2010), dass CcpA auch in Abwesenheit von HPr-Ser46-P eine DNA-Bindefähigkeit an seine *cre* Sequenzen aufweist. Anhand dieser unter *in vitro* Bedingungen generierten Befunde stellte sich die Frage, welche

Relevanz eine Phosphorylierung von CcpA am Threonin-18 und Threonin-33 *in vivo* hat.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieser Frage nachgegangen und die physiologische Relevanz einer solchen Phosphorylierung von CcpA in *S. aureus* untersucht. Dazu wurden neben dem *S. aureus* Stamm SA113 und seiner $\Delta ccpA$ -Mutante KS66 auch KS66 Derivate, die mit dem Wildtypallel bzw. einer phosphoablative oder phosphomimetischen Variante von *ccpA*, welche *in trans* komplementiert wurden, analysiert. Die initiale Überprüfung der Transkription und Translation von *ccpA* zeigte, dass neben dem Wildtyp auch in allen Komplementationsderivaten wieder CcpA produziert werden konnte, wenn auch in unterschiedlichen Mengen. Die mit dem Wildtypallel und der phosphoablative *ccpA* Variante komplementierten Derivate zeigten dabei eine im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöhte Menge an CcpA, die sehr wahrscheinlich auf einen "multicopy"-Effekt durch das eingesetzte Plasmid pCN34 zurückzuführen ist (Charpentier *et al.*, 2004). Die in dem mit der phosphomimetischen *ccpA* Variante komplementierten Derivat vorgefundene drastisch erhöhte Transkription und Translation von *ccpA* hingegen kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass CcpA seine Expression in *S. aureus* autoregulieren kann und in diesem Organismus als negativer Regulator seiner eigenen Expression fungiert. Scheinbar führt die mit der Phosphorylierung einhergehende Reduktion der DNA-Bindfähigkeit von CcpA zu einem deutlichen Verlust von dessen Autoregulation in der phosphomimetischen Komplementante. Im Einklang mit diesen Beobachtungen konnten bereits Egeter & Brückner (1996) für die verwandte Spezies *Staphylococcus xylosus* zeigen, dass CcpA seine Transkription zu reprimieren vermag.

Um nun den Effekt der CcpA Varianten auf deren *in vivo* Aktivität hin zu untersuchen, wurde sowohl die Transkription von *citZ* und *hla*, als auch die Biofilmbildung in den entsprechenden Derivaten untersucht. Seidl *et al.* (2008a) konnten in einer früheren Studie zeigen, dass CcpA in Anwesenheit von Glukose die Transkription des TCA-Zyklus Gens *citZ* reprimiert. Dieses Ergebnis konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. So resultierte auch hier die Deletion von *ccpA* in einer erhöhten Transkription von *citZ*. Im Gegensatz zur Komplementation mit dem Wildtypallel und der phosphoablative CcpA Variante führte die Komplementation mit

der phosphomimetischen CcpA Variante jedoch nicht zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Ein vergleichbares Ergebnis war im Fall von *hla* zu beobachten. Hier resultierte die Deletion von *ccpA*, im Einklang mit den Daten von Seidl *et al.* (2006), in einer reduzierten Transkription von *hla*, wobei die Komplementation mit der phosphomimetischen CcpA Variante wie bei *citZ* zu keiner Wiederherstellung des im Wildtyp vorzufindenden Phänotyps führte. Sowohl für *citZ* (Seidl *et al.*, 2008a) als auch für *hla* (Seidl *et al.*, 2006) wurde bereits das Vorhandensein putativer *cre* Erkennungssequenzen für CcpA berichtet und postuliert, dass die Repression dieser Gene durch eine direkte Bindung von CcpA an diese Erkennungssequenzen erfolgt. Anhand der hier dargestellten Ergebnisse lässt sich nun vermuten, dass die Phosphorylierung von CcpA zu einer verminderten DNA-Bindefähigkeit führt. Passend zu dieser Hypothese zeigten Leiba *et al.* (2012) mittels EMSAs, dass die Phosphorylierung von CcpA einen Verlust der Bindefähigkeit von CcpA an seine *cre* Erkennungssequenzen von *citZ* und *hla* zur Folge hat.

Auch in Hinblick auf die Biofilmbildung zeigte das mit der phosphomimetischen CcpA Variante komplementierte KS66 Derivat, anders als die mit dem Wildtyp parallel und der phosphoablative CcpA Variante komplementierten Derivate, eine signifikant reduzierte Biofilmbildung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen damit zum einen, dass CcpA ein essentieller Faktor der Biofilmbildung von *S. aureus* in Anwesenheit von Glukose ist. Zum anderen weisen sie darauf hin, dass Stk1 über die Phosphorylierung von CcpA negativ auf die Biofilmbildung in *S. aureus* einwirken kann. Interessanterweise zeigten sich weder auf Transkriptionsebene, noch im Rahmen der Biofilmversuche, markante Unterschiede zwischen den mit dem Wildtyp parallel und der phosphoablative CcpA Variante komplementierten KS66 Derivaten. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass das Pathogen durch die Inaktivierung der Phosphorylierungsstellen von CcpA keine gravierende Einbuße der CcpA-Aktivität, zumindest in Hinblick auf die hier getesteten Phänotypen, hat und wirft damit die Frage auf, ob und welchen Vorteil das Pathogen durch die Stk1-vermittelte Phosphorylierung von CcpA erhält. Dieser Frage konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter nachgegangen werden.

Die Ergebnisse dieses Teilprojekts bestätigen die Erkenntnisse früherer Studien, dass CcpA ein wichtiges Bindeglied zwischen Metabolismus und Virulenz von *S. aureus* ist. Weiterhin zeigte sich *in vivo* in *S. aureus*, dass eine Stk1-vermittelte

Phosphorylierung von CcpA innerhalb der DNA-Bindedomäne einen inaktivierenden Einfluss auf dessen regulatorische Aktivität in Hinblick auf CcpA-regulierte Gene und die Biofilmbildung dieses Pathogens hat. Diese neuen Erkenntnisse bestätigen daher die Hypothese, dass die Aktivität von CcpA nicht einzig durch metabolische Signale, welche zur Bildung von HPr-Ser46-P führen, moduliert werden kann, sondern auch anhand einer Phosphorylierung durch Stk1. Jedoch bleiben die genauen Stimuli, welche die Phosphorylierung von CcpA durch Stk1 aktivieren, ebenso wie die Vorteile, die das Pathogen durch diese Phosphorylierung von CcpA erhält, vorerst ungeklärt.

5.3 CcpE als regulatorische Verknüpfung zwischen Metabolismus und Virulenz in *S. aureus*

Der TCA-Zyklus ist eine wichtige Komponente des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *S. aureus*, welcher das Bakterium mit Energie, Redoxäquivalenten und biosynthetischen Zwischenprodukten versorgt. Unter nährstoffreichen Bedingungen kann der Bedarf an biosynthetischen Zwischenprodukten exogen gedeckt werden. Daher ist die Aktivität des TCA-Zyklus unter derartigen Bedingungen weitestgehend reprimiert (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009). Schon Strasters & Winkler (1963) berichteten, dass die Anwesenheit von leicht verstoffwechselbaren Kohlenstoffquellen wie Glukose zu einer Repression des TCA-Zyklus in *S. aureus* führt. Kürzlich konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Glukose die Transkription von Genen des TCA-Zyklus durch den globalen KKR-Regulator CcpA reprimiert wird (Seidl *et al.*, 2009; Seidl *et al.*, 2008a). Ein weiterer wichtiger Repressor des TCA-Zyklus in diesem Zusammenhang ist CodY, bei dem es sich um einen hochkonservierten Regulator in gram-positiven Bakterien handelt, dessen DNA-Bindeaffinität durch eine Interaktion mit verzweigt-kettigen Aminosäuren (BCAA) und GTP beeinflusst wird (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009). Sobald die Verfügbarkeit von Nährstoffen zurückgeht und für das weitere Wachstum von *S. aureus* zum limitierenden Faktor wird, kommt es zur Derepression der Gene des TCA-Zyklus. Dies führt zur Aktivierung des TCA-Zyklus, über den in der Folge weniger bevorzugte Kohlenstoffquellen wie Acetat verstoffwechselt werden können. Der TCA-Zyklus ist somit ein äußerst wichtiger Stoffwechselweg von *S. aureus*, um sich an ein

nährstoffarmes Umfeld adaptieren zu können (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009; Somerville *et al.*, 2002). In *B. subtilis* konnte mit CcpC ein weiterer Regulator identifiziert werden, welcher in diesem Bakterium als Regulator der TCA-Zyklus Gene *citZ* und *citB* fungiert (Mittal *et al.*, 2013; Jourlin-Castelli *et al.*, 2000). Für *S. aureus* wurde das Vorhandensein eines solchen Regulators jedoch bisher nicht beschrieben.

An diesem Punkt sollte die vorliegende Arbeit ansetzen. Anhand von Genomvergleichen konnte ein mögliches Homolog von CcpC in *S. aureus* identifiziert werden, welches in der Folge als CcpE benannt wurde. Das entsprechende Gen konnte im Rahmen dieser Arbeit in mehreren *S. aureus* Isolaten markerlos deletiert werden und entsprechende *cis*-Komplementanten generiert werden. Die weiteren Analysen zu diesem Gen ergaben, dass *ccpE* mit dem bisher ebenfalls uncharakterisierten und stromaufwärts liegenden Gen NWMN_0640 ein Operon bildet und diese bicistronisch, bzw. zusammen mit den stromabwärts liegenden Genen NWMN_0643/0644 polycistronisch transkribiert werden. Der genaue Transkriptionsstartpunkt dieses Operons konnte mithilfe der 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) Methode ermittelt werden und ermöglichte die Identifikation der weiter stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt befindlichen mutmaßlichen σ^A -Bindestelle ATGACA-17-TATAAT, welche gut mit den -35 und -10 Hexameren übereinstimmt, die bereits in Promoterregionen verschiedener σ^A -abhängiger Gene von *S. aureus* gefunden werden konnten (Deora & Misra, 1996; Rao *et al.*, 1995).

Anhand von Aminosäuresequenzvergleichen wird für CcpE angenommen, dass dieses Protein als ein transkriptioneller Regulator vom LysR-Typ aus der LTTR-Familie fungiert. Von vielen Regulatoren dieses Typs ist bekannt, dass sie ihre Transkription autoregulieren können (Maddocks & Oyston, 2008). So konnte von Kim *et al.* (2002) für CcpC aus *B. subtilis* gezeigt werden, dass dieser LysR-Typ Regulator seine Transkription negativ autoregulieren kann. Neben diesen Erkenntnissen und aufgrund der identifizierten möglichen Bindestelle für Transkriptionsfaktoren in der Promoterregion von NWMN_0640 ist auch eine Autoregulation von CcpE wahrscheinlich. Passend zu dieser Annahme konnte von einem Kooperationspartner im Rahmen von EMSA-Studien nachgewiesen werden, dass CcpE innerhalb der Promoterregion von NWMN_0640 binden kann, nicht jedoch an die Nukleotidsequenz unmittelbar oberhalb von *ccpE* (Hartmann *et al.*,

2013). Darüber hinaus zeigten die quantitativen Transkriptionsdaten der vorliegenden Arbeit eine reduzierte Transkription von NWMN_0640 in der $\Delta ccpE$ Mutante TH01 während der späteren Wachstumsphase nach 9 und 12 Stunden. Diese Befunde lassen im Zusammenhang betrachtet darauf schließen, dass CcpE seine Transkription durch eine Bindung innerhalb der Promoterregion, anders als CcpC (Kim *et al.*, 2002), in positiver Weise autoregulieren kann. Ferner scheint das NWMN_0640/*ccpE* Operon, basierend auf den qPCR Ergebnissen zu NWMN_0640 und *ccpE*, relativ konstant über den in der Arbeit untersuchten Wachstumszeitraum transkribiert zu werden. Diese Beobachtung steht jedoch im Kontrast zu den Daten der Northern Blot Analyse, bei der sich eine wachstumsabhängige Transkription mit einem Anstieg während der späteren Wachstumsphase zeigte. Eine genaue Analyse dieser Diskrepanz ist schwierig, da die Northern Blot Versuche von einem anderen Labor durchgeführt wurden. In Hinblick auf die Produktion von CcpE zeigen die Ergebnisse der Western Blot Analyse jedoch im Einklang mit den Transkriptionsdaten der Northern Blot Analyse eine zunehmende Proteinmenge an CcpE während der späteren Zeitpunkte nach 9 und 12 Stunden. Somit scheint CcpE insbesondere im späteren Wachstumsverlauf verstärkt von *S. aureus* produziert zu werden.

Wie zuvor erwähnt fungiert CcpC in *B. subtilis* als Regulator der Transkription der TCA-Zyklus Gene *citZ* und *citB* (Mittal *et al.*, 2013; rezensiert in Sonenshein, 2007). Daraus ergab sich die Hypothese, dass auch CcpE in die Regulation dieser Gene involviert sein könnte und somit einen Einfluss auf die Aktivität des TCA-Zyklus hat. Die Untersuchungen zur Überprüfung dieser Hypothese wurden zunächst in LB-L Medium ohne Glukose durchgeführt, um so eine Interferenz mit dem KKR-Regulator CcpA zu vermeiden, welcher als Repressor der Transkription der TCA-Zyklus Gene *citZ* und *citB* in Anwesenheit von Glukose beschrieben ist (Seidl *et al.*, 2009; Seidl *et al.*, 2008a). Dabei zeigen die Transkriptionsanalysen von *citZ* und *citB*, dass die Deletion von *ccpE* einen relativ geringen Einfluss auf *citZ* zu haben scheint, die Transkription von *citB* aber zu allen untersuchten Zeitpunkten deutlich zu beeinflussen vermochte. Diese Beobachtung spiegelte sich auch in den Enzymaktivitäten der jeweiligen Genprodukte Citrat Synthase und Aconitase wieder. Während der TCA-Zyklus zur exponentiellen Phase reprimiert ist (Zhu *et al.*, 2009) und sich vermutlich aus diesem Grund keine Auswirkung der Deletion von *ccpE* auf

das Wachstum beobachten lässt, zeigen die Transkriptionsanalysen und Enzymaktivitätsbestimmungen zu *citZ* und *citB* der vorliegenden Arbeit, dass der TCA-Zyklus ab der späten exponentiellen Phase nach 3 Stunden verstärkt aktiviert wird. Für eine genaue Interpretation der Ergebnisse zur frühen exponentiellen Phase bei einem Wachstum in Abwesenheit von Glukose sollten jedoch Transkriptionsdaten nach ein oder zwei Stunden Wachstum erhoben werden. Mit dem dann folgenden Beginn der post-exponentiellen Wachstumsphase, zu welcher dieser Stoffwechselweg für das weitere Wachstum von *S. aureus* besonders bedeutsam ist, zeigte sich dann aber eine leicht reduzierte Wachstumsrate und ein geringerer pH-Wert des Mediums für die $\Delta ccpE$ Mutante. Der deutliche Effekt der Deletion von *ccpE* auf *citB* sowie das post-exponentielle Wachstum zeigte sich auch bei einer Kultivierung in glukosehaltigem Medium, wobei die Reduktion des Wachstums und der pH-Werte in der Mutante unter diesen Bedingungen noch deutlicher ausgeprägt war. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Somerville *et al.* (2002) im Rahmen ihrer Untersuchungen einer *S. aureus* Aconitase-Mutante. Dabei führte die Inaktivierung des TCA-Zyklus anhand einer Insertionsmutation des Aconitase-Gens *citB* ebenso zu einem reduzierten Wachstum und geringeren pH-Werten ab dem Beginn der post-exponentiellen Phase in glukosehaltigem Medium. Darüber hinaus zeigte sich während der exponentiellen Phase, im Einklang mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit, eine schnelle Aufnahme der gesamten Glukose durch *S. aureus* und eine damit einhergehende Akkumulation von Acetat. Dieses Phänomen ist typisch für das Wachstum von *S. aureus* in glukosehaltigem Medium (bei ausreichender Sauerstoffversorgung) als Folge der Repression des TCA-Zyklus durch den KKR-Regulator CcpA (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009; Seidl *et al.*, 2006) und erklärt die Reduktion des pH-Wertes während des exponentiellen Wachstums. Mit einem sinkenden Nährstoffangebot oder der zunehmenden Akkumulation von wachstumshemmenden organischen Säuren wie Acetat, kommt es zum Eintritt in die post-exponentielle Wachstumsphase. Während dieser Wachstumsphase wird die Repression des TCA-Zyklus aufgehoben, über den in der Folge alternative Kohlenstoffquellen wie das zuvor akkumulierte Acetat verstoffwechselt werden (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009). Darüber hinaus werden in dieser Wachstumsphase auch vermehrt Kohlenstoffquellen wie Aminosäuren über den TCA-Zyklus verstoffwechselt, was zu einer ansteigenden Ammoniak-Konzentration führt. Letztere gilt als Indikator für die Verstoffwechslung

von Aminosäuren (Somerville *et al.*, 2003; Somerville *et al.*, 2002). Die Transkriptionsanalysen von *citB* sowie die Enzymaktivitätsbestimmungen der Aconitase in der hier vorliegenden Arbeit bestätigen diesen Zusammenhang. Während die Transkription von *citB* und Produktion der Aconitase in der exponentiellen Phase durch die transkriptionelle Repression von CcpA erwartungsgemäß stark reprimiert sind und nahe am Detektionslimit liegen, zeigt sich ab dem Beginn der post-exponentiellen Phase eine deutlich erhöhte Transkription und Enzymaktivität, jedoch nicht in der $\Delta ccpE$ Mutante. Diese sehr niedrige Aktivität des TCA-Zyklus in der Mutante resultierte folglich in einer deutlich geringeren Verstoffwechslung von Acetat und Aminosäuren über diesen Stoffwechselweg im Vergleich zum Wildtyp. So zeigte sich auch nach 12 Stunden Wachstum noch eine hohe Konzentration an Acetat sowie eine geringe Akkumulation von Ammoniak im Wachstumsmedium als Folge der Deletion von *ccpE*, was den weiterhin im Vergleich zur Wildtyp-Kultur reduzierten pH-Wert dieser Kultur erklärt. Eine entsprechende Beobachtung machten auch Somerville *et al.* (2002) als Folge der Inaktivierung des TCA-Zyklus an der Aconitase. Somit führt eine reduzierte Aktivität des TCA-Zyklus zu einer Verhinderung der Verstoffwechslung von Acetat und Aminosäuren während der post-exponentiellen Phase, zu welcher dieser Stoffwechselweg für das weitere Wachstum von *S. aureus* von großer Bedeutung ist. Folglich kommt es zu einem früheren Eintritt in die stationäre Wachstumsphase.

Der deutliche Effekt der Deletion von *ccpE* auf *citB* lässt ferner vermuten, dass CcpE ein essentieller Regulator von dessen Transkription ist. Passend zu dieser Annahme konnte von einem Kooperationspartner mittels EMSA-Studien gezeigt werden, dass CcpE in der Promoterregion von *citB* binden kann, was für eine direkte Regulation von *citB* über CcpE spricht. Für das Gen *citZ*, auf welches die Deletion von *ccpE* nur einen geringfügigen Einfluss hatte, konnte dagegen keine Bindung von CcpE festgestellt werden (Hartmann *et al.*, 2013). Wie bereits erwähnt, wird die Aktivität des TCA-Zyklus unter nährstoffreichen Bedingungen während des exponentiellen Wachstums nach derzeitigem Kenntnisstand anhand der Repression von TCA-Zyklus Genen durch die auch in Hinblick auf die Expression von Virulenzfaktoren wichtigen Regulatoren CcpA und CodY reprimiert. In der Folge resultiert ein sinkendes Nährstoffangebot in einer zunehmenden Auflösung dieser Repression, was zur Aktivierung des TCA-Zyklus während der post-exponentiellen Wachstumsphase führt (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009). Die neu gewonnenen Erkenntnisse dieser

Doktorarbeit zeigen, dass dieser Erklärungsansatz kein vollständiges Bild liefert. So zeigte sich in dieser Arbeit, dass *S. aureus* darüber hinaus mit CcpE über einen direkten positiven Regulator verfügt, welcher ein essentieller Faktor für die Aktivierung der Transkription von *citB* und somit der Aktivität des TCA-Zyklus ist.

Allerdings steht das Ergebnis, dass die Deletion von *ccpE* in einer Reduktion der Transkription von *citB* resultiert, in klarem Widerspruch zu den für CcpC aus *B. subtilis* gemachten Beobachtungen. Jourlin-Castelli *et al.* (2000) beobachteten, dass eine Deletion von *ccpC* in *B. subtilis* zu einer stark erhöhten Transkription von *citB* führte. Auch die reprimierende Funktion von CcpC auf die Transkription von *citZ* war im Rahmen dieser Arbeit für CcpE nicht zu detektieren. Ferner berichteten Jourlin-Castelli *et al.* (2000), dass die DNA-Bindeaktivität von CcpC an *citB* in Abhängigkeit zur Konzentration an Citrat steht, wobei ein Anstieg der Citrat-Konzentration zu einer Auflösung der Repression durch CcpC führt. Ein derartiger Einfluss von Citrat auf CcpE konnte in *S. aureus* dagegen nicht beobachtet werden. In den EMSA-Studien eines Kooperationspartners hatten unterschiedliche Konzentrationen an Citrat keine Auswirkung auf die DNA-Bindeaktivität von CcpE (V. Molle, CNRS, Universität Montpellier II, Montpellier; unveröffentlichte Resultate). Diese Diskrepanzen ließen an einer funktionellen Homologie zweifeln und daher wurde dieser Frage in der vorliegenden Arbeit nachgegangen. Dabei zeigte sich im Rahmen einer *trans*-Komplementationsstudie, dass weder *ccpE* aus *S. aureus* den beschriebenen *citB* Phänotyp der *B. subtilis* Δ *ccpC* Mutante CJB9 noch *ccpC* aus *B. subtilis* den der *S. aureus* Δ *ccpE* Mutante TH01 komplementieren konnte, obwohl das Protein CcpE in den entsprechenden Stämmen exprimiert wurde. Mangels anti-CcpC Antikörper konnte der entsprechende Nachweis für die mit *ccpC* *trans*-komplementierten Derivate zwar hier nicht geführt, aber zumindest auf Transkriptionsebene gezeigt werden, dass *ccpC* in diesen Derivaten transkribiert wird. Da das *ccpC* enthaltende Plasmid zudem in der Lage war, den Phänotyp der *B. subtilis* *ccpC* Mutante CJB9 zu revertieren, kann zumindest gefolgert werden, dass dieses Plasmid für ein funktionales CcpC kodiert. In *Listeria monocytogenes* hingegen konnte ein funktionelles Homolog von CcpC aus *B. subtilis* identifiziert werden (Mittal *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006). Dabei zeigte sich in dieser Spezies, im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, jedoch zum einen ein zur *B. subtilis* Δ *ccpC* Mutante vergleichbarer Phänotyp und zum anderen führte eine *trans*-

Komplementation der Gene in die jeweils andere Spezies zu Komplementierung des entsprechenden Phänotyps. Es sollte allerdings angemerkt werden, dass dieselbe Arbeitsgruppe kürzlich berichtete, dass CcpC bei hohen Konzentration an Citrat auch als Aktivator der Transkription von *citB* in *B. subtilis* und *L. monocytogenes* fungiert (Mittal *et al.*, 2013), wobei die genauen Mechanismen dazu noch unklar sind. Aufgrund der eindeutigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, bei denen CcpE in *S. aureus* als Citrat-unabhängiger Aktivator der Transkription von *citB* identifiziert wurde, sowie der fehlenden *Trans*-Komplementation, ist davon auszugehen, dass es sich bei CcpE aus *S. aureus* um kein funktionelles Homolog zu CcpC aus *B. subtilis* handelt.

Da Citrat im Gegensatz zu CcpC keinen Effekt auf die DNA-Bindeaktivität von CcpE in *S. aureus* hat, stellt sich die Frage, welcher Faktor zur Aktivierung von CcpE führt. Interessanterweise konnte für viele gram-positive Bakterien gezeigt werden, dass die DNA-Bindeaktivität des Regulators Rex in Abhängigkeit zur Konzentration von NAD⁺/NADH steht (Ravcheev *et al.*, 2012). Die Konzentration von NAD⁺/NADH wird unter anderem auch von der Aktivität des TCA-Zyklus beeinflusst und könnte daher möglicherweise auch die DNA-Bindeaktivität von CcpE beeinflussen. Im Rahmen von EMSA-Studien eines Kooperationspartners bestätigte sich diese Vermutung jedoch nicht (V. Molle, CNRS, Universität Montpellier II, Montpellier; unveröffentlichte Resultate). Somit bleibt vorerst ungeklärt, auf welchem Weg die DNA-Bindeeigenschaften von CcpE beeinflusst werden. Ebenso sind die Wachstumsbedingungen, unter denen CcpE in *S. aureus in vitro* aktiv ist, bis dato noch weitgehend unklar.

S. aureus verfügt, wie zuvor erwähnt, mit Regulatoren wie CcpA und CodY über wichtige Regulatoren, welche in Reaktion auf sich ändernde Nährstoffbedingungen die Transkription von metabolischen Genen modulieren können. Neben dieser Funktion haben diese Regulatoren auch einen Einfluss auf die Transkription vieler Virulenzgene und stellen somit eine Verknüpfung zwischen Metabolismus und Virulenz dieses Pathogens dar (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009). Aus vielen Studien zu *S. aureus* ist bekannt, dass vor allem die genaue Feinabstimmung der Aktivität der TCA-Zyklus Enzyme eng mit der Virulenz dieses Pathogens verknüpft ist. So konnten Zhu *et al.* (2009) beispielsweise zeigen, dass eine erhöhte Aktivität

des TCA-Zyklus unter anderem in einer Reduktion der Synthese von PIA, einer verringerten Transkription von RNAIII sowie einer reduzierten *in vivo* Virulenz in einem Endokarditis-Infektionsmodell beim Kaninchen resultierte. Eine Derepression des TCA-Zyklus als Folge der Deletion von *ccpA* in *S. aureus* führt unter anderem zu einer verstärkten Kapselbildung und reduzierten RNAIII Transkription (Seidl *et al.*, 2006). Auf der anderen Seite resultiert eine Inaktivierung des TCA-Zyklus in einer erhöhten Transkription von RNAIII (Somerville *et al.*, 2002) sowie dem Verlust der Fähigkeit zur Kapselbildung (Sadykov *et al.*, 2010a). Diese Beispiele unterstreichen die Wichtigkeit der Regulation der TCA-Zyklus Aktivität in Hinblick auf die Virulenz von *S. aureus*.

Im Einklang mit der zuvor beschriebenen Beobachtung von Somerville *et al.* (2002) resultierte auch die Deletion von *ccpE*, welche zu einer verminderten Aktivität des TCA-Zyklus führt, in einer erhöhten Transkription von RNAIII. Hier sollte allerdings angemerkt werden, dass der Effekt der Deletion von *ccpE* auf die RNAIII Transkription von indirekter Natur zu sein scheint und wohl mit der verminderten Aktivität des TCA-Zyklus zusammenhängt, da sich in EMSA-Studien keine DNA-Bindeaktivität von CcpE in Bezug auf den *agr*-Lokus feststellen ließ (V. Molle, CNRS, Universität Montpellier II, Montpellier; unveröffentlichte Resultate). Eine mögliche Erklärung könnte die Hypothese von Somerville *et al.* (2002) zu deren Beobachtungen sein, dass die erhöhte Transkription von RNAIII eine Folge der ebenso beobachteten verstärkten Transkription von *sarA* als Folge des inaktivierten TCA-Zyklus ist, welches einen positiven Einfluss auf die RNAIII Transkription hat. Diese Hypothese konnte anhand einer vorläufigen *sarA* Northern-Blot-Analyse jedoch nicht bestätigt werden, in der bei der *ccpE* Mutante TH01 eine im Vergleich zum Wildtyp und der *cis*-Komplementante TH01c sogar leicht geringere *sarA* Transkriptmenge detektiert wurde (B. Schulthess, Universität Zürich, Zürich; unveröffentlichte Resultate). Weiterhin zeigte sich insgesamt eine zunehmende Transkription von RNAIII im späteren Wachstumsverlauf zur post-exponentiellen und frühen stationären Phase. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Beobachtungen vieler anderer Studien (Zhu *et al.*, 2009; Majerczyk *et al.*, 2008; Seidl *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2002) und ist ein typischerweise zu beobachtendes Phänomen für *S. aureus*. Allgemein gilt für *S. aureus*, dass die Expression vieler Exoproteine während des exponentiellen Wachstums reprimiert und in der post-exponentiellen Phase aktiviert ist (Chaffin *et al.*, 2012; Somerville *et al.*, 2003), ab welcher das

Nährstoffangebot limitierend wird und die Erschließung neuer Nahrungsquellen an Bedeutung gewinnt. Diese Beobachtung konnte auch für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Virulenzfaktoren von *S. aureus* gemacht werden. Dies hängt sicher unter anderem mit der auch in dieser Doktorarbeit beobachteten Hochregulation wichtiger regulatorischer Systeme wie dem *agr*-System zum post-exponentiellen Wachstum zusammen, welche die Transkription einer Reihe von Virulenzfaktoren beeinflussen können (Chaffin *et al.*, 2012). RNAIII ist ein negativer Regulator der Transkription von verschiedenen Oberflächen-assoziierten Proteinen sowie ein positiver Regulator von Exotoxinen wie dem α -Hämolyisin (*hla*) (rezensiert in Somerville & Proctor, 2009).

Vor diesem Hintergrund und im Einklang mit der Literatur (Somerville *et al.*, 2003) zeigte sich bei den Transkriptionsanalysen der vorliegenden Arbeit erwartungsgemäß nach 6 und 9 Stunden, zur post-exponentiellen und früh stationären Phase, ein Anstieg der Transkription von *hla*. Darüber hinaus war in der $\Delta ccpE$ Mutante, entsprechend der erhöhten Menge an RNAIII Transkript, auch eine erhöhte Transkription von *hla* zu beobachten. Diese fiel jedoch im Vergleich zu RNAIII um einiges drastischer aus. Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob CcpE möglicherweise einen direkten Einfluss auf die Transkription von *hla* hat, oder der Effekt einzig eine Folge der positiven Regulation durch RNAIII ist. In der Tat stellte sich in EMSA-Studien eines Kooperationspartners heraus, dass CcpE an die Promoterregion von *hla* bindet (V. Molle, CNRS, Universität Montpellier II, Montpellier; unveröffentlichte Resultate), was für eine direkte Regulation der Transkription von *hla* durch CcpE spricht. Nach derzeitigem Kenntnisstand unterliegt die Transkription von *hla* einer ganzen Reihe von Virulenzregulatoren, darunter Zweikomponentensysteme wie Agr, SaeRS, ArIRS, sowie transkriptionelle Regulatoren wie CcpA, CodY, MgrA und weitere Vertreter der Sar-Familie. Das Zusammenspiel dieser Faktoren in der Regulation der Transkription von *hla* ist sehr komplex und in verschiedenen Studien gut beschrieben (Gupta *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2011). Jedoch scheint das bisherige Bild der *hla* Regulation aufgrund der neuen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit nicht vollständig zu sein. So gibt es mit CcpE sehr wahrscheinlich einen weiteren Regulator der Transkription von *hla*, welcher auf Grundlage der Transkriptionsdaten dieser Arbeit während der späteren Wachstumsphasen einen wichtigen Repressor der *hla* Transkription darstellt. Dies untermauert die Komplexität der Regulation von *hla* in *S. aureus*, die eine schnelle

Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen dieses Pathogens ermöglicht (Bronner *et al.*, 2004).

In der jüngeren Vergangenheit konnte mit den sogenannten PSMs („phenol-soluble modulins“) ein neuer wichtiger Virulenzfaktor von *S. aureus* identifiziert werden. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von kurzen, amphipathischen und α -helikalen Peptiden, von denen insbesondere die vier Peptide PSM α 1 bis PSM α 4, welche vom *psma* Operon kodiert werden, eine besonders starke leukolytische und proinflammatorische Aktivität aufweisen. Folglich wiesen *psma* Deletionsmutanten von *S. aureus* eine abgeschwächte Virulenz innerhalb mehrerer *in vivo* Infektionsmodelle auf, was die wichtige Rolle der PSM Peptide für die Virulenz von *S. aureus* unterstreicht (Tsompanidou *et al.*, 2013a; Periasamy *et al.*, 2012). Tsompanidou *et al.* (2013b) postulierten kürzlich unter Berücksichtigung der bisherigen Erkenntnisse, dass PSMs ein wichtiger Faktor von *S. aureus* zur Erschließung neuer nährstoffreicher Wirtsregionen für das weitere Wachstum und Überleben sind. Passend dazu beobachteten Chaffin *et al.* (2012) im Rahmen eines *in vivo* Pneumoniemodells bei der Maus mit fortlaufender Pathogenese zum Zeitpunkt 6 Stunden eine erhöhte Transkription von *psma*. Auch in den Transkriptionsanalysen der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein derartiger Anstieg der Transkription von *psma* zur post-exponentiellen und früh stationären Phase nach 6 und 9 Stunden, wenn auch unter *in vitro* Bedingungen. Interessanterweise konnte hier für die $\Delta ccpE$ Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Transkription beobachtet werden. Hier blieb allerdings ungeklärt, was zu dieser Beobachtung führte. Denkbar wäre ein direkter Einfluss von CcpE auf die Transkription von *psma*, dessen Expression nach bisherigem Kenntnisstand durch das Agr-System über AgrA kontrolliert wird (Queck *et al.*, 2008). Möglicherweise könnte auch der stark reprimierte TCA-Zyklus als Folge der Deletion von *ccpE* eine Auswirkung in diesem Zusammenhang haben. Zumindest wurde bei den zuvor genannten Beobachtungen von Chaffin *et al.* (2012) zum Zeitpunkt 6 Stunden neben der erhöhten Transkription von *psma* auch eine Derepression des TCA-Zyklus festgestellt. Festzuhalten bleibt dennoch, dass CcpE einen positiven Einfluss auf die Transkription des *psma* Operons zu haben scheint und damit sehr wahrscheinlich neben AgrA als weiterer positiver Regulator dieser wichtigen Virulenzfaktoren in *S. aureus* fungiert.

Die Ausbildung kapsulärer Polysaccharide verstärkt die Virulenz von *S. aureus* als Folge einer erhöhten Resistenz gegenüber der Phagozytose durch das Immunsystem des Wirts (O’Riordan & Lee, 2004; Dassy *et al.*, 1993). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Synthese kapsulärer Polysaccharide in *S. aureus* eng mit dem Metabolismus zusammenhängt (Majerczyk *et al.*, 2010; Sadykov *et al.*, 2010a) und dabei vorwiegend ab der exponentiellen Wachstumsphase zu beobachten ist (Sadykov *et al.*, 2010a; Dassy *et al.*, 1993). Dies zeigte sich auch bei den Transkriptionsanalysen des *cap* Operons in der vorliegenden Arbeit, wohingegen in der $\Delta ccpE$ Mutante eine deutlich reduzierte Transkription von *capA* zu beobachten war. Der in dieser Arbeit untersuchte *S. aureus* Stamm Newman bildet kapsuläre Polysaccharide vom Typ 5 (CP5). Bei den Untersuchungen eines Kooperationspartners zur Ausbildung einer Kapsel anhand indirekter Immunfluoreszenz mit monoklonalen Anti-CP5 Antikörpern zeigte sich, passend zu den transkriptionellen Daten, eine stark verminderte Kapselbildung als Folge der Deletion von *ccpE* (Christiane Wolz, Universität Tübingen, Tübingen; unveröffentlichte Resultate). Im Rahmen früherer Studien stellte sich bereits heraus, dass die Synthese kapsulärer Polysaccharide von der Aktivität des TCA-Zyklus beeinflusst wird. So resultierte, im Einklang mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit, ein inaktiver TCA-Zyklus in einem Verlust der Fähigkeit zur Kapselbildung von *S. aureus* (Sadykov *et al.*, 2010a). Auf der anderen Seite beobachteten Seidl *et al.* (2006) eine verstärkte Kapselbildung von *S. aureus* als Folge einer Derepression des TCA-Zyklus durch eine Deletion von *ccpA*. Sadykov *et al.* (2010a) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die Kapselbildung zur post-exponentiellen Wachstumsphase von der Versorgung mit Phosphoenolpyruvat über den TCA-Zyklus für die Gluconeogenese abhängig ist. Das gebildete Phosphoenolpyruvat kann in der Folge über die Gluconeogenese zu Fructose-6-phosphat verarbeitet werden, aus dem dann UDP-N-Acetylglucosamin synthetisiert wird. UDP-N-Acetylglucosamin ist die biosynthetische Vorstufe der kapsulären Polysaccharide. Während Fructose-6-phosphat in Anwesenheit von Glukose in der exponentiellen Phase in großen Mengen über die Glykolyse produziert wird, ist der beschriebene Weg über den TCA-Zyklus ab dem Beginn der post-exponentiellen Phase, zu der die Glukose aufgebraucht ist, somit essentiell für die Synthese von UDP-N-Acetylglucosamin, und damit für die Fähigkeit der Kapselbildung von *S. aureus*. Unter Berücksichtigung dieser Daten kann spekuliert werden, dass die Aktivierung des TCA-Zyklus zur post-

exponentiellen Wachstumsphase durch den in dieser Doktorarbeit neu identifizierten Regulator CcpE von hoher Bedeutung für die Kapselbildung von *S. aureus* sein könnte.

Zusammenfassend unterstützen die gewonnenen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit die Beobachtungen der vergangenen Jahre, dass der Metabolismus von *S. aureus* eng mit der Virulenz dieses wichtigen pathogenen Bakteriums verbunden ist. Mit CcpE konnte neben den bereits bekannten Regulatoren wie CcpA und CodY ein weiterer wichtiger Metabolismus- und Virulenz assoziierter Regulator identifiziert werden, was die Komplexität der Metabolismus- und Virulenzregulation in *S. aureus* unterstreicht. Unter nährstoffreichen Bedingungen spielt insbesondere der KKR-Hauptregulator CcpA eine tragende Rolle zur präferentiellen Aufnahme von Glukose, und alternative Stoffwechselwege wie der TCA-Zyklus sind stark reprimiert (Seidl *et al.*, 2009; rezensiert in Somerville & Proctor, 2009). Wenn das Glukoseangebot zurückgeht und wachstumslimitierend für *S. aureus* wird, kommt es nach derzeitigem Kenntnisstand zur Derepression des TCA-Zyklus, über den in der Folge alternative Kohlenstoffquellen zur Gewinnung von Energie, Redoxpotential und biosynthetischen Zwischenprodukten für das weitere Wachstum verstoffwechselt werden. Die Daten dieser Arbeit lassen nun vermuten, dass es neben der Derepression des TCA-Zyklus darüber hinaus mit CcpE eines positiven Regulators bedarf, welcher zur Aktivierung dieses Stoffwechselweges über eine direkte Kontrolle der Transkription von *citB* führt. Damit hat CcpE eine wichtige Funktion in der Aktivierung des TCA-Zyklus und somit auch einen Einfluss auf die Virulenz von *S. aureus*, da neben dieser Arbeit bereits in zahlreichen Studien ein Zusammenhang zwischen der TCA-Zyklus Aktivität und der Virulenz dieses Pathogen nachgewiesen werden konnte (Sadykov *et al.*, 2010a; Zhu *et al.*, 2009; Seidl *et al.*, 2009; Seidl *et al.*, 2008a; Somerville *et al.*, 2002). Zudem konnte in dieser Arbeit auch eine direkte Verbindung von CcpE zur Virulenzfaktorregulation nachgewiesen werden, indem CcpE scheinbar als direkter Repressor der Transkription von *hla* fungiert.

Da der TCA-Zyklus unter nährstoffreichen Bedingungen stark reprimiert ist, gewinnt die CcpE-abhängige Aktivierung dieses Stoffwechselweges insbesondere unter nährstoffarmen Bedingungen an Bedeutung. Somit lässt sich sagen, dass CcpE unter nährstoffarmen Bedingungen, während denen Kohlenstoffquellen wie Aminosäuren die Hauptnahrungsquelle für dieses Pathogen darstellen, für das

Überleben und die weitere Vermehrung von *S. aureus* eine bedeutende Rolle spielt. In Hinblick auf die *in vivo* Relevanz dieser Beobachtungen scheint für *S. aureus* im menschlichen Körper zwar vielerorts ausreichend Glukose vorhanden zu sein, jedoch gibt es auch glukosearme Umgebungen wie die Epithelien von Nase, Lunge und Haut. So zeigte sich in einer Studie von Philips *et al.* (2003), dass in den Nasensekreten von Menschen mit einem gesunden Nasenepithel keine Glukose nachweisbar ist. Garnett *et al.* (2012) berichteten in ihrem Review, dass die Glukosekonzentration des nasalen „Airway Surface Liquid“ (ASL) sowie der tieferen Atemwege und der Lunge 3-30 mal geringer als im Blutplasma ist. Die Autoren postulierten, dass eine Aufrechterhaltung einer solch nährstoffarmen Umgebung dem Wirt dabei hilft, das Wachstum pathogener Organismen zu begrenzen. Somit ist *S. aureus* auf die Verstoffwechslung von alternativen Kohlenstoffquellen angewiesen, wobei der TCA-Zyklus eine sehr wichtige Rolle spielt. Passend dazu zeigte sich im Rahmen eines Maus-Pneumoniemodells (Chaffin *et al.*, 2012), dass *in vivo* bei *S. aureus* zunächst eine Repression der Gluconeogenese und des TCA-Zyklus zu beobachten war, wohingegen die Glykolyse zur Aufnahme der initial verfügbaren Zucker hochreguliert war. Mit fortlaufender Pathogenese, zum Zeitpunkt 6 Stunden, konnte jedoch eine erhöhte Transkription von Genen des TCA-Zyklus (darunter *citZ* und *citB*) beobachtet werden. Diese Beobachtungen lassen somit, im Einklang mit dem bekannten Verhalten unter *in vitro* Bedingungen, auch *in vivo* eine nötige Umschaltung vom initialen Wachstum über Zucker auf die Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffquellen schließen, zumindest in Hinblick auf das Wachstum in glukosearmer Umgebung wie der Lunge. Bei diesem komplexen Mechanismus der Umstellung des Stoffwechsels in Richtung der Aufnahme alternativer Kohlenstoffquellen könnte CcpE ein wichtiger Bestandteil für die Aktivierung des TCA-Zyklus sein. Dabei hat CcpE auch einen Einfluss auf das sich ändernde Virulenzmuster, insbesondere ab dem Zeitpunkt der metabolischen Umstellung. Die Erkenntnisse dieser Arbeit erweitern somit das Verständnis der wichtigen Verknüpfung von Metabolismus und Virulenz, was für eine erfolgreiche Bekämpfung dieses bedeutenden humanpathogenen Bakteriums eine wichtige Voraussetzung ist.

5.4 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Reihe neuer Erkenntnisse zur KKR in Staphylokokken gewonnen werden, die weitere wichtige Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen ergeben:

Die Phosphorylierung von CcpA mittels Serin/Threonin Proteinkinase Stk1 konnte als neuartiger Mechanismus neben der bekannten Komplexbildung mit HPr-Ser46-P zur Modulation der regulatorischen Aktivität von CcpA in *S. aureus* identifiziert werden. In zukünftigen Studien sollte nun weitergehend untersucht werden, unter welchen Bedingungen und in welchem Umfang CcpA auf diese Weise phosphoryliert wird, wie eine derartige Phosphorylierung die Expression der übrigen bekannten CcpA-regulierten Gene beeinflusst und welche Stimuli zu einer Stk1-vermittelten Phosphorylierung von CcpA führen.

Die Glukoseimpuls-Studien von Seidl *et al.* (2009) weisen darauf hin, dass CcpA in *S. aureus* auch in Abwesenheit von Glukose einen Teil seines Regulons moduliert. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse zu untersuchen, ob - und wenn ja - welche Gene unabhängig der beschriebenen Komplexbildung mit HPr-Ser46-P durch CcpA reguliert werden können und ob die Stk1-vermittelte Phosphorylierung in diesen Prozess involviert ist. Diese Frage ließe sich unter anderem mittels einer Deletion von *ptsH* (kodiert für HPr) untersuchen.

Mit CcpE wurde ein neuer transkriptioneller Regulator der Aktivität des TCA-Zyklus und von Virulenzfaktoren in *S. aureus* identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nicht geklärt werden, welche Co-Faktoren und/oder metabolischen Faktoren die DNA-Bindeaktivität von CcpE beeinflussen. Weiterführend zu den bereits gelaufenen ersten Untersuchungen in diesem Zusammenhang gilt es dies in zukünftigen Studien herauszufinden. Darüber hinaus ist auch die DNA-Bindestelle von CcpE bisher noch unbekannt. Dieser Frage könnte anhand von „DNase Footprinting Assays“ oder ChIP-Seq Analysen nachgegangen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Transkription der Virulenzfaktoren RNAlII, *hla*, *capA* und *psmA* durch CcpE beeinflusst wird. Für *capA* wurde der Befund der reduzierten Transkription in Untersuchungen eines Kooperationspartners zur Ausbildung einer Kapsel anhand indirekter Immunfluoreszenz phänotypisch bestätigt. Hier wäre es nun interessant, mittels Phagozytose-Test zu untersuchen, ob

und in welchem Umfang dies letztlich zu einer Veränderung in der Intensität der Phagozytose von *S. aureus* durch Monozyten bzw. Granulozyten führt. Darüber hinaus lassen die Transkriptionsdaten zu RNAIII und *hla* vermuten, dass die Aktivität von CcpE zu einer Virulenz-Attenuierung von *S. aureus* führt. Dieser Frage sollte insbesondere anhand verschiedener *in vivo* Modelle weiter nachgegangen werden. Erste Untersuchungen dazu sind bereits gelaufen, wobei sich in einem Lungen-Infektionsmodell und einem subkutanen Fußballen-Infektionsmodell in der Maus eine erhöhte Infektiosität von *S. aureus* als Folge der Deletion von *ccpE* zeigte.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten beziehen sich auf den *S. aureus* Stamm Newman. Um nachzuweisen, inwieweit die beobachteten Effekte speziesweit gelten, müssen weitere Stämme von *S. aureus* untersucht werden. In *S. aureus* Stamm SA113 zeigte sich jedoch bereits ein vergleichbarer Effekt auf das Wachstum und die Aktivität der Aconitase. Vor allem in Hinblick auf die Virulenz wären Untersuchungen in hochvirulenten *S. aureus* Stämmen wie USA300 Derivate noch besonders interessant.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Untersuchung von möglichen Wechselwirkungen und Zusammenhängen in der Genregulation mit dem globalen KKR-Regulator CcpA anhand einer *ccpA-ccpE* Doppelmutante. Eine derartige Doppelmutante konnte in Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits erstellt, jedoch nicht mehr umfassend charakterisiert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Abranches J, Nascimento MM, Zeng L, Browngardt CM, Wen ZT, Rivera MF, Burne RA (2008) CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 190:2340-2349
2. Antunes A, Martin-Verstraete I, Dupuy B (2011) CcpA-mediated repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression. Mol Microbiol 79:882-899
3. Archer GL (1998) *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. Clin Infect Dis 26:1179-1181
4. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW (2012) Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials 33:5967-5982
5. Bayer MG, Heinrichs JH, Cheung AL (1996) The Molecular Architecture of the *sar* Locus in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 178:4563-4570
6. Benoit MR, Conant CG, Ionescu-Zanetti C, Schwartz M, Martin A (2010) New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. Appl Environ Microbiol 76:4136-4142
7. Berger-Bächi B, Rohrer S (2002) Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Arch Microbiol 178:165-171
8. Bischoff M, Dunman P, Kormanec J, Macapagal D, Murphy E, Mounts W, Berger-Bächi B, Projan S (2004) Microarray-Based Analysis of the *Staphylococcus aureus* σ^B Regulon. J Bacteriol 186:4085-4099
9. Boles BR, Horswill AR (2011) Staphylococcal biofilm disassembly. Trends Microbiol 19:449-455

10. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
11. Bronner S, Monteil H, Prévost G (2004) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* 28:183-200
12. Cedergren L, Andersson R, Jansson B, Uhlén M, Nilsson B (1993) Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. *Protein Eng* 6:441-448
13. Chaffin DO, Taylor D, Skerrett SJ, Rubens CE (2012) Changes in the *Staphylococcus aureus* transcriptome during early adaptation to the lung. *PLoS One*. 7:e41329
14. Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP (2004) Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70:6076-6085
15. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium. *Thromb Haemost* 94:278-285
16. Chavakis T, Preissner KT, Herrmann M (2007) The anti-inflammatory activities of *Staphylococcus aureus*. *Trends Immunol* 28:408-418
17. Chaves F, García-Alvarez M, Sanz F, Alba C, Otero JR (2005) Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 43:4877-4879
18. Cheung AL, Bayer MG, Heinrichs JH (1997) *sar* genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAPIII in the *agr* locus of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 179:3963–3971

19. Cheung AL, Bayer AS, Zhang G, Gresham H, Xiong YQ (2004) Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol 40:1-9
20. Chiang C, Bongiorni C, Perego M (2011) Glucose-Dependent Activation of *Bacillus anthracis* Toxin Gene Expression and Virulence Requires the Carbon Catabolite Protein CcpA. J Bacteriol 193:52-62
21. Cluzel ME, Zanella-Cléon I, Cozzzone AJ, Fütterer K, Duclos B, Molle V (2010) The *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 synthase LuxS is regulated by Ser/Thr phosphorylation. J Bacteriol 192:6295-6301
22. Cue D, Lei MG, Lee CY (2012) Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. Front Cell Infect Microbiol 2:38
23. Dassy B, Hogan T, Foster TJ, Fournier JM (1993) Involvement of the accessory gene regulator (*agr*) in expression of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. J Gen Microbiol 139:1301-1306
24. Deora R, Misra TK (1996) Characterization of the primary σ factor of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 271:21828-21834
25. Deutscher J, Francke C, Postma PW (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 70:939-1031
26. Deutscher J (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. Curr Opin Microbiol 11:87-93
27. Didier JP, Cozzzone AJ, Duclos B (2010) Phosphorylation of the virulence regulator SarA modulates its ability to bind DNA in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 306:30-36

28. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M, SENTRY Participants Group (2001) Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 32:114-132
29. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 13:16-34
30. Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, Bartscht K, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D (2003) Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. J Bacteriol 185:2879-2886
31. Donat S, Streker K, Schirmeister T, Rakette S, Stehle T, Liebeke M, Lalk M, Ohlsen K (2009) Transcriptome and functional analysis of the eukaryotic-type serine/threonine kinase PknB in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 191:4056-4069
32. Duthie ES (1952) Variation in the antigenic composition of staphylococcal coagulase. J Gen Microbiol 7:320-326
33. Egeter O, Brückner R (1996) Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. Mol Microbiol 21:739-749
34. Fitzgerald JR, Loughman A, Keane F, Brennan M, Knobel M, Higgins J, Visai L, Speziale P, Cox D, Foster TJ (2006) Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcγRIIIa receptor. Mol Microbiol 59:212-230

35. Fluckiger U, Wolz C, Cheung AL (1998) Characterization of a *sar* Homolog of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 66:2871-2878
36. Fournier B, Hooper DC (2000) A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182:3955-3964
37. Fournier B, Philpott DJ (2005) Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 18:521-540
38. Fraser JD, Proft T (2008) The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev* 225:226-243
39. Fouet A, Sonenshein AL (1990) A target for carbon source-dependent negative regulation of the *citB* promoter of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 172:835-844
40. Fujita Y (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:245-259
41. García P, Benítez R, Lam M, Salinas AM, Wirth H, Espinoza C, Garay T, Depix MS, Labarca J, Guzmán AM (2004) Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia. *J Med Microbiol* 53:67-72
42. Gao P, Pinkston KL, Bourgoigne A, Cruz MR, Garsin DA, Murray BE, Harvey BR (2013) Library screen identifies *Enterococcus faecalis* CcpA, the catabolite control protein A, as an effector of Ace, a collagen adhesion protein linked to virulence. *J Bacteriol* 195:4761-4768
43. Garnett JP, Baker EH, Baines DL (2012) Sweet talk: insights into the nature and importance of glucose transport in lung epithelium. *Eur Respir J* 40:1269-1276
44. Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, Behnke M, Daschner F, Rüdén H (2005) Mortality risk factors with nosocomial *Staphylococcus aureus* infections in

- intensive care units: results from the German Nosocomial Infection Surveillance System (KISS). *Infection* 33:50-55
45. Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F, Etienne J, Lina G, Vallette FM, Vandenesch F, Genestier L (2005) *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* 115:3117-3127
 46. Giachino P, Engelmann S, Bischoff M (2001) σ^B activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183:1843-1852
 47. Görke B, Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 6:613-624
 48. Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A, Prince A (2004) *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med* 10:842-848
 49. Gordon RJ, Lowy FD (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 46:350–359
 50. Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A (2001) Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun* 69:3423-3426
 51. Gupta RK, Alba J, Xiong YQ, Bayer AS, Lee CY (2013) MgrA activates expression of capsule genes, but not the α -toxin gene in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J Infect Dis* 208:1841-1848
 52. Hagggar A, Hussain M, Lönnies H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI (2003) Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun* 71:2310-2317

53. Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, Foster TJ, Peters G, Kehrel BE, Herrmann M (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96:2149-2156
54. Hartmann T, Zhang B, Baronian G, Schulthess B, Homerova D, Grubmuller S, Kutzner E, Gaupp R, Bertram R, Powers R, Eisenreich W, Kormanec J, Herrmann M, Molle V, Somerville GA, Bischoff M (2013) Catabolite control protein E (CcpE) is a LysR-type transcriptional regulator of TCA cycle activity in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 288:36116-36128
55. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 24:1013-1024
56. Heying R, van de Gevel J, Que YA, Moreillon P, Beekhuizen H (2007) Fibronectin-binding proteins and clumping factor A in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: FnBPA is sufficient to activate human endothelial cells. *Thromb Haemost* 97:617-626
57. Higgins J, Loughman A, van Kessel KP, van Strijp JA, Foster TJ (2006) Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS Microbiol Lett* 258:290-296
58. Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M (2001) Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol* 183:6778-6786
59. Hussain M, Haggar A, Peters G, Chhatwal GS, Herrmann M, Flock JI, Sinha B (2008) More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect Immun* 76:5615-5623

60. Iordanescu S, Surdeanu M (1976) Two restriction and modification systems in *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *J Gen Microbiol* 96:277-281
61. Johnson M, Cockayne A, Morrissey JA (2008) Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires *ica* and the secreted protein Emp. *Infect Immun* 76:1756-1765
62. Jourlin-Castelli C, Mani N, Nakano MM, Sonenshein AL (2000) CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 295:865-878
63. Kennedy MC, Emptage MH, Dreyer JL, Beinert H (1983) The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *J Biol Chem* 258:11098-11105
64. Kies S, Otto M, Vuong C, Götz F (2001) Identification of the *sigB* operon in *Staphylococcus epidermidis*: construction and characterization of a *sigB* deletion mutant. *Infect Immun* 69:7933-7936
65. Kim HJ, Jourlin-Castelli C, Kim SI, Sonenshein AL (2002) Regulation of the *Bacillus subtilis* *ccpC* gene by CcpA and CcpC. *Mol Microbiol* 43:399-410
66. Kim HJ, Kim SI, Ratnayake-Lecamwasam M, Tachikawa K, Sonenshein AL, Strauch M (2003) Complex regulation of the *Bacillus subtilis* aconitase gene. *J Bacteriol* 185:1672-1680
67. Kim HJ, Mittal M, Sonenshein AL (2006) CcpC-dependent regulation of *citB* and *Imo0847* in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 188:179-190
68. Kinkel TL, McIver KS (2008) CcpA-mediated repression of streptolysin S expression and virulence in the group A Streptococcus. *Infect Immun* 76:3451-3463
69. Kloos WE, Bannerman TL (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 7:117-140

70. Kovács M, Halfmann A, Fedtke I, Heintz M, Peschel A, Vollmer W, Hakenbeck R, Brückner R (2006) A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 188:5797-5805
71. Kreiswirth BN, Löfdahl S, Betley MJ, O'Reilly M, Schlievert PM, Bergdoll MS, Novick RP (1983) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305:709-712
72. Kullik II, Giachino P (1997) The alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus*: regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. *Arch Microbiol* 167:151-159
73. Leiba J, Hartmann T, Cluzel ME, Cohen-Gonsaud M, Delolme F, Bischoff M, Molle V (2012) A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation. *J Biol Chem* 287:43607-43619
74. Leibig M, Krismer B, Kolb M, Friede A, Götz F, Bertram R (2008) Marker removal in staphylococci via Cre recombinase and different lox sites. *Appl Environ Microbiol* 74:1316-1323
75. Li C, Sun F, Cho H, Yelavarthi V, Sohn C, He C, Schneewind O, Bae T (2010) CcpA mediates proline auxotrophy and is required for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *J Bacteriol* 192:3882-3892
76. Liang X, Hall JW, Yang J, Yan M, Doll K, Bey R, Ji Y (2011) Identification of single nucleotide polymorphisms associated with hyperproduction of alpha-toxin in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 6:e18428

77. Lorca GL, Chung YJ, Barabote RD, Weyler W, Schilling CH, Saier MH Jr (2005) Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK. *J Bacteriol* 187:7826-7839
78. Lou Q, Zhu T, Hu J, Ben H, Yang J, Yu F, Liu J, Wu Y, Fischer A, Francois P, Schrenzel J, Qu D (2011) Role of the SaeRS two-component regulatory system in *Staphylococcus epidermidis* autolysis and biofilm formation. *BMC Microbiol* 11:146
79. Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-532
80. Mack D, Siemssen N, Laufs R (1992) Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun* 60:2048-2057
81. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 178:175-183
82. Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA, Knobloch JK (2006) Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* 29:343-359
83. Maddocks SE, Oyston PC (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154:3609-3623
84. Majerczyk CD, Sadykov MR, Luong TT, Lee C, Somerville GA, Sonenshein AL (2008) *Staphylococcus aureus* CodY negatively regulates virulence gene expression. *J Bacteriol* 190:2257-2265

85. Majerczyk CD, Dunman PM, Luong TT, Lee CY, Sadykov MR, Somerville GA, Bodi K, Sonenshein AL (2010) Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 192:2861-2877
86. Marmur, J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 3:202-218
87. Mendez M, Huang IH, Ohtani K, Grau R, Shimizu T, Sarker MR (2008) Carbon catabolite repression of type IV pilus-dependent gliding motility in the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 190:48-60
88. Mittal M, Picossi S, Sonenshein AL (2009) CcpC-dependent regulation of citrate synthase gene expression in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 191:862-872
89. Mittal M, Pechter KB, Picossi S, Kim HJ, Kerstein KO, Sonenshein AL (2013) Dual role of CcpC protein in regulation of aconitase gene expression in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 159:68-76
90. Molina-Manso D, del Prado G, Ortiz-Pérez A, Manrubia-Cobo M, Gómez-Barrena E, Cordero-Ampuero J, Esteban J (2013) In vitro susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. *Int J Antimicrob Agents* 41:521-523
91. Moreno MS, Schneider BL, Maile RR, Weyler W, Saier MH Jr (2001) Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol Microbiol* 39:1366-1381
92. Nguyen T, Ghebrehiwet B, Peerschke EI (2000) *Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infect Immun* 68:2061-2068
93. Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 48:1429-1449

94. O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ (2002) *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol* 4:759-770
95. Ohlsen K, Donat S (2010) The impact of serine/threonine phosphorylation in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 300:137-141
96. O'Riordan K, Lee JC (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 17:218-234
97. Otto M, Süssmuth R, Jung G, Götz F (1998) Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis agr* system. *FEBS Lett* 424:89-94
98. Otto M (2008) Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322:207-228
99. Otto M (2013) Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med* 64:175-188
100. Palma M, Haggar A, Flock JI (1999) Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* 181:2840-2845
101. Pané-Farré J, Jonas B, Förstner K, Engelmann S, Hecker M (2006) The σ^B regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int J Med Microbiol* 296:237-258
102. Periasamy S, Chatterjee SS, Cheung GY, Otto M (2012) Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for? *Commun Integr Biol* 5:275-277

103. Philips BJ, Meguer JX, Redman J, Baker EH (2003) Factors determining the appearance of glucose in upper and lower respiratory tract secretions. *Intensive Care Med* 29:2204-2210
104. Plata K, Rosato AE, Wegrzyn G (2009) *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol* 56:597-612
105. Pohl K, Francois P, Stenz L, Schlink F, Geiger T, Herbert S, Goerke C, Schrenzel J, Wolz C (2009) CodY in *Staphylococcus aureus*: a regulatory link between metabolism and virulence gene expression. *J Bacteriol* 191:2953-2963
106. Qazi SN, Counil E, Morrissey J, Rees CE, Cockayne A, Winzer K, Chan WC, Williams P, Hill PJ (2001) *agr* expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect Immun* 69:7074-7082
107. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach TH, Khan BA, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Li M, Otto M (2008) RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell* 32:150-158
108. Rao L, Karls RK, Betley MJ (1995) In vitro transcription of pathogenesis-related genes by purified RNA polymerase from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 177:2609-2614
109. Ravcheev DA, Li X, Latif H, Zengler K, Leyn SA, Korostelev YD, Kazakov AE, Novichkov PS, Osterman AL, Rodionov DA (2012) Transcriptional regulation of central carbon and energy metabolism in bacteria by redox-responsive repressor Rex. *J Bacteriol* 194:1145-1157
110. Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D (2010) Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol* 89:103-111

111. Rossi J, Bischoff M, Wada A, Berger-Bächi B (2003) MsrR, a putative cell envelope-associated element involved in *Staphylococcus aureus sarA* attenuation. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2558-2564
112. Sadykov MR, Olson ME, Halouska S, Zhu Y, Fey PD, Powers R, Somerville GA (2008) Tricarboxylic acid cycle-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J Bacteriol* 190:7621-7632
113. Sadykov MR, Mattes TA, Luong TT, Zhu Y, Day SR, Sifri CD, Lee CY, Somerville GA (2010a) Tricarboxylic acid cycle-dependent synthesis of *Staphylococcus aureus* Type 5 and 8 capsular polysaccharides. *J Bacteriol* 192:1459-1462
114. Sadykov MR, Zhang B, Halouska S, Nelson JL, Kreimer LW, Zhu Y, Powers R, Somerville GA (2010b) Using NMR metabolomics to investigate tricarboxylic acid cycle-dependent signal transduction in *Staphylococcus epidermidis*. *J Biol Chem* 285:36616-36624
115. Sadykov MR, Hartmann T, Mattes TA, Hiatt M, Jann NJ, Zhu Y, Ledala N, Landmann R, Herrmann M, Rohde H, Bischoff M, Somerville GA (2011) CcpA coordinates central metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 157:3458-3468
116. Seidl K, Stucki M, Ruegg M, Goerke C, Wolz C, Harris L, Berger-Bächi B, Bischoff M (2006) *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1183-1194
117. Seidl K, Goerke C, Wolz C, Mack D, Berger-Bächi B, Bischoff M (2008a) *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect Immun* 76:2044-2050

118. Seidl K, Bischoff M, Berger-Bächli B (2008b) CcpA mediates the catabolite repression of *tst* in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 76:5093-5099
119. Seidl K, Müller S, François P, Kriebitzsch C, Schrenzel J, Engelmann S, Bischoff M, Berger-Bächli B (2009) Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 9:95
120. Senn MM, Giachino P, Homerova D, Steinhuber A, Strassner J, Kormanec J, Flückiger U, Berger-Bächli B, Bischoff M (2005) Molecular analysis and organization of the σ^B operon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187:8006-8019
121. Sinha B, Fraunholz M (2010) *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol* 300:170-175
122. Somerville GA, Chaussee MS, Morgan CI, Fitzgerald JR, Dorward DW, Reitzer LJ, Musser JM (2002) *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival. *Infect Immun* 70:6373-6382
123. Somerville GA, Saïd-Salim B, Wickman JM, Raffel SJ, Kreiswirth BN, Musser JM (2003) Correlation of acetate catabolism and growth yield in *Staphylococcus aureus*: implications for host-pathogen interactions. *Infect Immun* 71:4724-4732
124. Somerville GA, Proctor RA (2009) At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:233-248
125. Sonenshein AL (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 5:917-927
126. Strasters KC, Winkler KC (1963) Carbohydrate metabolism of *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 33:213-229

127. Sun F, Ding Y, Ji Q, Liang Z, Deng X, Wong CC, Yi C, Zhang L, Xie S, Alvarez S, Hicks LM, Luo C, Jiang H, Lan L, He C (2012) Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:15461-15466
128. Tajima A, Iwase T, Shinji H, Seki K, Mizunoe Y (2009) Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infect Immun* 77:327-334
129. Tamber S, Schwartzman J, Cheung AL (2010) Role of PknB kinase in antibiotic resistance and virulence in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300. *Infect Immun* 78:3637-3646
130. Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR (2011) Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev* 111:117-151
131. Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G (2007) Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy* 93:24-41
132. Truong-Bolduc QC, Hooper DC (2010) Phosphorylation of MgrA and its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 192:2525-2534
133. Tsompanidou E, Denham EL, Becher D, de Jong A, Buist G, van Oosten M, Manson WL, Back JW, van Dijl JM, Dreisbach A (2013a) Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 79:886-895
134. Tsompanidou E, Denham EL, van Dijl JM (2013b) Phenol-soluble modulins, hellhounds from the staphylococcal virulence-factor pandemonium. *Trends Microbiol* 21:313-315

135. Valihrach L, Demnerova K (2012) Impact of normalization method on experimental outcome using RT-qPCR in *Staphylococcus aureus*. J Microbiol Methods 90:214-216
136. Vuong C, Kidder JB, Jacobson ER, Otto M, Proctor RA, Somerville GA (2005) *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress. J Bacteriol 187:2967-2973
137. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis 5:751-762
138. Wu Y, Wang J, Xu T, Liu J, Yu W, Lou Q, Zhu T, He N, Ben H, Hu J, Götz F, Qu D (2012) The two-component signal transduction system ArlRS regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation in an *ica*-dependent manner. PLoS One 7:e40041
139. Xiong YQ, Van Wamel W, Nast CC, Yeaman MR, Cheung AL, Bayer AS (2002) Activation and transcriptional interaction between *agr* RNAII and RNAPIII in *Staphylococcus aureus* in vitro and in an experimental endocarditis model. J Infect Dis 186:668-677
140. Zhu Y, Xiong YQ, Sadykov MR, Fey PD, Lei MG, Lee CY, Bayer AS, Somerville GA (2009) Tricarboxylic acid cycle-dependent attenuation of *Staphylococcus aureus* in vivo virulence by selective inhibition of amino acid transport. Infect Immun 77:4256-4264
141. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A (2010) A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. New Microbiol 33:137-145

7 Publikationen / Kongressbeiträge

Publikationen in "peer-reviewed" Journalen:

- Sadykov MR*, Hartmann T*, Mattes TA, Hiatt M, Jann NJ, Zhu Y, Ledala N, Landmann R, Herrmann M, Rohde H, Bischoff M, Somerville GA (2011) CcpA coordinates central metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 157:3458-3468
* geteilte Erstautorenschaft
- Leiba J, Hartmann T, Cluzel ME, Cohen-Gonsaud M, Delolme F, Bischoff M, Molle V (2012) A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation. *J Biol Chem* 287:43607-43619
- Hartmann T, Zhang B, Baronian G, Schulthess B, Homerova D, Grubmuller S, Kutzner E, Gaupp R, Bertram R, Powers R, Eisenreich W, Kormanec J, Herrmann M, Molle V, Somerville GA, Bischoff M (2013) Catabolite control protein E (CcpE) is a LysR-type transcriptional regulator of TCA cycle activity in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 288:36116-36128

Kongressbeiträge (Publizierte Abstracts und Posterpräsentationen):

- Hartmann T, Bertram R, Herrmann M, Bischoff M. SACOL0731, a putative catabolite control protein C (CcpC) homolog of *Staphylococcus aureus*. 3. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hannover, 28.-31. März 2010. *Biospektrum Abstractband*, S. 220

- Hartmann T, Bertram R, Herrmann M, Bischoff M. SACOL0731, a putative catabolite control protein C (CcpC) homologue of *Staphylococcus aureus*. 14th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI), Bath, UK, 06.-09. September 2010. Abstract, S. 165
- Hartmann T, Schulthess B, Nippe N, Bertram R, Grubmüller S, Goerke C, Somerville GA, Wolz C, Eisenreich W, Herrmann M, Bischoff M. CcpE (NWMN_0641), a new regulatory link between central carbon metabolism and virulence determinant production in *Staphylococcus aureus*. Gordon Research Conference on Staphylococcal Diseases, Il Ciocco, Italien, 24.-29. Juli 2011
- Hartmann T, Herrmann M, Bischoff M, Varga G, Nippe N, Schulthess B, Görke C, Wolz C. NWMN_0641, a putative LysR-type regulator that affects virulence determinant production in *Staphylococcus aureus*. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Essen, 25.-28. September 2011. International Journal of Medical Microbiology 301, S. 72
- Hartmann T, Zhang B, Gaupp R, Grubmüller S, Kutzner E, Baronian G, Bertram R, Powers R, Eisenreich W, Herrmann M, Molle V, Somerville GA, Bischoff M. Metabolomics of CcpE-dependent activation of TCA cycle in *S. aureus*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) zusammen mit der Koninklijke Nederlandse Vereniging voor Microbiologie (KNVM), Bremen, 10.-13. März 2013. Biospektrum Tagungsband, S. 254
- Hartmann T, Gaupp R, Baronian G, Voss M, Nippe N, Zhang B, Kutzner E, Powers R, Somerville GA, Eisenreich W, Beisswenger C, Molle V, Herrmann M, Bischoff M. CcpE, a further regulatory link between carbon metabolism and virulence in *Staphylococcus aureus*. Gordon Research Conference on Staphylococcal Diseases, Waterville, USA, 28. Juli-02. August 2013

8 Danksagung

Prof. Dr. Mathias Herrmann danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und motivierende Unterstützung, sowie die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am Institut.

Herzlich danken möchte ich besonders PD Dr. Markus Bischoff für die Betreuung dieser Arbeit, die stete Diskussionsbereitschaft sowie hilfreichen Ratschläge und Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Univ.-Prof. Dr. Carola Meier möchte ich für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens der Arbeit danken.

Vielen Dank an alle Kooperationspartner für die Untersuchungen, Anregungen und Bereitstellung von Material und Bakterienstämmen, welche einen wertvollen Beitrag zu den Erkenntnissen dieser Arbeit geleistet haben.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Greg Somerville und seinem Arbeitskreis für die Einladung zu einem unvergesslichen und erfolgreichen Forschungsaufenthalt in seinem Labor, die vielen Ratschläge und Ideen, sowie das große Interesse an meiner Arbeit.

Herzlich danken möchte ich auch allen Mitarbeitern, insbesondere Karin Hilgert, des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft, sowie für die vielen schönen Stunden außerhalb des Labors.

Besonderer Dank gilt Katharina für die stete Unterstützung im und außerhalb vom Labor, die Motivation und das Verständnis während dieser Zeit.

Zum Schluss möchte ich noch meinen Freunden und meiner Familie für die moralische Unterstützung, sowie die Ruhe und Sicherheit danken, welche Ihr mir in diesen Jahren gegeben habt.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Hartmann, Torsten
Geburtsdatum /-ort: 08.05.1981 in Hannover
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

Promotion

seit 02/2009 Promotion an der Universität des Saarlandes,
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Studium

10/2005 – 10/2008 Studium der Gartenbauwissenschaften an der
Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Master of Science (M. Sc.)

10/2002 – 09/2005 Studium der Gartenbauwissenschaften an der
Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Bachelor of Science (B. Sc.)

Schulbildung

06/2001 Abitur, Gymnasium Ernestinum Rinteln