

Aus dem Institut
für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Institute für Infektionsmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Sören Becker

**Die Bedeutung des Histidin-haltigen Phosphatträger-Proteins für die Virulenz
und die Pathogenität von *Staphylococcus aureus***

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2021

vorgelegt von: Anne Christine Brausch

geboren am: 08.07.1992 in Merzig

Meinen Eltern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	10
1 Zusammenfassung	11
1.1 Deutsche Fassung.....	11
1.2 Summary	13
2 Einleitung	15
2.1 Virulenzfaktoren und klinische Bedeutung von <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.1.1 Eiter und Abszessbildung.....	18
2.1.2 Infektiöse Endokarditis	20
2.1.3 Osteomyelitis.....	21
2.1.4 Bakteriämie	22
2.1.5 Toxinbedingte Erkrankungen.....	22
2.2 Regulation der Virulenzfaktoren.....	24
2.3 Grundlagen des Kohlenstoffwechsels von <i>S. aureus</i>	26
2.3.1 Die Kohlenstoff-Katabolit-Repression.....	28
2.3.2 Die Rolle von <i>ptsH</i> in der CCR.....	29
2.4 Zusammenhang zwischen Virulenz und Stoffwechsel	31
2.5 Mäuse als Modellorganismen	33
2.6 Ziele dieser Arbeit.....	35
2.7 Fragestellung	36
3 Material und Methoden	37
3.1 Materialien	37
3.1.1 Bakterienstämme.....	37
3.1.2 Geräte	38
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	39
3.1.4 Computersoftware.....	43
3.2 Methoden.....	44
3.2.1 Physiologische Untersuchungen	44

3.2.2	Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung der Transkription mittels RT- qPCR.....	45
3.2.3	Murines Abszessmodell	49
3.2.4	Statistik.....	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Inaktivierung von <i>ptsH</i> bzw. <i>ccpA</i> verändert den Wachstums- und pH-Verlauf.....	57
4.2	Der Kohlenstoffmetabolismus ist durch HPr stark beeinträchtigt	61
4.3	Einfluss von <i>ptsH</i> auf die metabolischen Gene <i>citB</i> und <i>pckA</i>	67
4.4	Einfluss von <i>ptsH</i> auf die Virulenzgene <i>RNAIII</i> , <i>hla</i> und <i>spa</i>	69
4.5	Die <i>ptsH</i> Mutante zeigt einen abgeschwächten Infektionsverlauf im Abszessmodell	71
5	Diskussion	75
5.1	Veränderungen im HPr Protein beeinflussen den Glukosemetabolismus und das Wachstumsverhalten in <i>S. aureus</i>	75
5.2	HPr beeinflusst den TCA-Zyklus in <i>S. aureus</i>	78
5.2.1	HPr beeinflusst die Transkription der metabolischen Gene <i>citB</i> und <i>pckA</i>	79
5.2.2	HPr beeinflusst den Aminosäurestoffwechsel in <i>S. aureus</i>	80
5.3	HPr beeinflusst den Metabolismus in <i>S. aureus</i> und dadurch die Virulenz.....	81
5.3.1	Einfluss von HPr auf die Transkription wichtiger Virulenzfaktoren	81
5.3.2	Attenuierte Virulenz von <i>S. aureus</i> in einem murinen Abszessmodell nach Deletion von <i>ptsH</i>	82
6	Zusammenfassung	85
7	Literaturverzeichnis	86
8	Publikationen/Danksagung	95
8.1	Publikationen.....	95
8.2	Danksagung.....	96
9	Lebenslauf	97

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
%	Prozent
Abb.	Abbildung
Acetyl CoA	Acetyl Coenzym A
<i>agr</i>	Accessory gene regulator
AIDS	Erworbenes Immun-Defizienz-Syndrom
AIP	Autoinduzierendes Peptid (autoinducing peptide)
ATP	Adenosintriphosphat
BCAA	Verzweigt-kettige Aminosäuren (branched chain amino acids)
Bzw.	Beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
<i>capA</i>	Protein zur Kapselpolysaccharide Biosynthese (Capsular polysaccharide biosynthesis protein)
CcpA	Katabolit-Kontrollprotein A (catabolite control protein A)
CcpE	Katabolit-Kontrollprotein E (catabolite control protein E)
CCR	Kohlenstoffkatabolitenrepression (carbon catabolite repression)
<i>citB</i>	Gen kodierend für das Enzym Aconitase
<i>citZ</i>	Gen kodierend für das Enzym Citrat Synthase
ClfA	Clumping Faktor A (clumping factor A)
Coa	Koagulase (coagulase)
CoA	Coenzym A
CodY	GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor
<i>cre</i>	Catabolite responsive element
CWA	(cell wall anchored adhesins)
D.h.	Das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E1	Enzym 1
E2	Enzym 2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i>
Eap	Extracelluläres Adhärenzprotein (extracellular adherence protein)

FADH ₂	Flavinadenindinukleotid
Fc	Fragment, crystallizable
FnBP	Fibronektinbindeproteine (fibronectin-binding protein)
G	Gauge
g	Gramm
GC	Guanin/Cytosin
GTP	Guanosintriphosphat
His	Histidin
H ₂ O _{mill}	hochreines Wasser (Milli-Q Synthesis A10 System)
<i>hla</i>	Alpha-Hämolysin
HK	Hauptkultur
HPr	Histidin-haltiges Phosphatträger-Protein (Histidine-containing phosphocarrier protein)
HPrK/P	HPr Kinase/Phosphorylase
<i>ica</i>	Intercellular adhesion locus
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IE	Infektiöse Endokarditis
IgG, E	Immunglobulin G, E
IL	Interleukin
INF Gamma	Interferon Gamma
IsdA	Iron-regulated surface determinant protein A
IsdB	Iron-regulated surface determinant protein B
IsdC	Iron-regulated surface determinant protein C
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LacI/GaIR	Lactose operon repressor/galactose repressor
LysR	Transcriptional activator protein LysR
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
mg/ml	Milligramm/Milliliter
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mM	Millimolar
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamadenindinukleotid

NH ₄ ⁺	Ammonium
ng	Nanogramm
Nm	Newman
NO	Stickstoff
OD	Optische Dichte
P2	Promotor 2
P3	Promotor 3
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
P-His-HPr	HPr Protein, phosphoryliert am Histidinrest
P-Ser-HPr	HPr Protein, phosphoryliert am Serinrest
<i>pckA</i>	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase A
PPP	Pentose-Phosphat-Weg
PML	Phenol-lösliche Moduline
PIA	Interzelluläres Polysaccharid Adhäsion (polysaccharide intracellular adhesin)
PTS	Phosphotransferasesystem
<i>ptsH</i>	HPr kodierendes Gen
<i>ptsI</i>	Gen kodierend für Enzym 1
PVL	Panton Valentine-Leukozydin
qRT-PCR	quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RNS	Ribonukleinsäure
Rot	Repressor of toxins
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SAC	Staphylococcal abscess community
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>sae</i>	<i>S. aureus</i> exoprotein expression Operon
<i>sar</i>	Staphylococcal accessory regulator
SCVs	Small colony variants
SEA	Staphylokokken Enterotoxin A (staphylococcal Enterotoxin A)
SEE	Staphylokokken Enterotoxin B (staphylococcal Enterotoxin E)
Ser	Serin
SERAM	Secretable expanded repertoire adhesive molecules
<i>sigB</i>	Sigma Faktor
<i>spa</i>	Protein A kodierendes Gen (staphylococcal protein A)
SSSS	Staphylococcal Scalded Skin Syndrome

TCA	Tricarbonsäurezyklus (citric acid cycle)
TNF α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TSST1	Toxisches Schock Syndrom Toxin 1
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrogenchlorid
ÜNK	Übernachtskultur
V	Volt
vWbp	Von Willebrand Faktor bindendes Protein
w/v	Weight/Volume
z.B	Zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines <i>Staphylococcus aureus</i> Zellverbands.	15
Abbildung 2: <i>Staphylococcus aureus</i> kann eine Vielfalt an Erkrankungen hervorrufen.....	16
Abbildung 3: Bakterieneigene Moleküle, die zur Abszess Entstehung beitragen.	18
Abbildung 4: Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Kohlenstoffwechsels von <i>S. aureus</i>	27
Abbildung 6: Die Interaktion zwischen dem Phosphotransferase System (PTS) und der Kohlenstoff-Katabolit Repression (CCR).	31
Abbildung 7: Retroorbitale Injektion.	51
Abbildung 8: Eröffneter Bauchsitus einer Maus.....	54
Abbildung 9: Auswirkungen von <i>ptsH</i> und <i>ccpA</i> auf Wachstum und pH-Verlauf von <i>S. aureus</i> TSB Kulturen.....	60
Abbildung 10: Auswirkungen von <i>ptsH</i> und <i>ccpA</i> auf den Glukoseverbrauch von <i>S. aureus</i> TSB Kulturen.....	62
Abbildung 11: Auswirkungen von <i>ptsH</i> und <i>ccpA</i> auf die Acetatproduktion von <i>S. aureus</i> TSB Kulturen.....	64
Abbildung 12: Auswirkungen von <i>ptsH</i> und <i>ccpA</i> auf die Ammoniumproduktion von <i>S. aureus</i> TSB Kulturen.....	66
Abbildung 13: Relative, quantitative Transkriptionsanalyse von <i>pckA</i> und <i>citB</i>	68
Abbildung 14: Relative, quantitative Transkriptionsanalyse von <i>RNAlIIII</i> , <i>hla</i> und <i>spa</i>	70
Abbildung 15: Die Deletion von <i>ptsH</i> und/oder <i>ccpA</i> bewirkt eine verminderte Bakterienlast in der Leber von <i>S. aureus</i> Newman in einem Maus-Abszessmodell.....	72
Abbildung 16: Die Deletion von <i>ptsH</i> und/oder <i>ccpA</i> bewirkt eine verminderte Bakterienlast in der Niere von <i>S. aureus</i> Newman in einem Maus-Abszessmodell.	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Meilensteine der Tierexperimente	34
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme	37
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	38
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Nährmedien	39
Tabelle 5: Verwendete Chemikalienkits	40
Tabelle 6: Verwendete Puffer, Lösungen und Antibiotika	40
Tabelle 7: Verwendete Primer	41
Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien	42
Tabelle 9: Verwendete Computersoftware.....	43
Tabelle 10: RT-PCR Programm zur Umschreibung der RNA in cDNA	46
Tabelle 11: RT-PCR Reaktionsansatz für 1 Reaktion (Gesamtvolumen 20 µl)	46
Tabelle 12: Einstellung des Programms für die qPCR.....	47
Tabelle 13: Scoringtabelle für das murine Abszessmodell.....	52
Tabelle 14: Ermittelte Generationszeiten.....	59

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Fassung

Einleitung und Fragestellung: Das durch das Gen *ptsH* codierte Histidin-haltige Phosphatträgerprotein (HPr) besitzt in verschiedenen Gram-positiven Bakterienarten sowohl eine Funktion im Phosphotransferasesystem (PTS) zur Glukoseaufnahme als auch eine Rolle als Cofaktor des Kataboliten-Kontrollproteins A (CcpA) in der Kohlenstoffkatabolitenrepression (CCR). Durch die Kohlenstoffkatabolitenrepression sind diese Mikroorganismen dazu in der Lage, in Anwesenheit bevorzugter Kohlenstoffquellen die Expression von Proteinen, die für die Aufnahme und Verstoffwechslung weniger bevorzugter Kohlenstoffquellen benötigt werden, zu reprimieren.

Während die Funktionen des Kataboliten-Kontrollproteins A in *Staphylococcus aureus* gut charakterisiert sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit anhand von *ptsH*- und *ccpA*-Deletionsmutanten die Rolle des Histidin-haltigen Phosphatträgerproteins im Hinblick auf die Involvierung im Phosphotransferasesystem als auch in der Kohlenstoffkatabolitenrepression untersucht werden.

Dazu sollten der *Staphylococcus aureus* Wildtyp Newman und die isogenen Stämme einer *ptsH* Einzelmutante, einer *ccpA* Mutante, einer *ptsH_ccpA* Doppelmutante, einer *ptsH** Mutante sowie einer *ptsH* Komplementante vergleichend untersucht werden. Die Newman *ptsH** Mutante wurde durch eine Punktmutation in der Nukleotidsequenz von *ptsH* genetisch so verändert, dass im Translationsprodukt das Serin 46 durch ein Alanin ersetzt wird. Dadurch sollte das bifunktionelle Histidin-haltige Phosphatträgerprotein im Phosphotransferasesystem weiterhin aktiv, aber in der Kohlenstoffkatabolitenrepression funktionell gestört sein, um somit die jeweiligen Wirkungen des Histidin-haltigen Phosphatträgerproteins in den beiden zuvor genannten Prozessen unabhängig voneinander untersuchen zu können. Weiterhin sollte erforscht werden, ob das Histidin-haltige Phosphatträgerprotein auch unabhängig von dem Kataboliten-Kontrollprotein A eine Funktion in der Kohlenstoffkatabolitenrepression besitzt.

Methoden: Zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens wurden vergleichende Messungen der optischen Dichte der Bakteriensuspensionen bei 600 nm im zeitlichen Verlauf und der pH-Werte des Kulturüberstands vorgenommen. Weiterhin sollte durch die Bestimmung der extrazellulären Metaboliten Glukose, Acetat und Ammonium der Einfluss der zuvor genannten Mutationen auf den Kohlenstoffmetabolismus sowie den Zucker-Import in *S. aureus* untersucht werden. Durch eine quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurden metabolische (*citB*, *pckA*) als auch Virulenzgene (*RNAlIIII*, *hla*, *spa*) in unterschiedlichen Wachstumsphasen des Bakteriums analysiert. Zum Schluss wurden die unterschiedlichen Mutanten *in vivo* in einem murinen Abszessmodell hinsichtlich ihres Infektionsverlaufes untersucht.

Ergebnisse und Diskussion: Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass unter glukosehaltigen Wachstumsbedingungen die beiden *S. aureus* Newman *ptsH* Mutanten (Einzelmutante und Doppelmutante), verglichen mit den übrigen zuvor genannten Newman Derivaten, eine

Wachstumsverzögerung aufwiesen. Des Weiteren konnte ein beeinträchtigter Glukose-Import in den *ptsH* Mutanten festgestellt werden, der wahrscheinlich durch den Ausfall des Phosphotransferasesystem bedingt ist. Ferner zeigten sich neben der gestörten Glukoseaufnahme eine geringere Acetat-Akkumulation und konstant erhöhte pH-Werte im Kulturüberstand. Eine noch bei Anwesenheit von Glukose bereits beginnende Acetat-Wiederaufnahme lässt auf eine erhöhte Aktivität des Citratzyklus bei den *ptsH* Mutanten schließen. Diese Vermutung konnte durch bereits in der frühen exponentiellen Wachstumsphase erhöhte Transkriptkonzentrationen des *citB* Gens (codierend für das Citratzyklus-Enzym Aconitase) in den *ptsH* Mutanten durch quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion Analysen bestätigt werden. Auch für das in der Gluconeogenese involvierte Gen *pckA* wurden erhöhte Werte im Vergleich zum Wildtyp gemessen. In den beiden *ptsH* Deletionsmutanten konnten, verglichen mit dem Wildtyp, zudem bereits während der frühen Wachstumsphase eine Zunahme der Ammonium Konzentrationen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass in der exponentiellen Wachstumsphase ein stärkerer Abbau von Aminosäuren als alternative Kohlenstoffquelle stattgefunden hat, da die Glukoseaufnahme und -verwertung durch das fehlende Histidin-haltige Phosphatträgerprotein gestört war.

In einem murinen Abszessmodell, bei dem die Bakterien in das Gefäßsystem der Mäuse injiziert wurden, bewirkte die Deletion von *ptsH* im Stamm Newman 4 Tage nach der Infektion eine verminderte Bakterienlast in den untersuchten Organen Leber und Niere. Die abgeschwächten Infektionsverläufe in den mit den Newman *ptsH* Mutanten infizierten Tieren könnten durch einen veränderten Metabolismus erklärt werden, da diese Mutanten vermutlich auch unter *in vivo* Bedingungen in der Glukoseaufnahme eingeschränkt sind. Des Weiteren könnte die reduzierte Bakterienlast in den mit den *ptsH* Mutanten infizierten Tieren auf eine fehlende Interaktion zwischen dem Histidin-haltigen Phosphatträgerprotein und dem Kataboliten-Kontrollprotein A zurückzuführen sein. In vorherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass das Kataboliten-Kontrollprotein A die Transkription des für die Virulenz von *S. aureus* bedeutsamen Virulenzfaktors *hla*, welcher für das α -Hämolyisin codiert, beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den durchgeführten quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion Analysen bereits in den frühen Wachstumsphasen erhöhte *hla* Transkriptionsraten in den *ccpA* als auch *ptsH* Mutanten beobachtet werden, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass das Histidin-haltige Phosphatträgerprotein die Expression von *hla* auch unter *in vivo* Bedingungen beeinflusst.

Zusammenfassend hat das Histidin-haltige Phosphatträgerprotein eine wichtige Rolle als metabolischer Regulator, der großen Einfluss auf die Virulenz von *S. aureus* nimmt.

1.2 Summary

The importance of the histidine-containing phosphocarrier protein for the virulence and pathogenicity of *Staphylococcus aureus*.

Background and question: The histidine-containing phosphocarrier protein (HPr), encoded by the *ptsH* gene, is thought to exhibit a dual function in gram positive bacteria, as a phosphate donor for the incoming sugar in the phosphotransferase system (PTS), and as a cofactor of the catabolite control protein A (CcpA), a master regulator of carbon catabolite repression (CCR).

CCR allows microorganism to favor the import and metabolization of preferred carbon sources and to repress the expression of various genes, which are responsible for the uptake and break down of less favored carbon sources.

In this dissertation, the role of HPr in *Staphylococcus aureus* strain Newman was studied with regard to its involvement in the PTS and in CCR on the basis of *ptsH*- and *ccpA*-deletion mutants. For this purpose, the *S. aureus* wildtype Newman and the isogenic strains of a *ptsH* mutant, a *ccpA* mutant, a *ptsH ccpA* double mutant, a *ptsH** mutant and a *ptsH* mutant complemented with the wild-type allele should be compared. The *ptsH** mutant was genetically modified by introducing a point mutation in the nucleotide sequence of *ptsH*, which in turn results in a serine to alanine substitution at amino acid 46 of HPr. Thereby, a HPr variant is expected that is still functional in the PTS but is unable to bind to and activate CcpA, which should allow investigating independently the respective effects of HPr in both previously mentioned processes. Additionally, a CcpA-independent role of HPr in CCR should be investigated.

Methods: For this purpose, *S. aureus* Newman and mutant cells were batch cultured and optical densities at 600 nm and pH values were determined over time in order to characterize the growth behavior of the individual derivatives. By determining the contents of glucose, acetate and ammonia in culture supernatants over time, the carbohydrate metabolism and sugar import capacities of the *S. aureus* Newman strain set were investigated. To get an idea about the impact of HPr on the transcriptome of *S. aureus*, transcription rates of selected metabolic genes (i.e. *citB*, *pckA*), and genes encoding regulatory and virulence factors (i.e. *RNAlII*, *hla*, and *spa*) were determined by quantitative realtime Reverse-Transcriptase PCR (qRT-PCR) at different bacterial growth stages. Finally, the importance of HPr for infectivity of *S. aureus* was studied under *in vivo* conditions in a murine *S. aureus* abscess model.

Results and conclusion: I found that the *ptsH* mutants (single mutant and double mutant) exhibited a growth delay compared to the other strains under glucose-containing growth conditions. Furthermore, a marked reduction in glucose import was noticed for both mutants, which is probably due to an impairment of the PTS. In addition to the reduced sugar uptake kinetics, significantly lower extracellular acetate accumulation rates and constantly higher pH values were observable in the culture supernatants of both *ptsH* mutants. Both *ptsH* mutants also already started to reutilize the exported acetate when glucose was still present in the growth media, which suggests an earlier onset of the tricarboxylic acid cycle in the *ptsH* mutants when compared to the wild type. This assumption was confirmed by qRT-

PCR analyses, which identified increased transcription rates for the tricarboxylic acid cycle enzyme aconitase encoding gene *citB* as well as for *pckA*, a gene encoding for PckA, a keyenzyme in gluconeogenesis, in both *ptsH* mutants during early growth stages.

Compared to the wild type, both *ptsH* mutants already showed an increase in ammonia concentration during the early growth phases. This indicates that an increased breakdown of amino acids - as an alternative carbon source - took place during exponential growth phase, since the glucose uptake and utilization was disturbed by the impaired HPr.

In a murine abscess model in which the bacteria were injected into the vascular system of the mice, the deletion of *ptsH* resulted in a significantly reduced bacterial load in the investigated organs liver and kidney at 4 days post infection. The attenuated infectivity of the *ptsH* mutants might be explained on the one hand by an altered metabolism, since both mutants are likely to display reduced glucose uptake rates under *in vivo* conditions. Another explanation for the reduced bacterial loads in *ptsH* mutant-infected mice might go beyond this specific role in sugar import and involve the interplay between HPr and CcpA. Earlier work demonstrated that CcpA affects the transcription of *hla*, encoding α -hemolysin, which is a major virulence factor of *S. aureus*. α -hemolysin is involved during abscess formation. During the course of this study, elevated *hla* transcription rates in *ccpA* and *ptsH* mutants were already observed during the early growth stage. This suggests that HPr might impact the expression of *hla*, even under *in vivo* conditions.

The findings presented in this thesis demonstrate that HPr of *S. aureus* has important roles in carbon utilization and metabolism, and also affects infectivity of this important human pathogen.

2 Einleitung

2.1 Virulenzfaktoren und klinische Bedeutung von *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist ein Gram-positives, kugelförmiges Bakterium mit einer Größe von etwa 0,7-1 μm (Abbildung 1), das bei vielen Menschen zumindest zeitweise in den Mikrobiomen des Nasen-Rachenraums und der Haut anzutreffen ist. Obwohl *S. aureus* damit zu den Kommensalen des Menschen zu zählen ist, sind die Auswirkungen des Bakteriums auf die Bevölkerung und die Medizin immens.

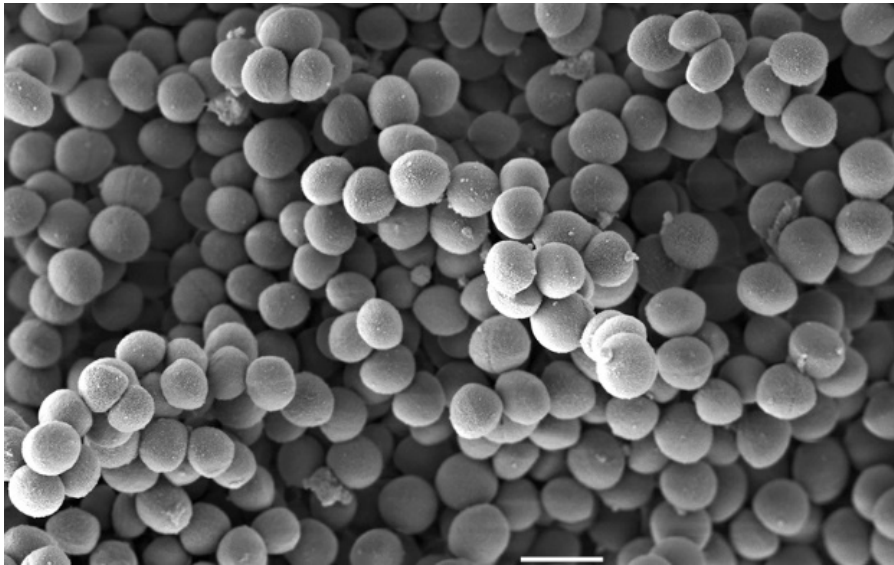


Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines *Staphylococcus aureus* Zellverbands.

Haufenförmige Anordnung der Kugelbakterien. Maßstab 2 μm . (Quelle: Robert Koch Institut).

S. aureus ist einer der wichtigsten humanpathogenen Keime, dem es möglich ist, ein großes Spektrum an Infektionen hervorzurufen [119]. Aufgrund der Vielfalt an Infektionen tangiert das Bakterium annähernd alle medizinischen Fachrichtungen. *S. aureus* ist die Hauptursache für Bakteriämie und infektiöse Endokarditis, sowie Knochen-, Gelenk-, Haut- und Weichteilgewebe- sowie pleuropulmonale und Fremdkörper-assoziierte Infektionen [119]. Abbildung 2 fasst zusammen, welche Organsysteme durch eine Infektion mit *S. aureus* befallen sein können und welche Erkrankungen häufig daraus resultieren.

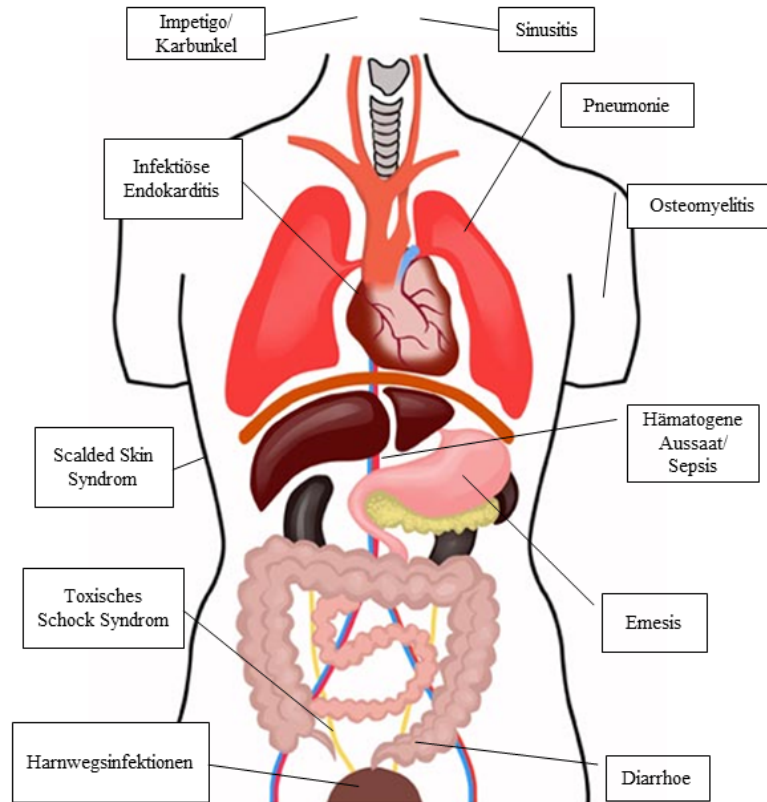


Abbildung 2: *Staphylococcus aureus* kann eine Vielfalt an Erkrankungen hervorrufen.

Die Abbildung zeigt ausgewählte durch *S. aureus* verursachte Infektionen. Modifiziert nach [129].

Allgemein lässt sich feststellen, dass die Vielzahl an verschiedenen Virulenzfaktoren ein Grund für die Vielseitigkeit von *S. aureus* als Krankheitserreger ist.

Die Zellwand des Bakteriums bildet z.B einen Schutzmantel gegenüber der wirtseigenen Immunabwehr [116]. Das Grundgerüst besteht aus einer Peptidoglykanschicht (Mureinschicht), die sich aus N-Acetylmuraminsäure, N-Acetylglucosamin und Peptidbrücken zusammensetzt. Ein weiterer Baustein sind die Teichonsäuren und die Lipoteichonsäuren, die mit ihrem Lipidanteil in der Mureinschicht bzw. der Zytoplasmamembran des Bakteriums verankert sind und eine pyrogene Wirkung auf den Menschen haben [74].

Viele klinische *S. aureus* Stämme sind außerdem dazu in der Lage, eine (Mikro-)Kapsel auszubilden, ein vornehmlich aus den Bausteinen N-Acetyl-Fucosamin (FucNAc) und N-Acetyl-Mannosaminuronsäure (ManNAcA) bestehendes Polysaccharid [88], das die Pathogenität erhöht, indem es die Opsonophagozytose durch Immunzellen reduziert [81].

Wie zuvor schon angedeutet, stellt *S. aureus* zeitgleich einen Kommensale und ein humanes sowie tierpathogenes Bakterium dar. Ungefähr 30% der menschlichen Population sind asymptomatisch mit *S. aureus* kolonisiert [119]. Vor allem sind die vorderen Nasenlöcher betroffen aber auch andere Bereiche

des Körpers wie das Perineum, der Pharynx [131] oder auch die Axilla können permanent mit *S. aureus* besiedelt sein, ohne dass eine Infektion entsteht [23]. Allerdings besteht im Falle einer asymptomatischen Kolonisation ein höheres Risiko, an einer manifesten Infektion zu erkranken, die durch Verletzungen der Haut oder der Mucosa begünstigt wird [129]. Der dauerhafte Träger oder Carrier Status hat dennoch auch einen positiven, wenn auch paradoxen Vorteil: im Falle einer invasiven Infektion (z.B. Sepsis) weisen die Carrier eine geringere Letalität als Non-Carrier auf [130]. Dieser Vorteil kann unter anderem auf das Immunsystem des Trägers zurückgeführt werden. Durch die ständige Kolonisation mit *S. aureus* adaptiert sich das Immunsystem (insbesondere die T-Zell Antwort und damit die Zytokin Ausschüttung) an den vorherrschenden Stamm und kann im Falle einer Erkrankung gezieltere und effizientere Abwehrmechanismen abspielen, indem Superantigene, die für die Entstehung einer Sepsis von Bedeutung sind, effektiv neutralisiert werden können [55].

2.1.1 Eiter und Abszessbildung

Zu den symptomatischen Erkrankungen, die durch den Keim hervorgerufen werden, gehört die Abszessbildung in der Haut, den Schleimhäuten sowie in inneren Organen. An den komplexen biologischen Vorgängen im Zuge der Abszessbildung sind verschiedene bakterielle Virulenzfaktoren beteiligt, die in Abbildung 3 zusammenfassend dargestellt sind.



Abbildung 3: Bakterieneigene Moleküle, die zur Abszess Entstehung beitragen.

Für die Abszess Entstehung benötigt *S. aureus* viele verschiedene Virulenzfaktoren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden. Modifiziert nach [59].

Cheng *et al.* haben in einer Arbeit die durch *S. aureus* verursachte Abszessbildung in vier Phasen unterteilt [15]. Das initiale Überleben im Blut kennzeichnet Phase 1. Zur Sicherung des Überlebens und der Proliferation hat *S. aureus* verschiedene Mechanismen entwickelt. So ist das Bakterium beispielweise durch das membrangebundene Pigment Staphyloxanthin charakterisiert, welches *S. aureus* vor oxidativem Stress schützt [20]. Weitere Sekretionsproteine, wie die Phenol-löslichen Moduline (PSMs) oder Leukozidine, leiten die nächste Eskalationsstufe ein, indem sie neutrophile Zellen zerstören [125]. Beteiligt sind außerdem bakterieneigene Signalmoleküle wie z.B. formylierte Peptide, die neutrophile Granulozyten an den Infektionsort rekrutieren, die dann durch verschiedene

lytische Proteine wie die zuvor beschriebenen PSMs und Leukozidine zerstört werden können [13]. Durch den „Clumping factor“ (ClfA) vermag das Bakterium an Fibrinogen/Fibrin zu binden. In Kombination mit den Coagulasen Coa und vWfb (von Willebrandfaktor Bindeprotein) können dabei Fibrinthromben entstehen, an und in denen die Staphylokokken agglutinieren. Diese Aggregatbildung führt dazu, dass Immunzellen die Bakterien schlechter erreichen können und sorgt so dafür, dass die Phagozytose der Bakterien durch den Wirt markant reduziert wird. Außerdem bildet ClfA in gewisser Weise einen neuen Lebensraum für eine verbesserte Replikation, indem es erheblich dazu beiträgt, dass *S. aureus* an aktiviertem Endothelium des Blutgefäßsystems anheften kann [19]. Mit diesen Eigenschaften trägt ClfA maßgeblich dazu bei, dass sich *S. aureus* dem Immunsystem des Wirtes entziehen kann. Ein weiterer Faktor, mit dem *S. aureus* die Immunantwort des Wirtes moduliert, ist das Enzym Adenosin Synthase A (AdsA). Adenosin wird auch vom Menschen selbst produziert und terminiert eigentlich eine Entzündungsreaktion bei abgeklungenem Infekt. Über AdsA ist *S. aureus* dazu in der Lage, eine Genesung zu fingieren, damit das Immunsystem auf ein normales Level herunterreguliert wird [22].

Phase 2 beinhaltet die Modulation des Ortes, an dem sich die Infektion manifestiert. Für eine effektive Vermehrung benötigt *S. aureus* neben Nährstoffen auch Spurenelemente wie Eisen, das im Wirt in ungebundener Form nur sehr begrenzt verfügbar ist. Um eine ausreichende Versorgung mit Eisenionen während der Infektion sicherstellen zu können, hat *S. aureus* eine Reihe an Mechanismen zur Akquisition dieses Spurenelements entwickelt. So verfügt *S. aureus* unter anderem über mehrere Hämolytine, mit deren Hilfe es das in Erythrozyten gespeicherte eisenhaltige Protein Hämoglobin freisetzen kann. Das im Hämoglobin enthaltene Eisen wird dann über die zellwandgebundenen Proteine wie IsdA, IsdB und IsdC in die Bakterienzelle eingeschleust und verfügbar gemacht [86]. Des Weiteren sorgt *S. aureus* über die Sekretion von Lipasen, Proteasen und Nukleasen dafür, dass Nährstoffe am Infektionsort durch Degradation von Wirtsfaktoren verfügbar sind. Über eine Reihe weiterer Sekretionsfaktoren sorgt es zudem für eine massive Invasion von Immunzellen, die eine Gewebeerstörung auslösen und somit eine Vielzahl an Nährstoffen freisetzen [69].

An Phase 3 sind das Protein A, die Coagulase und auch das von Willebrand-Faktor-bindende Protein (vWbp) beteiligt. Protein A verhindert unter anderem die Phagozytose durch den Wirt, indem es an die Fc Komponente des Immunglobulins bindet [40]. Dadurch wird die Bakterienzelle nach außen mit den wirtseigenen Antikörpern bestückt und kann sich somit der Immunabwehr entziehen. Der Wirt kann das Bakterium also schlechter beseitigen. Die Coagulase greift in die Gerinnungskaskade ein und aktiviert Prothrombin. Der Staphylocoagulase-Prothrombin-Komplex ist in der Lage, aus Fibrinogen Fibrin zu bilden und führt zu einer Thrombus Entstehung. Das vWbp unterstützt die Fibrin Bildung und ermöglicht die Entstehung eines Fibrinwalls am präformierten Thrombus, der als Barriere für Immunzellen fungiert [14, 57]. So können sich die Bakterien in einem abgeschirmten Bereich ungestört

vermehren (SAC = Staphylococcal abscess community). Um die SAC Zone bilden sich verschiedene Schichten von nekrotischen und gesunden Immunzellen, die an gesundes Gewebe angrenzen. Der Abszess, also die Mischung aus neutrophilen Granulozyten, Zelldetritus, Bakterien und Fibrinkapsel, ist vollständig ausgebildet.

Die 4. Phase ist durch ein Persistieren des Erregers und dessen Aussaat gekennzeichnet. Ein verlängertes Überleben in dem bereits formierten Abszess wird durch das extrazelluläre Adhäsionsprotein Eap gewährleistet [46]. Dieses Protein ist in der Lage, die Leukozyten-Rekrutierung zu unterdrücken [15]. Diese antiinflammatorische Wirkung ist auf die Interaktion zwischen Eap und dem ICAM-1 Molekül, sowie den wirtseigenen extrazellulären Matrixproteinen zurückzuführen [64]. Durch diese Verbindung werden die wirtseigenen Moleküle blockiert, die maßgeblich an der Leukozyten-Extravasation in das entzündliche Gewebe beteiligt sind. Dadurch ist die Immunabwehr gegenüber dem Erreger eingeschränkt.

In Bezug auf die Abszessbildung ist es *S. aureus* möglich, eine große Bandbreite an Krankheitsbildern zu verursachen, die von harmlosen oberflächlichen Hauterkrankungen (Folikulitis, Furunkel) bis hin zu lebensgefährlichen Verläufen (Phlegmone, nekrotisierende Weichteilinfektionen) variieren können.

2.1.2 Infektiöse Endokarditis

Eine weitere schwerwiegende Erkrankung mit potenziell lebensgefährlichem Verlauf ist die infektiöse Endokarditis (IE). In über 50% der Fälle ist *S. aureus* dafür verantwortlich (*Endocarditis acuta*) [53]. Diese bakterielle Infektion betrifft meist schon vorgeschädigte Herzklappen, am häufigsten die Mitralklappe, gefolgt von der Aortenklappe. Patienten mit künstlichen Herzklappen, angeborenen Herzvitien sowie bereits durchgemachter Endokarditis sind Risikopatienten für eine infektiöse Endokarditis. Patienten, die einer intensivmedizinischen Betreuung bedürfen, sind ebenfalls einem erhöhten Risiko ausgesetzt, da die häufige Katheterisierung eine bakterielle Besiedelung begünstigt. Zwei Bedingungen herrschen bereits vor der Entstehung einer infektiösen Endokarditis vor: zum einen existiert meistens eine vorgeschädigte Herzklappe und zum anderen eine transitorische Bakteriämie welche durch Mikrotraumen, z.B. beim Kauen oder dem Zähneputzen entstehen kann. Durch das vorgeschädigte Epithel wird die Gerinnungskaskade aktiviert und es lagern sich lokal am Gewebe kleine Thromben ab. Die Thromben enthalten Fibronektin, Thrombozyten und Plasmaproteine, die alle von *S. aureus* genutzt werden können, um eine Verbindung mit dem Gewebe des Wirtes einzugehen und letztendlich die so genannten Vegetationen zu bilden [77]. In diesem ersten Schritt der Adhärenz werden von *S. aureus* verschiedene CWA (cell wall anchored adhesins) wie zum Beispiel der ClfA oder die Fibronektin-Bindeproteine (FnBP) dazu genutzt, um die Klappe zu kolonisieren [77]. Generell können Adhäsionsfaktoren in zwei Hauptgruppen unterteilt werden, zum einen in die zuvor bereits erwähnten CWA, die alle kovalent mit der bakteriellen Zellwand verbunden sind und zum anderen in SERAMs („secretable expanded repertoire adhesive molecules“), die vom Bakterium in das umgebende Milieu

sezerniert werden und dann zum Teil an die bakterielle Zellwand zurückbinden [13]. Protein A (Spa) ist zum Beispiel ein Virulenzfaktor, der kovalent in der Zellwand verankert ist und zu der Gruppe der CWA gehört. Das Protein gilt als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. aureus*, das im Infektionsgeschehen eine Reihe an Funktionen auszuüben vermag. So wird Spa unter anderem eine immunmodulierende Wirkung zugeschrieben, indem es über die Bindung von IgG an der Fc Region dazu führt, dass die Zellwandoberfläche von *S. aureus* mit IgGs ausgekleidet wird, die nicht mehr von den Immunzellen gebunden werden können und so das Bakterium vor Opsonisierung und Phagozytose schützt [10]. Damit begünstigt Spa die Persistenz des Erregers, was den zweiten Schritt in der Entstehung der IE ausmacht. Des Weiteren fungiert Protein A als sogenanntes B-Zell Superantigen, da es an den B-Zell Rezeptor binden und dann die Immunzelle zerstören kann [104]. Auch das kann die Entstehung einer IE fördern. Außerdem ist *S. aureus* über Spa auch dazu in der Lage, insbesondere bei niedrigem Scherfluss an den von Willebrand Faktor zu binden und so mit dem Endothel zu interagieren [123].

Schritt 2 wird nicht nur durch die Persistenz, sondern auch durch die Dissemination von *S. aureus* charakterisiert. Enzyme und Toxine (z.B Hämolytine und Leukozidine) ermöglichen die Nutzung des menschlichen Gewebes als Nahrungsquelle und können so das bakterielle Wachstum und die weitere Aussaat gewährleisten [27, 76]. Im speziellen ist das α -Hämolytine in der Lage, Poren in die Membran von Erythrozyten und anderen Wirtszelltypen einzubauen, und sie so zu zerstören. Unter den Leukozidinen ist das Pantan-Valentine Leukozidin (PVL) gut bekannt. Dieses aus zwei Untereinheiten bestehende Protein ist in der Lage, über eine Pore in der Wirtszellmembran den Zelltod zu induzieren [112], Leukozyten zu zerstören und Gewebnekrosen hervorzurufen [2]. Die Verbreitung von PVL-bildenden Stämmen in der Gesellschaft und im Gesundheitswesen ist jedoch eher gering. Weniger als 5% der *S. aureus* Stämme sind dazu in der Lage PVL zu bilden. Die 5%, die dazu befähigt sind das Toxin zu produzieren, verursachen auch noch weitere Erkrankungen wie nekrotische Pneumonien sowie Haut- und Weichteilinfektionen [63].

2.1.3 Osteomyelitis

Die bereits im vorherigen Abschnitt beschriebenen CWA spielen unter anderem in der Entstehung der Osteomyelitis eine wichtige Rolle. Eine gesunde Knochenmatrix zu besiedeln ist für Bakterien anspruchsvoll, aber *S. aureus* kann durch diese Adhäsine an Kollagenfasern der Knochenmatrix binden [119]. Der sich anschließend ausbildende Biofilm hilft dem Bakterium dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen. Das „polysaccharide intracellular adhesin“ (PIA) ist dabei eine wichtige Komponente von Staphylokokken wie *S. aureus* und *S. epidermidis*, um eine stabile Biofilm Matrix aufzubauen [92]. Das *ica* (intercellular adhesion locus)-Operon (*icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*) kodiert für Proteine der PIA-Synthese [36]. Oft kommt es auch zu rezidivierenden Osteomyelitiden, die eine chronische Form annehmen können. Für die letztere Verlaufsform sind vermutlich die sogenannten „small colony

variants“ (SCVs) von hoher Bedeutung. Die SCVs haben einen veränderten Phänotyp: sie wachsen langsam und haben einen reduzierten Metabolismus [121]. Dies scheint eine Art Überlebensmechanismus für das Bakterium zu sein, sodass *S. aureus* intrazellulär auch in den Osteoblasten persistieren kann [119].

2.1.4 Bakteriämie

Besonders auf Intensivstationen ist *S. aureus* als klinisch relevantes Pathogen zu nennen, denn die Gesamtmortalität bei Blutstrominfektionen liegt bei 20% [118]. Begünstigende Faktoren sind zentralvenöse Katheteranlagen, Implantate und orthopädische Prothesen, die sowohl eine Eintrittspforte als auch eine Besiedlungsgrundlage für den Erreger darstellen und oft einen direkten Zugang ins vaskuläre System ermöglichen. Um im intravasalen Raum zu überleben und eine Sepsis hervorzurufen, bedarf es verschiedener Mechanismen. Zunächst wird das Komplementsystem durch Superantigene (staphylococcal superantigen- like 5/10, staphylococcal complement inhibitor) blockiert und eine Antigen-Antikörper Reaktion bleibt aus [118]. Staphylokokken können zudem mit der Blutgerinnung ihres Wirtes interferieren. Trotz hoher Antikoagulation mit Vitamin K Antagonisten oder Heparin zeigt sich bei Patienten mit einer Staphylokokken Sepsis eine gesteigerte Blutgerinnung [118]. Durch die Sekretion von „Canonical coagulase“ (Coa), dem „von Willebrand factor binding protein“ (vWbp) und dem Clumping factor (ClfA) wird die Gerinnungskaskade aktiviert und letztendlich Fibrin gebildet, welches das Blut des Wirtes koagulieren lässt [70] und die Bakteriämie aggraviert.

2.1.5 Toxinbedingte Erkrankungen

Eine weitere Kategorie umfasst toxinbedingte durch *S. aureus* ausgelöste Erkrankungen, wie zum Beispiel die Lebensmittelintoxikation. Ausgangspunkt einer solchen Infektion können Milchprodukte, Fleisch oder Eierspeisen sein. Hervorgerufen wird die Intoxikation durch Enterotoxine wie die Staphylococcal Enterotoxin A und E (SEA, SEE), die nicht Teil des Grundgenoms von *S. aureus* sind, sondern durch Prophagen kodiert sind [97]. Die Intensität der Erkrankung hängt von der Menge der aufgenommenen Nahrung bzw. des Toxins ab. Ungefähr 20 - 100 ng Enterotoxin können eine Intoxikation auslösen [97]. Lediglich die Toxine werden in den Körper aufgenommen und sind dort alleine nicht vermehrungsfähig, weshalb die Erkrankung auf eine kurze Dauer (ca. 24 h) beschränkt ist.

Das sogenannte „Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSS)“ oder Pemphigus neonatorum ist ein weiteres Krankheitsbild, das vor allem Säuglinge und Kleinkinder tangiert. Wichtige Risikofaktoren, an dem SSS zu erkranken, sind Frühgeburt, niedriges Geburtsgewicht und invasive Eingriffe während eines langen Krankenhausaufenthaltes [85]. Einige, aber nicht alle, *S. aureus* Isolate sind dazu in der Lage, Exfoliatives Toxin A und B zu produzieren und eine Epidermolysen zu verursachen, indem sie an das Desmoglein 1 Molekül in der Haut anbinden und dieses hydrolysieren und so die Zellintegrität zerstören

[73]. Die Epidermis löst sich einhergehend mit Fieber und Erythem ab. Ähnlich wie bei einer Verbrennung bilden sich große Blasen auf der Haut.

Das Toxische Schock Syndrom Toxin 1 (TSST1) gehört ebenfalls zur Gruppe der Superantigene. Eine Intoxikation mit TSST1 führt dazu, dass bis zu 20% der T-Lymphozyten eines Wirtes aktiviert werden. Dies führt zu einer massiven Ausschüttung von Zytokinen, insbesondere Interleukin 2 sowie Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF α) und dies löst den sogenannten Zytokinsturm aus. Klinisch zeigt sich das Toxische Schock Syndrom durch Fieber, Hypotension, Exanthem und Multiorganversagen [63].

Abbildung 4 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus* wieder.

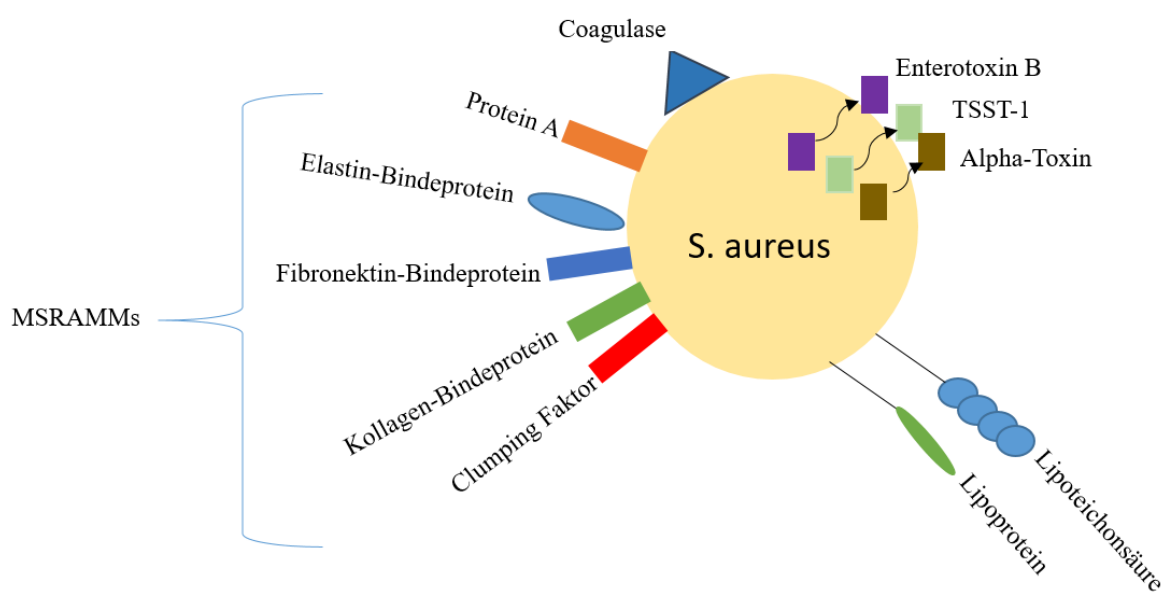


Abbildung 4: Virulenzfaktoren von *S. aureus*.

Schematische Darstellung einer Auswahl der Zellwand-gebundenen und der extrazellulären Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus*. Modifiziert nach [18].

2.2 Regulation der Virulenzfaktoren

Um eine Infektion hervorzurufen und aufrechtzuerhalten, müssen zu gegebener Zeit unterschiedliche Virulenzfaktoren abhängig vom Lebenszyklus des Bakteriums produziert werden. Zu Beginn des Lebenszyklus, also in der frühen exponentiellen Phase einer *in vitro* Batchkultur, werden vorrangig zellwandgebundene Faktoren exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt existiert eine gute Nährstoffbasis weshalb im bakteriellen Lebenszyklus die Adhäsion im Vordergrund steht. In der späteren, postexponentiellen Wachstumsphase werden überwiegend Exoproteine ausgeschüttet, da das Bakterium sich im Rahmen der Invasion neue Nährstoffquellen erschließen muss [124]. *S. aureus* produziert eine Vielzahl an globalen Regulatoren, um sich ständig an neue Umwelt- bzw. Umgebungsbedingungen anpassen zu können [45]. Einer der Haupteffektoren dieses regulatorischen Netzwerks ist der *agr*-Locus (*accessory gene regulator*). Als sogenanntes „Quorum-Sensing System“, ermöglicht *agr* abhängig von der Bakteriendichte eine Zell-Zell Kommunikation und kann somit die Regulation von Virulenzfaktoren wachstumsphasenabhängig beeinflussen [133].

Das *agr*-System setzt sich aus zwei Transkriptionseinheiten, *RNAII* und *RNAIII*, zusammen, deren Expression über divergente Promotoren, P2 und P3, kontrolliert wird. Die Transkriptionseinheit *RNAII* umfasst die Gene *agrA*, *agrC*, *agrB* und *agrD* [79]. Die ersten beiden Gene kodieren für das Zwei-Komponenten-System AgrAC. Die letzten beiden Gene kodieren für das Autoinducer Präpeptid AgrD und das Membranprotein AgrB, welches für den Transport und die Prozessierung von AgrD zum sogenannten „Autoinducing peptide“ (AIP), dem eigentlichen Signalpeptid des Quorum-Sensing Systems, benötigt wird, das dann konzentrationsabhängig dazu in der Lage ist, AgrC zu aktivieren [124]. Das Gen *agrC* kodiert für eine Histidinproteinkinase, die als Sensor des AIP fungiert und somit die Bakteriendichte misst. Dieses Messergebnis wird dann an das eigentliche Regulator-Protein AgrA weitergeleitet, welches wiederum in der Lage ist, beide Promotoren P2 und P3 zu aktivieren [79]. Über die Bindung an P2 wird in der Folge vermehrt *RNAII* gebildet, was dazu führt, dass die Komponenten dieses Dichtemesssystems vermehrt gebildet werden und damit zugleich mehr AIP und AgrC vorhanden ist, was eine massive Verstärkung dieses Regelkreises bewirkt. Durch die Aktivierung von P3 entsteht zudem *RNAIII*. Diese regulatorische RNA ist das eigentliche Effektormolekül des *agr*-Locus. Die Hauptfunktion von *RNAIII* besteht darin, die Synthese von sekretorischen Virulenzfaktoren (z.B. α -Hämolyisin) zu beschleunigen und die Synthese von Oberflächenproteinen (z.B. Protein A) herunter zu regulieren [133]. Die *RNAIII* abhängige Kontrolle der Transkription dieser Virulenzfaktoren wird dabei zum einen direkt durch RNA-RNA Interaktionen hervorgerufen, die in der Regel dazu führt, dass die entsprechenden mRNAs über die RNase III abgebaut werden, oder indirekt über die Reprimierung der Produktion des Regulators Rot (repressor of toxins). Dieser fungiert als Repressor der Transkription einer Vielzahl von Toxingenen in *S. aureus* [117]. Eine Sonderrolle nimmt *RNAIII* bei der Expression von α -Hämolyisin ein, da die regulatorische RNA neben der transkriptionellen Kontrolle durch spezifische RNA-RNA Paarung auch die Translation der *hla* mRNA fördert [78].

Ein weiterer, wichtiger Regulator der Expression von Virulenzfaktoren in *S. aureus* ist der sogenannte *sar*-Locus („*staphylococcal accessory regulator*“). Dieser Locus setzt sich aus den drei Transkriptionseinheiten *sarA*, *sarB* und *sarC* zusammen, die alle für das DNA-Bindeprotein SarA kodieren [6]. Anhand von Katheter-induzierten Infektionen konnte die Arbeitsgruppe von Cheung *et al.* zeigen, welche Funktionen diesem Regulator zuzuordnen sind. Der *sar*-Locus ist für die Expression von einer Reihe an extrazellulären Proteinen und zellwandgebundenen Proteinen wie z.B. die Fibrinogen-Binde-Proteine zuständig [16]. Im Infektionsmodell wurde die Adhärenz der Staphylokokken an Herzklappen untersucht und gezeigt, dass die *sarA* Mutante im Vergleich zum Wildtyp weniger pathogen ist, also zu einem späteren Zeitpunkt erst Vegetationen ausbilden kann [16]. Der *sar*-Locus fördert die Genexpression für verschiedene Toxine und inhibiert die Protein A Synthese. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Interaktion mit dem *agr*-Locus. So kontrolliert SarA die Transkription von *RNAlII*, indem SarA an die Region zwischen P2 und P3 bindet [51] und so insbesondere Promotor P2 aktiviert [80].

Neben SarA existieren noch eine Vielzahl verschiedener weiterer Proteine der Sar-Familie (MgrA, Rot, SarS, SarU, SarY, SarT und SarR) in *S. aureus*, die aber häufig nur in bestimmten *S. aureus* Isolaten zu finden sind. So konnte u.a. gezeigt werden, dass SarS einen Einfluss auf die *spa* Transkription hat und so für die Ausschüttung von Protein A mitverantwortlich ist [3]. Ein weiteres bedeutsames Mitglied aus der SarA-Familie ist das zuvor schon erwähnte DNA-bindende Protein Rot, welches eine duale Regulation aufweist, da es die Expression von Genen fördern sowie auch unterdrücken kann. So konnte gezeigt werden, dass Rot z.B. die Expression von *spa* fördert [103] und die Transkription von Genen, die für Exotoxine kodieren, hingegen unterdrückt [95]. Rot und das *agr*-System haben also gegensätzliche Effekte auf die Expression von bestimmten Virulenzfaktoren [56].

Der *sae*-Locus, ebenfalls ein wichtiges Regulationssystem für die Produktion von Virulenzfaktoren in *S. aureus*, ähnelt wegen seines Zwei Komponenten Systems dem *agr*-Locus. So kodiert *sae* u.a. für das Transmembranprotein SaeS und das regulierende Protein SaeR [1]. Zum *sae*-Locus weiter zugehörig sind die beiden Gene *saeP* und *saeQ*. *Sae* modifiziert, wie alle anderen globalen Regulatoren, die bakterielle Virulenz. So zeigte die Arbeitsgruppe von Giraudo *et al.*, dass die Inaktivierung des *sae* Operons eine verminderte α - und β -Hämolyysin Produktion sowie eine verringerte DNase und Coagulase Exkretion zur Folge hat [37]. Wie bereits oben beschrieben, können die einzelnen Genregulatoren auch miteinander interagieren. *Sae* Mutanten zeigten sich in einer Arbeit von Steinhuber *et al.* außerstande, die Transkription von *sarA* und *agr* zu beeinflussen [114].

Virulenz, Metabolismus und insbesondere das intrazelluläre Wachstum als auch die Persistenz von *S. aureus* werden durch den so genannten alternativen Sigmafaktor B welches durch *sigB* kodiert ist, beeinflusst [72]. SigB ist für das Bakterium von hoher Bedeutung, um eine chronische Infektion zu etablieren. Eine Chronifizierung wird vielfach durch die Bildung von sogenannter SCVs ermöglicht, um dadurch möglichst langlebig intrazellulär zu persistieren. SigB hat einen direkten Einfluss auf die

Ausbildung von SCVs, dies zeigte die Arbeitsgruppe von Moisan anhand von Genexpressionsanalysen bei Mukoviszidose Patienten [76]. Diese Patientengruppe leidet häufig an persistierenden Atemwegsinfektionen durch *S. aureus*, die durch SCVs hervorgerufen werden. Die besondere Rolle von SigB bei der Bildung von SCVs in intrazellulär persistierenden *S. aureus* Populationen konnte auch von Tuscherr *et al.* *in vitro* wie *in vivo* gezeigt werden [120]. Der alternative Sigmafaktor interagiert außerdem mit anderen globalen Regulationsfaktoren, indem zum Beispiel über SigB die *sarA* Expression erhöht wird, während die Bildung von *RNIII* und *RNIIII* erniedrigt wird [8].

2.3 Grundlagen des Kohlenstoffwechsels von *S. aureus*

Teile des Stoffwechsels von *S. aureus* ähneln dem des Menschen. So hat *S. aureus* beispielsweise die drei vollständig angelegten Stoffwechselwege für den TCA-Zyklus, den Pentose-Phosphat-Weg (PPP) und die Glykolyse [110]. Eine Übersicht der wichtigsten Reaktionen des Kohlenstoffmetabolismus von *S. aureus* ist in Abbildung 5 dargestellt.

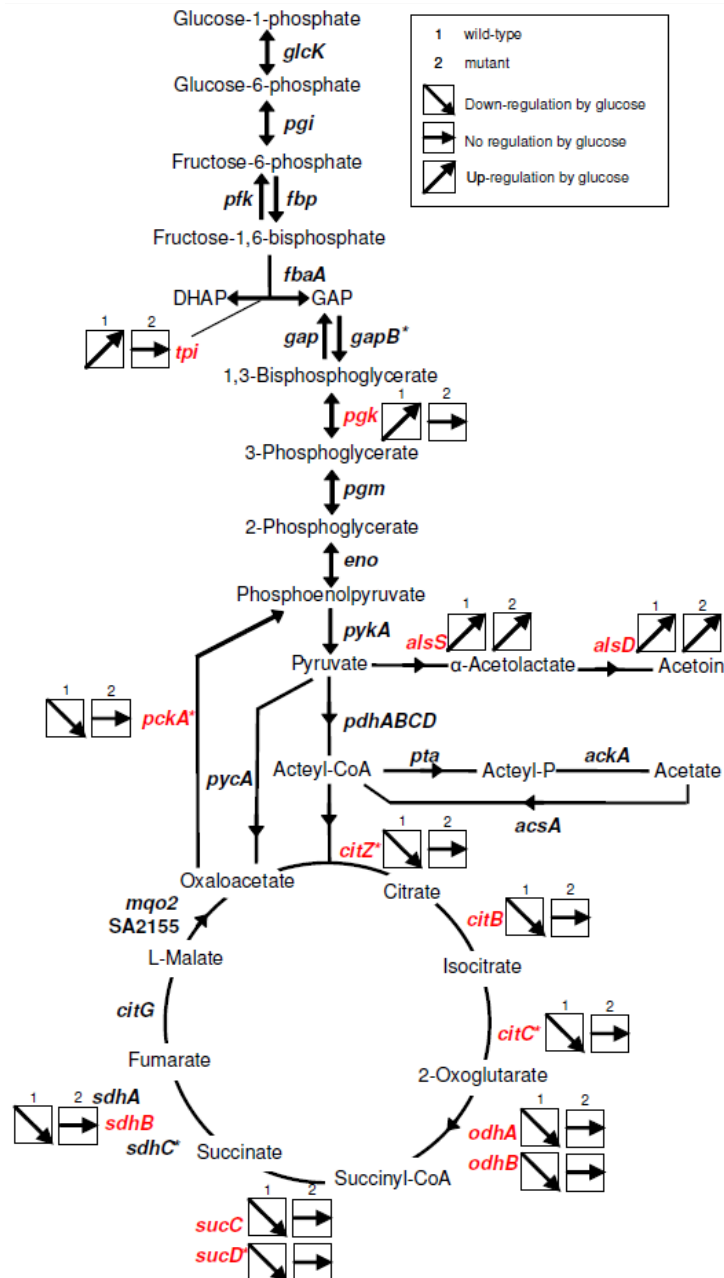


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Kohlenstoffwechsels von *S. aureus*.

Glykolyse, TCA-Zyklus und Gluconeogenese sind eingezeichnet [102]. Die Gene *pckA* und *citB* sind in dieser Arbeit mittels qRT-PCR untersucht worden.

Als Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden Staphylokokken bevorzugt die schnell verwertbare Glukose, die im Rahmen der Glykolyse in mehreren Schritten zu Pyruvat umgewandelt wird, wobei pro Glukosemolekül 2 ATP und 2 Reduktionsäquivalente NADH produziert werden. Bei ausreichender Verfügbarkeit wird Glukose zunächst über Glukose-6-Phosphat (G-6-P) und Fructose-6-phosphat (F-6-P) zu Fructose-1,6-Bisphosphat (F-1,6-BP) umgewandelt. Aus F-1,6-BP entsteht Glycerinaldehyd-3-phosphat (G-3-P) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP). Das Isomer G-3-P wird über mehrere Zwischenschritte wie Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Energieproduktion in Form von

Adenosintriphosphat (ATP) zu Pyruvat umgesetzt. Pyruvat kann, abhängig von aeroben oder anaeroben Wachstumsbedingungen, zu Acetyl-CoA oder Gärungsprodukten wie Lactat oder Ethanol umgewandelt werden [135]. Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex produziert Acetyl-CoA, das im TCA-Zyklus weiter katabolisiert werden kann oder von *S. aureus* zunächst ins Medium sezerniert wird und später als sekundäre Kohlenstoff-Quelle rückgewonnen werden kann [85, 83].

Der Pentose-Phosphat-Weg ist eng mit der Glykolyse verbunden und ist ein alternativer Weg, um Glukose abzubauen. Dadurch entstehen zum einen die Reduktionsäquivalente NADPH/H⁺, die für viele anabole Reaktionen benötigt werden und zum anderen Ribose-5-Phosphat, das für die Nukleotid-Biosynthese verwendet wird [115].

Unter aeroben Bedingungen dienen Acetyl-CoA und Oxalacetat dem TCA-Zyklus als Eingangsmoleküle und werden in mehreren Schritten zu Guanosintriphosphat (GTP) umgewandelt. Eine weitere Aufgabe des TCA-Zyklus ist die Produktion der Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ (die hydrierte Form des Flavin-Adenin-Dinucleotids), aus denen durch die Atmungskette dann Energie in Form von ATP gebildet wird. Neben diesen katabolen Funktionen besitzt der TCA-Zyklus auch weitere anabole Funktionen: es entstehen in diesem Zyklus weitere Kohlenstoffintermediate, die wichtig für verschiedene andere Biosynthesen wie den Aminosäure- und Fettsäurestoffwechsel sind.

Während der postexponentiellen Wachstumsphase ist Glukose in den bakteriellen Kulturmedien als präferierte Kohlenstoffquelle zunehmend aufgebraucht, während im Überstand, je nach Sauerstoffversorgung der Kultur, Acetat oder Laktat akkumulieren. Die Bildung und Sekretion von Acetat bzw. Laktat führt in Schüttelkulturen zu einer Verringerung des pH Wertes des Mediums, die je nach Akkumulationsgrad sogar wachstumshemmend wirken kann. Um das Wachstum auch in Abwesenheit von Glukose fortführen zu können, transloziert *S. aureus* unter aeroben Bedingungen Acetat wieder in die Zelle und lässt es zur weiteren Kohlenstoff- und Energiegewinnung wieder in den TCA-Zyklus einfließen. Das Überleben des Bakteriums in der postexponentiellen Wachstumsphase wird also durch einen funktionstüchtigen TCA-Zyklus gewährleistet [104].

2.3.1 Die Kohlenstoff-Katabolit-Repression

Viele der uns bekannten Bakterienarten haben die Fähigkeit, sich an unterschiedliche Umwelteinflüsse anzupassen. Ein Mechanismus, der ihnen dabei hilft, ist die Kohlenstoffkatabolitenrepression („*carbon catabolite repression*“) (CCR). Ist mehr als nur eine Nährstoffquelle vorhanden, so ermöglicht die CCR den Bakterien die zu präferierende Kohlenstoffquelle bevorzugt zu metabolisieren [26]. So favorisieren Staphylokokken Glukose als bevorzugte Nährstoffquelle, auch wenn sie prinzipiell dazu in der Lage sind, andere Kohlenstoffquellen wie Aminosäuren zu verwenden [48]. Die CCR ist also der effizienteste Weg, um die bestmöglichen Wachstumsbedingungen für *S. aureus* zu schaffen und das Überleben zu sichern. Neben diesem evolutionären Hintergrund besitzt die CCR auch einen ökonomisch wichtigen Hauptaspekt: das Bakterium soll unter möglichst wenig Aufwand die bestmögliche Kohlenstoffquelle

über nur einen aktiven Stoffwechselweg metabolisieren und dennoch die maximale Energie generieren [39].

Das „Carbon Catabolite Protein A“ (CcpA) spielt nicht nur eine zentrale Rolle in der CCR, sondern ist auch für die Expression von verschiedenen Virulenzfaktoren verantwortlich [126]. Dieses Protein ist Mitglied der LacI/GaIR Familie von Transkriptionsregulatoren, die den Kohlenstoffmetabolismus in Gram-positiven Bakterien, mit niedrigem Guanin-Cytosin Gehalt, kontrollieren [64, 96, 99]. In Gegenwart von Glukose als bevorzugte Kohlenstoffquelle, werden Gene des TCA-Zyklus, die zur Metabolisierung von sekundären Nährstoffen (z.B. Acetat) dienen, reprimiert, während Gene für die Aktivität der Glykolyse hochreguliert sind [65]. Gene, die in der exponentiellen Phase einer in einem glukosehaltigem Medium kultivierten *S. aureus* Zellen reprimiert werden, sind z.B. *citB* und *citZ*, die für die Enzyme Aconitase und Citrat-Synthase kodieren [102]. Erst wenn Glukose nicht mehr oder nur noch wenig als Nahrungsquelle vorliegt, werden Gene des TCA-Zyklus hochreguliert, damit weniger bevorzugte Kohlenstoffquellen von *S. aureus* metabolisiert werden können. Durch den TCA-Zyklus kann sich das Bakterium also gut an einen Wandel im Nährstoffangebot adaptieren [110].

2.3.2 Die Rolle von *ptsH* in der CCR

Eng verknüpft mit der CCR ist das sogenannte Phosphotransferasesystem (PTS). Dieses System ist für die Aufnahme von Kohlenhydraten und deren Phosphorylierung zuständig. Phosphoenolpyruvat (PEP), ein Intermediat der Glykolyse, dient als energiereicher Phosphatdonator und kann als solcher eine Protein-Phosphorylierungskaskade aktivieren [26]. Im Jahre 1964, als Kundig *et al.* das PTS entdeckten, ging man davon aus, dass die Funktion einzig und alleine auf den Zuckertransport und die Phosphorylierung der aufgenommenen Zucker beschränkt ist. Heute, über 50 Jahre später, sind noch viele weitere Aufgaben des PTS erforscht, die man in metabolische sowie regulatorische Funktionen einteilen kann. Die metabolische Funktion bezieht sich auf den Zuckertransport, wohin gegen die regulatorische Funktion physiologische Prozesse, wie zum Beispiel Biofilmbildung und die Regulation der Virulenz, einschließt [96].

Die zentralen Komponenten des PTS sind die beiden Phosphotransferasen Enzym I (E1) und Enzym II (E2) sowie das durch *ptsH* kodierte, hitzestabile Histidin-haltige Phosphatträger-Protein (HPr) [4]. Die löslichen Proteine HPr und E1 liegen im Cytosol vor, während E2 eine membrangebundene, kohlenhydratspezifische Komponente ist [52].

Das durch *ptsI* kodierte Enzym 1 katalysiert die Übertragung einer Phosphatgruppe von PEP auf HPr am Histidin 15 (P-His-HPr) [17]. Dieses phosphorylierte HPr kann die Phosphatgruppe nun auf das Enzym 2 übertragen, welches energieabhängig ein Zuckermolekül phosphoryliert und in die Zelle transloziert [37, 87, 102].

HPr ist ein bifunktionelles Protein, denn es ist nicht nur an der Zuckeraufnahme im PTS beteiligt, sondern hat außerdem noch Einfluss auf die CCR. Durch die HPr-Kinase/Phosphatase (HPrK/P) kann HPr am Serinbaustein 46 (Ser-46) phosphoryliert werden. Die Aktivierung der HPrK/P wird durch das anfallende Zwischenprodukt der Glykolyse, Fructose-1,6-Bisphosphat, reguliert [98]. Das entstandene P-Ser-HPr ist in der Lage, als Co-Faktor an CcpA zu binden. Dieser HPr-CcpA Komplex stimuliert die CcpA Bindung an sogenannte *cre*-Sequenzen der Zielgene im Bakteriengenom und verändert über diesen Mechanismus deren Transkription [75].

Basierend auf dem für *Bacillus subtilis* aufgestellten Modell [33] wird auch für *S. aureus* davon ausgegangen, dass der HPr-CcpA-Komplex über Bindung an Promotoren der TCA-Gene den TCA-Zyklus herunterreguliert, sofern *S. aureus* ausreichend Glukose zur Verfügung steht. Auf diese Art ist die Zuckeraufnahme mittels PTS eng mit der Regulation der Stoffwechselaktivitäten der Glykolyse und des TCA-Zyklus verknüpft.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass HPr, abhängig von der Phosphorylierungsstelle, unterschiedliche Funktionen besitzt. In der CCR fungiert das Protein als Co-Regulator von CcpA als Repressor des TCA-Zyklus und im PTS besitzt es eine elementare Rolle als Phosphatträger-Protein. Beide Systeme, CCR und PTS, sind durch HPr eng miteinander verknüpft (Abbildung 6).

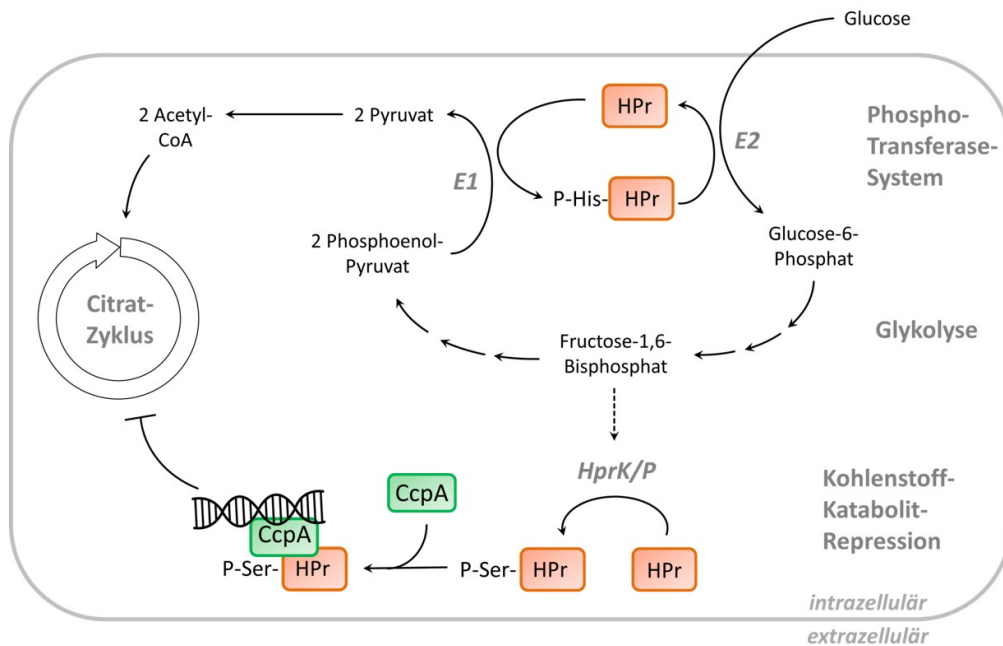


Abbildung 6: Die Interaktion zwischen dem Phosphotransferase System (PTS) und der Kohlenstoff-Katabolit Repression (CCR).

Glukose wird über das Enzym E2 in die Zelle eingeschleust, indem Phosphat durch E1 von PEP auf HPr übertragen wird, dann durch E2 von P-His-HPr auf das Zuckermolekül. Die Glukose wird in der Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt, was als Substrat für den TCA-Zyklus verwendet werden kann. Während der Glykolyse entsteht Fructose-1,6-Bisphosphat. Dieses Intermediat regt die HPr-Kinase/Phosphatase (HPrK/P) an, HPr zu P-Ser-HPr zu phosphorylieren. P-Ser-HPr kann als Co-Repressor eine Verbindung mit dem Protein CcpA eingehen und den TCA-Zyklus herunterregulieren. Dadurch wird die Glukose nicht vollständig katabolisiert und Acetat bzw. Lactat freigesetzt. Mit freundlicher Genehmigung von E. Kirch [58].

2.4 Zusammenhang zwischen Virulenz und Stoffwechsel

Die Virulenz und der bakterieneigene Stoffwechsel sind in *S. aureus* eng miteinander verknüpft [110]. Dies ist ein Grund, weshalb *S. aureus* eines der anpassungsfähigsten Pathogene ist. In den USA sterben mehr Menschen an einer Infektion durch dieses Bakterium als an AIDS [27]. Es wird angenommen, dass der Erfolg von *S. aureus* darin besteht, sich schnell an Veränderungen in der Umwelt zu adaptieren und gleichzeitig die Expression einer großen Anzahl an Virulenzfaktoren zu regulieren [27]. Verschiedene metabolische Regulatoren, die in Abhängigkeit des metabolischen Status nicht nur die Physiologie der Zelle, sondern auch die Expression von Virulenzfaktoren beeinflussen, sind z.B. CcpA, das catabolite control protein E (CcpE), der auf Intermediate des Pentosephosphatwegs reagierende Transkriptionsfaktor RpiRc, sowie der auf verzweigt-kettige Aminosäuren und GTP reagierende Regulator CodY [33, 47, 107].

CcpA gilt als der Masterregulator der Kohlenstoffkatabolitrepression in Gram-positiven Bakterien [24]. Der Transkriptionsfaktor ist in *S. aureus* maßgeblich daran beteiligt, abhängig von der vorherrschenden Nährstoffsituation die Transkription von Virulenzgenen zu beeinflussen. Seidl *et al.* zeigten mithilfe von Proteom- sowie Transkriptomanalysen, dass CcpA ein großes Regulon kontrolliert, zu dem eine Reihe wichtiger Virulenzfaktoren gehören [102]. So konnte in einer *ccpA*-Deletionsmutante gezeigt werden, dass *RNIII*, das Effektormolekül des *agr* Locus, bei Abwesenheit von CcpA runter reguliert wurde. Des Weiteren beeinflusst CcpA direkt oder indirekt die Transkription wichtiger Virulenzgene wie *hla*, welches für die Expression von α -Hämolysin kodiert, *spa* (kodierend für Protein A) oder *tst* (kodiert für das Toxische-Schock-Syndrom-Toxin 1, TSST-1) [100]. Darüber hinaus ist CcpA an der Biofilmbildung beteiligt, denn das Protein besitzt einen aktivierenden Einfluss auf die Transkription der *ica*-Gene, die an der „polysaccharide intercellular adhesin“ (PIA)-abhängigen Biofilmbildung beteiligt sind [101]. Das *ica* (*intercellular adhesion locus*)-Operon (*icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*) kodiert für Proteine der PIA-Synthese [36].

Eine wichtige Funktion von CcpA für die Virulenz von *S. aureus* konnte auch in verschiedenen murinen Infektionsmodellen beobachtet werden. So konnten Li und Kollegen [62] zeigen, dass eine Deletion von *ccpA* in *S. aureus* in einem murinen Abszessmodell zu einer signifikant verringerten bakteriellen Last in der Leber, aber nicht in der Niere der infizierten Tiere, führte. Eine besondere Bedeutung für die Virulenz von *S. aureus* scheint CcpA aber insbesondere bei hohen Blutzuckerspiegeln auszuüben [9]. So konnten Bischoff *et al.* [9] anhand von Mäusen mit genetisch bedingt erhöhten Blutglukosewerten und einer *S. aureus ccpA*-Deletionsmutante zeigen, dass die Inaktivierung von *ccpA* in normoglykämischen Tieren zu verringerten Infektionssymptomen führt. Die hyperglykämischen Tiere zeigten im Vergleich mehr Krankheitszeichen. Beide *in vivo* Befunde sprechen dafür, dass die Modifikation der CCR durch CcpA einen Einfluss auf die Virulenz von *S. aureus* hat.

Ein weiterer wichtiger Regulator des Kohlenstoffwechsels in *S. aureus* ist das Protein CcpE, das die Transkription verschiedener TCA-Zyklus Gene kontrolliert und zur Familie der LysR-Typ Transkriptionsregulatoren gehört [49]. Wie CcpA besitzt CcpE neben der metabolischen Regulation auch eine Funktion in der Regulation von Virulenzfaktoren. In Anwesenheit von Glukose reguliert CcpE beispielsweise die Transkription verschiedener Exotoxine, wie *hla* oder *psma* (kodiert für das phenollösliche Modulcluster α) und beeinflusst die Kapselproduktion [50].

RpiRc ist ein weiterer transkriptioneller Regulator, der, ähnlich wie CcpA, eine Verbindung zwischen Metabolismus und Virulenzregulation in *S. aureus* herstellt [136]. Das zur RpiR Familie gehörige Protein reguliert zum einen in der exponentiellen Wachstumsphase die Expression verschiedener Gene, die für Proteine des Pentose-Phosphat-Wegs kodieren [136]. Zum anderen moduliert RpiRc die Aktivität des TCA-Zyklus, der Glykolyse und der Synthesewege für verschiedene Aminosäuren [5]. Ferner hat RpiRc großen Einfluss auf die Produktion von Virulenzfaktoren. So arbeitet RpiRc mit globalen Regulatorsystemen wie dem *agr*-System, dem *sar*-Locus und dem alternativen Sigmafaktor B

zusammen, um die Transkription und Synthese von Virulenzfaktoren zu modulieren [34]. Anhand einer *rpiRc*- Deletionsmutante konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *rpiRc* eine erhöhte *RNAlIIII* Transkription zur Folge hat [34]. Folglich hat RpiRc durch *RNAlIIII* einen indirekten Einfluss auf die α - Hämolyisin Produktion (*hla*) und die Kapselbiosynthese [136]. In der Summe wirkt sich RpiRc jedoch attenuierend auf die Infektiösität von *S. aureus* aus, was in verschiedenen murinen Tiermodellen bestätigt wurde [5, 33].

Vergleichbar mit CcpA ist CodY ebenfalls ein Repressor des TCA-Zyklus, da das Protein in der Lage ist, das Gen *citB* direkt zu reprimieren. Die DNA- Bindeaffinität und die Aktivität des Regulators wird durch verzweigtkettige Aminosäuren, sogenannte „*branched chain amino acids*“ (BCAA), und GTP beeinflusst [110, 111]. Ein Mangel an BCAA dient als Signal zur Bildung der Alarmone (p)ppGpp. Dieses Molekül löst dann die so genannte *Stringent Response* aus, die den bakteriellen Stoffwechsel an die vorherrschende Nährstoffsituation anpasst [35]. Genau wie CcpA, CcpE und RpiRc ist CodY auch dazu im Stande, die Pathogenität des Bakteriums zu modifizieren. So konnte in dem Gram-positiven Bakterium *Enterococcus faecalis* gezeigt werden, dass eine *codY*-Deletionsmutante in der Ausbildung eines stabilen Biofilms deutlich eingeschränkt war und konsekutiv weniger Katheter-assoziierte Infektionen im Mausmodell hervorrufen konnte [21]. In *S. aureus* hingegen scheint CodY eher einen den Infektionsverlauf mildernden Einfluss zu haben. So konnten *in vivo* Untersuchungen der Arbeitsgruppe Sadaka zeigen, dass eine *codY*-Deletionsmutante, verglichen mit dem Wildtyp, eine verstärkte Inflammation in Form einer Endophthalmitis in Mäusen hervorruft [93]. Es zeigte sich, dass die Inaktivierung von CodY eine erhöhte Produktion von Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel Hämolyisine und Phenol-lösliche Moduline, zur Folge hat [93].

Diese Beispiele an metabolischen Regulatoren zeigen deutlich die enge Verknüpfung von physiologischen Abläufen und der Produktion von Virulenzfaktoren in dem fakultativ pathogenen Bakterium *S. aureus*.

2.5 Mäuse als Modellorganismen

Tierversuche sind in der heutigen Medizin von hoher Bedeutung, um die Wirkung von Substanzen/Therapien in einem dem Menschen ähnlich komplexen Modellsystem untersuchen zu können. Ebenso haben sie eine elementare Funktion bei der Identifikation von Faktoren, die für das Infektionsgeschehen von Bedeutung sind. Tierversuche haben vermutlich im antiken Griechenland bereits ihren Ursprung. So wird berichtet, dass bereits Naturwissenschaftler und Ärzte wie Aristoteles (304 – 322 v. Chr.) und Erasistratus (304 – 258 v. Chr.) Experimente an lebenden Tieren durchführten. Ein weiterer Meilenstein in der Geschichte geht auf den Arzt Galen (229 – 199/217 n.Chr.) zurück, der die Tierversuche nutzte, um ein besseres Verständnis von Anatomie, Physiologie, Pathologie als auch Pharmakologie zu erhalten [47].

In der modernen Wissenschaft stellen Mäuse das mit Abstand am häufigsten verwendete Versuchstier dar [30]. Waterston *et al.* konnten 2002 das komplette Mausgenom sequenzieren und zeigten in einigen Punkten, warum Mäuse als Versuchstiere geeignet sind. Das Mausgenom ähnelt dem Genom des Menschen, so finden sich in der Maus bis zu 80% orthologe Gene des Menschen. Außerdem findet man auf Nukleotidebene ebenfalls eine Übereinstimmung von ca. 40%. Dadurch wird die Maus als Säugetier zum meist genutzten Versuchsmodell, insbesondere um immunologische, physiologische und metabolische Erkenntnisse zu erlangen und diese auf den Menschen zu übertragen [127].

Tabelle 1: Meilensteine der Tierexperimente

Jahre	Wissenschaftler	Meilensteine
1902	William Castle	Beginn der Mäusezüchtung für genetische Studien
1920	Frederick Banting	Isoliertes Insulin von Hunden Erfolgreiche Diabetes Behandlung von Hunden
Ca. 1930	Little und MacDowell	Erste Inzucht-Maus-Linie (20 Brüder x Schwester Paarungen)
1940	John Cade	Entdeckung der Lithiumsalze als Antikonvulsivum in Meerschweinchen, neue Behandlungsansätze der Depression
1976	Rudolf Jaenisch <i>et al.</i>	Entwicklung der ersten transgenen Maus
1980	Viele verschiedene Wissenschaftler	Forschung zur Verbesserung von Medikamentensicherheit, Dosierungsvorschriften für HIV-Medikamente in Rhesusmakaken
1987	Capecchi, Evans und Smithies	Entwicklung der ersten Knockout Maus
1997	Wilmut und Campbell	Erste Klonierung eines Tieres aus einer erwachsenen somatischen Zelle, Dolly das Schaf
2002	Viele verschiedene Wissenschaftler	Mausgenom vollständig sequenziert
2004	Viele verschiedene Wissenschaftler	Rattengenom vollständig sequenziert
2009	Aron Geurts <i>et al.</i>	Entwicklung einer ersten Knockout Ratte

In den vergangenen Jahren entwickelten sich allerdings mehr und mehr Probleme in Hinblick auf die Aussagekraft von Mausmodellen, insbesondere, wenn man die Immunantwort zwischen Menschen und Mäusen vergleicht. In einer Arbeit von Mestas und Hughes zeigten sich große Unterschiede zwischen Entwicklung, Aktivierung und Antwort der angeborenen und adaptiven Immunantwort [71]. Kleine Unterschiede beginnen schon in der Zusammensetzung der Blutbestandteile. Das menschliche Blut besteht zu 50-70% aus neutrophilen Leukozyten, wohingegen die Maus nur 10-25% Neutrophile aufweist [113]. Dementsprechend ist die Lymphozyten Verteilung ebenfalls verändert: 30-50 %

Lymphozyten Anteil im Menschen und nur 10-25% Lymphozyten im Blut der Maus [113]. Die unspezifische oder angeborene Immunantwort ist bei Mäusen bereits vor der Geburt existent und bedient sich erster Abwehrmechanismen, sobald der Körper auf Pathogene trifft. Dazu gehören auch die antimikrobiellen Peptide, so genannte Defensine [91]. Im Menschen werden diese Peptide in großen Mengen durch Neutrophile sezerniert, wohingegen Mäuse diese Peptide nur im Dünndarm, in den Paneth Körnerzellen produzieren können [82]. Diese Divergenz besteht wahrscheinlich durch einen unterschiedlichen evolutionären Druck im Zusammenhang mit einer gänzlich unterschiedlichen Nahrungsaufnahme und somit mikrobiellen Exposition.

Auch die zur Erregerabwehr bei Säugern hervorgerufene Stickstoffmonoxid (NO) Induktion verläuft unterschiedlich. Der Mensch benötigt Interferon- α/β sowie Interleukin 4 als Mediatoren, um die NO Induktion zu starten, wohingegen die Maus Interferon γ und ein Lipopolysaccharid nutzt [71].

Das adaptive oder spezifische Immunsystem spezialisiert sich im Laufe des Lebens auf Pathogene, mit denen es bereits in Kontakt gekommen ist, um diese bei erneuter Infektion gezielt abzutöten. Das adaptive Immunsystem besteht aus zellulären Mechanismen, den Lymphozyten und aus humoralen Mechanismen, den Immunglobulinen (Ig). Auch hier gibt es diverse Unterschiede zwischen dem Menschen und der Maus, besonders im Immunglobulin Klassenwechsel. Beim Menschen induziert Interleukin 13 (IL-13) den Wechsel von IgG zu IgE und die Differenzierung von B-Zellen, bei der Maus bleibt dieser Effekt hingegen aus [67, 70].

Trotz all dieser negativen Aspekte überwiegen die bereits beschriebenen positiven Punkte, weshalb Experimente an Mäusen auch weiterhin eine große Bedeutung haben. In dieser Dissertation wurden die Mäuse im Speziellen eingesetzt, um den Einfluss von HPr/CcpA auf die Abszessbildung nach Staphylokokken-Invasion genauer zu untersuchen.

2.6 Ziele dieser Arbeit

Das durch das *ptsH* Gen kodierte Histidin-haltige Phosphatträger Protein (HPr) ist in verschiedenen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien wie *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis* bereits gut erforscht. In Gram-positiven Bakterien besitzt HPr neben einer metabolischen Funktion im Phosphotransferasesystems (PTS) zur Zucker/Nährstoffaufnahme ebenfalls eine regulatorische Funktion, als Co-Repressor des TCA-Zyklus, in der Kohlenstoffkatabolitenrepression (CCR). Damit führt dieses bifunktionelle Protein zu einer engen Verknüpfung dieser beiden Prozesse. Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung von HPr in Hinblick auf das Wachstumsverhalten, den Kohlenstoffmetabolismus und die Virulenz in dem Gram-positiven, opportunistischen Erreger *S. aureus* zu untersuchen. Insbesondere ein verbessertes Verständnis der engen Verbindung zwischen Virulenz und Metabolismus kann dazu beitragen, neue Strategien zur Behandlung von Infektionen durch das Bakterium zu entwickeln.

Dazu sollten in dieser Arbeit der *S. aureus* Wildtypstamm Newman, isogene *ccpA* und *ptsH* Deletionsmutanten, eine Newman-*ptsH_ccpA* Doppelmutante, eine sogenannte Newman-*ptsH** Mutante, sowie eine Newman-*ptsH* Komplementante vergleichend charakterisiert werden. Bei der Newman-*ptsH** Mutante wurde in der Nukleotidsequenz von *ptsH* eine gezielte Punktmutation eingefügt, die dazu führt, dass das Serin 46 von HPr durch Alanin ersetzt wird. Dadurch sollte das bifunktionelle Protein HPr weiterhin im PTS aktiv, aber in der CCR funktionell beeinträchtigt sein und somit die jeweilige Wirkung von HPr einzeln untersucht werden können. Außerdem sollte die Frage, ob HPr eine CcpA-unabhängige Funktion in der CCR hat, adressiert werden. Durch vergleichende Messung der optischen Dichten und der pH-Werte sollten die Wachstumsparameter der einzelnen Stämme miteinander verglichen werden. Des Weiteren sollten durch Untersuchungen des extrazellulären Metaboloms in Hinblick auf Glukose, Acetat und Ammonium Rückschlüsse auf den Glukose-Import und den Kohlenstoffmetabolismus gezogen werden. Anhand von Transkriptionsanalysen mittels quantitativer, Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) sollte der Einfluss dieser Regulatoren auf relevante metabolische Gene (*citB*, *pckA*) als auch auf Virulenz-assoziierte Gene (*RNAIII*, *hla*, *spa*) in verschiedenen Wachstumsphasen analysiert werden. Schließlich sollte die *in vivo* Relevanz von HPr mit einem murinen Abszessmodell bestimmt werden. Hierbei sollte der Infektionsverlauf durch tägliche Beobachtung von Aussehen, Verhalten und Gewichtsverlauf bewertet und an Tag 4 *post infectionem* die bakterielle Last in den inneren Organen bestimmt werden.

2.7 Fragestellung

1. Beeinflusst die Deletion von *ptsH* das Wachstumsverhalten von *S. aureus*?
2. Wie wirkt sich die Deletion von *ptsH* auf den Glukose-Import und den Kohlenstoffmetabolismus in *S. aureus* aus und wie wirkt sich die Deletion von *ptsH* auf die CCR und die den Citratzyklus regulierenden Gene *citB* und *pckA* aus?
3. Welchen Einfluss hat die Deletion von *ptsH* auf die Expression der Virulenz assoziierten Gene *RNAIII*, *hla* und *spa*.
4. Wie wirkt sich die Deletion von *ptsH* in *S. aureus* auf die Abszessbildung in einem murinen Abszess-Modell aus?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Name	Beschreibung	Referenz
Newman (HOM 003)	Wildtyp; Laborstamm mit eine Punktmutation in <i>saeS</i>	[66]
Nm- <i>ptsH</i> (HOM 358)	Markerfreie Deletion von <i>ptsH</i> in Newman; <i>ptsH::lox72</i>	[58]
Nm- <i>ccpA</i> (HOM 169)	Deletion von <i>ccpA</i> in Newman; Tet ^R <i>ccpA::tetL</i>	[100]
Nm- <i>ptsH_ccpA</i> (HOM 360)	Deletion von <i>ccpA</i> und <i>ptsH</i> in Newman; Tet ^R <i>ccpA::tetL ptsH::lox72</i>	[58]
Nm- <i>ptsH*</i> (HOM 361)	Basensubstitution (T136G) im <i>ptsH</i> Gen in Newman; Tet ^R <i>ptsH::lox72 pBT ptsH1</i>	[58]
Nm- <i>ptsH_ptsH</i> (HOM 362)	Komplementierte <i>ptsH</i> Deletionsmutante; Tet ^R <i>ptsH::lox72 pBT ptsH</i>	[58]

3.1.2 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Name	Hersteller
7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophorese- Netzgerät EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Elektrophorese- Kammer mit Zubehör	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Homogenisator Polytron System PT1200E	Kinematic AG, Luzern
FastPrep FP120	Qbiogene, Heidelberg
Inkubationsschüttler Multitron II	Infors HAT, Bottmingen
Isofluoran-Zerstäuber mit Narkosebox	Harvard Apparatus, Holliston
Luftbefeuchter UH800E	De Longhi Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Magnetrührer IKA-Combimag-RET	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mauskäfig	Tecniplast S.P.A, Buguggiate
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Karlsruhe
PCR-Cycler Gene AMP PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
pH Meter PHM220	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Photometer Gene Quant 1300	Biochrom AG, Berlin
Pipetboyacu	Integra Biosciences GmbH, Biebertal
Sterilsicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau
UV-Tisch und Geldokumentations-Apparatur	Peqlab, Erlangen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York
Waage PC440	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Zentrifugen	Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen
- Z233MK-2 (Tischkühlzentrifuge)	GMI, Ramsey
- Sorvall RC-5B	Eppendorf AG, Hamburg
- Centrifuge 5418	
- 4K15 (Kühlzentrifuge)	Sigma, Osterode am Harz

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

3.1.3.1 Chemikalien und Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Nährmedien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Nährmedien

Bezeichnung	Hersteller
Ammoniumsulfat	Firma r-biopharm, Darmstadt
β- Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Bioenzym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Bacto™ Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto™ Tryp Soy Brother (TSB)	Becton Dickinson, Heidelberg
Blutagarplatte (TSA-Schafsblut 5%)	Becton Dickinson, Heidelberg
Carprofen 50 mg/ml	Pfizer, Berlin
D-Glukose	Firma r-biopharm, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ethanol 100%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol 70%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Grüssing, Filsum
Formalin 4%	AG Tschernig, UKS Homburg
Forene ® 100% (Isofluran)	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Kaliumchlorid	VWR, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
LiChrosolv® Wasser	Merck, Darmstadt
Loading Dye	Fermentas, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR, Darmstadt
Natriumchlorid 0,9%	B. Braun, Melsungen
Rompun 2%	Bayer Health Care, Leverkusen
Selektionsplatte: TSA-Agar mit 5 µg/ml Tetrazyklin	Becton Dickinson, Heidelberg
SYBR®Gold	Invitrogen, USA
SYBR®Green	Life Technologies, USA
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Ursotamin 100mg/ml (Ketamin)	Serumwerk, Bernburg

3.1.3.2 Chemikalienkits

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalienkits sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Chemikalienkits

Bezeichnung	Hersteller
Ammonium Testkombination	r-biopharm, Darmstadt
D-Glukose Testkombination	r-biopharm, Darmstadt
Essigsäure Testkombination	r-biopharm, Darmstadt
FastStart High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
High-Capacity cDNA reverse Transkription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
NucleoSpin® RNA II Kit	Machery-Nagel, Düren
Power SYBR™ Green PCR-Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt
Turbo-DNA-free™ Kit	Ambion, Austin

3.1.3.3 Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Verwendete Puffer, Lösungen und Antibiotika

Bezeichnung	Zusammensetzung
Analgetikum	100 µl Carprofen (50mg/ml) 9,9 ml NaCl-Lösung (0,9%)
Narkotikum	1 ml Ursotamin (Ketamin 100mg/l), 0,5 ml Rompun (Xylazin 2%) Ad. 10 ml NaCl-Lösung (0,9%)
1x PBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,42 g Na ₂ HPO ₄ 0,271 g KH ₂ PO ₄ Ad. 1l H ₂ O _{mill} / pH 7,3
TE-Puffer (in H ₂ O _{mill} / pH8)	10 mM Tris-HCl 1 mM TSB
Antibiotikum	5 µg/ml Tetrazyklin

3.1.3.4 Primer

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer sind Tabelle 7 zu entnehmen. Die Primer wurden von dem Hersteller MWG-Eurofins bezogen.

Tabelle 7: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Target Gen
RT-HOM 1	CAAGATCATCAAGTGCCTATTCGT	<i>citB</i>
RT-HOM 2	CGTGATTACCACGTCTTGAACC	<i>citB</i>
RT-HOM 7	AACCCGGTATATGGCAATCAACT	<i>hla</i>
RT-HOM 8	CTGCTGCTTTCATAGAGCCATTT	<i>hla</i>
RT-HOM 33	GACTGATGCCGATGTGGA	<i>gyrB</i>
RT-HOM 34	AACGGTGGCTGTGCAATA	<i>gyrB</i>
RT-HOM 47	CACGGCTGGAATAAAAACGG	<i>pckA</i>
RT-HOM 48	TGCATAGCAGCCACCTTCG	<i>pckA</i>
RT-HOM 79	AGGAGTGATTTCAATGGCACAAG	<i>RNAlII</i>
RT-HOM 80	TGTGTCGATAATCCATTTTACTAAGTCA	<i>RNAlII</i>
RT-HOM 119	CGTGCTACAATGGACAATACAAA	<i>16s rRNA</i>
RT-HOM 120	ATCTACGATTACTAGCGATTCCA	<i>16s rRNA</i>
RT-HOM 136	TACTTATATCTGGTGGCGTAA	<i>spa</i>
RT-HOM 137	GGTCGTCCTTAAGACTTTGA	<i>spa</i>

3.1.3.5 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96-Well Rundboden Mikrotiterplatte	Greiner bio-one, Frickenhausen
Bepanthen Augensalbe	Bayer Health Care, Leverkusen
Chirurgisches Besteck	Keine Angabe
Cryo-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Desinfektionstücher	Loftex, Bremen
Falcon (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
FastPrep®Lysing Matrix B, 2 ml Röhrchen	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege
Filterspitzen Biosphere® (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Flusskammer-Set	Stovall Life Science, USA
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	CorningCostar, Wiesbaden
Impfshlingen (1 µl, 10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen (17G, 20G, 27G)	Braun, Melsungen
Kompressen	Lohmann und Rauscher, Neuwied
Korkplatte	Keine Angabe
L-Spatel	Keine Angabe
Nitrile-Handschuhe	Sempermed®, Wien
NucleoSpin® RNA II Filter	Machery-Nagel, Düren
Parafilm	Bemis, USA
Petrischalen Becton	Dickinson, Heidelberg
Pipette 20 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette (100 µl, 1000 µl)	Socorex, Ecublens
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Polystyrol-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
qRT-PCR-Platten Applied Biosystems GeneAmp™	Life Technologies, USA
Reaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß Cellstar® Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
RNAse-freie Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml)	Braun, Melsungen
Styroporbox	Keine Angabe

3.1.4 Computersoftware

Die in dieser Arbeit verwendete Computersoftware ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Verwendete Computersoftware

Bezeichnung	Entwickler
Applied Biosystem 7000 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., La Jolla
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond

3.2 Methoden

3.2.1 Physiologische Untersuchungen

3.2.1.1 Stammhaltung der verwendeten Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien wurden als Cryokulturen bei -70 °C gelagert. Hierzu wurde das gleiche Volumen einer Übernachtskultur der Bakterien mit Glycerol-Stocklösung (65% (w/v) Glycerol, 100 mM MgSO₄ x 7H₂O, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), Ad. 0,1 l H₂O_{mill}) gemischt und unmittelbar eingefroren.

Vor Versuchsbeginn wurden die Bakterien aus der Cryokultur auf Blutagarplatten oder Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Einzelkolonien wurden für die Beimpfung von Flüssigkulturen verwendet.

3.2.1.2 Erstellung von Wachstumskurven

Um eine Wachstumskurve zu erstellen, wurden am Vorabend Übernachtskulturen in 3 ml Tryptic Soy Broth (TSB) angeimpft und über Nacht 12 Stunden bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Hauptkultur angesetzt, indem die Übernachtskultur in 50 ml TSB auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,05 eingestellt wurde. Die Hauptkultur wurde für zehn Stunden bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Das Verhältnis von Kulturvolumen zu Kolben betrug dabei 1:10. Die optische Dichte stündlich mittels Photometer gemessen. Es wurden ebenfalls stündlich Kulturüberstände der jeweiligen Proben abzentrifugiert (13200 rpm, 2 Minuten) und bei -20 °C in 1,5 ml Gefäße eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt pH-Wert, Acetat-, Glukose- sowie Ammoniumwerte zu bestimmen. Die Wachstumsrate (μ) wurde durch die Formel

$$\frac{\ln OD_2 - \ln OD_1}{t_2 - t_1}$$

berechnet, wobei OD₁ und OD₂ aus Daten der exponentiellen Wachstumsphase zu den zugehörigen Zeitpunkten t₁ und t₂ berechnet wurde. Die Generationszeit jedes Stammes wurde durch die Formel

$$\frac{\ln 2}{\mu}$$

bestimmt.

3.2.1.3 Messungen extrazellulärer Metaboliten

Die Konzentrationsbestimmung von Metaboliten in Kulturüberständen erfolgte enzymatisch mittels der Testverfahren von r-Biopharm nach der Herstelleranleitung. Zur Berechnung des Acetat-, Glukose- und Ammoniumgehaltes wurde zuvor jeweils eine Kalibriergerade im Bereich von 12,5–400 μ M für Glukose, 25–500 μ M für Acetat bzw. 25–300 μ M für Ammonium erstellt. Die Proben wurden zur Messung mit 10 mM Tris/HCl (pH 8) geeignet verdünnt.

Zur pH-Wert Messung wurden 100 µl Probenüberstand in eine 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatte gefüllt. Eine pH-Messelektrode wurde zuvor kalibriert und danach für mehrere Sekunden in die Probe eingeführt, um so den pH-Wert zu ermitteln.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung der Transkription mittels RT- qPCR

3.2.2.1 RNA-Isolierung

Zur RNA Isolierung wurden zu verschiedenen Phasen der Wachstumskurve Zellpellets gewonnen und bei -20 °C gelagert. Diese wurden in 100 µl Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8) resuspendiert und auf OD₆₀₀ 4 eingestellt. Die RNA Isolation wurde mit dem Kit NucleoSpin® RNA II Mini Kit nach Herstellerprotokoll durchgeführt. 505 µl RA1/β-ME-Mix (500 µl RA1 + 5 µl β-Mercaptoethanol) wurden zur Zellsuspension hinzugegeben und gemischt. Der Zellaufschluss erfolgte per FastPrep FP120 in FastPrep® Lysing Matrix B Gefäßen für 2 x 30 Sekunden bei der Geschwindigkeit 6,0. Zwischen den beiden Zyklen wurden die Proben 5 Minuten auf Eis gelagert. Danach wurden die Gefäße bei 15000 g für zwei Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand durch NucleoSpin® Filter in Sammelgefäße überführt. Dieser Überstand wurde erneut bei 11000 g für 1 Minute zentrifugiert. Zum Durchlauf wurden 400 µl 70% Ethanol gegeben und durch Pipettieren gemischt. Das RNA-Ethanol Gemisch wurde dann auf NucleoSpin® RNA II Säulen gegeben und für 30 Sekunden bei 11000g zentrifugiert. Die Säulen wurden in ein neues Sammelgefäß gestellt. Danach wurde 350 µl MDB auf die Säulen gegeben und diese erneut für 1 Minute bei 11000g zentrifugiert. Der DNase Verdau erfolgte mittels 90 µl DNase Reaktionsbuffer. Zu diesem Reaktionspuffer wurden 10 µl DNase I-Lösung hinzugegeben. 95 µl dieser Mischung wurden direkt auf die Säulenmembran appliziert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem DNase Verdau wurden 200 µl RAW 2 auf die Säule gegeben und für 30 Sekunden bei 11000g zentrifugiert. Analog dazu wurden danach 600 µl RA 3 auf die Säule gegeben und diese wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Danach wurde nochmals 250 µl RA 3 hinzugegeben und für 2 Minuten bei 11000 g zentrifugiert. Als letzter Schritt wurde auf die Membran 60 µl RNase freies Wasser gegeben und für 1 Minute bei 11000g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die eluierte RNA sofort auf Eis gestellt.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mittels NanoDrop System. Das verwendete Volumen betrug 1 µl. Das Agarosegel (0,8% w/v) zur Untersuchung der RNA-Integrität wurde mit 180 ml 0,5 x TBE Puffer und 1,44 Gramm Agarosepulver hergestellt. Die Geltaschen wurden mit 8 µl RNase freiem Wasser, 2 µl Sybr Gold Loading Dye sowie 2 µl RNA Probe befüllt. Pro Gel-Reihe wurde einmal 10 µl 1kb DNA-Ladder als Marker benutzt. Das Gerät wurde wie folgt eingestellt: 125 V, 100 mA für 45 Minuten. Danach wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

3.2.2.2 Turbo-DNase Verdau

Nach der RNA Isolation wurde die gewonnene RNA einem weiteren DNA-Verdau mit dem Kit ambion® TURBO DNA-*free*TM unterzogen. Es wurden 10 µg/45 µl RNA mit 0,1 x 10x TURBO DNase-Puffer, 1 µl DNase sowie 5 µl Nuklease-freies Wasser versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Beifügen von 5 µl DNase Inactivation Reagent und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur gestoppt. Danach wurde das Gemisch für 90 Sekunden bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde die RNA Konzentration wie bereits unter 3.2.2.1 beschrieben, mittels NanoDrop bestimmt.

3.2.2.3 cDNA-Synthese und RT-qPCR

Die reverse Transkription der RNA in cDNA wurde mit dem Kit Applied BiosystemsTM High – Capacity cDNA Reverse Transcription durchgeführt (Tabelle 11). Es wurden 300 ng RNA in einem Ansatz von insgesamt 20 µl eingesetzt.

Das Programm wurde wie in Tabelle 10 eingestellt:

Tabelle 10: RT-PCR Programm zur Umschreibung der RNA in cDNA

	Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)
Priming	25	10
Reverse Transkription	37	120
RT Inaktivierung	85	5

Die cDNA wurde mit 180 µl RNase freiem Wasser versetzt, um eine 1:10 Verdünnung zu erhalten.

Tabelle 11: RT-PCR Reaktionsansatz für 1 Reaktion (Gesamtvolumen 20 µl)

Komponente	Volumen (µl)
RNA	10 µl
10 x RT-Puffer	2 µl
25 x dNTPs (100 mM)	0,8 µl
10 x Random Primer	2 µl
Reverse Transkriptase (50 U/ µl)	1 µl
Nuklease freies Wasser	3,95 µl
RNase Out (40 U/ µl)	0,25 µl

Zu 5 µl der verdünnten cDNA wurde 15 µl Mastermix (10 µl PowerSYBR®Green, 5 µl Primer Mix) hinzugegeben. Für die qPCR wurde ein Ansatz mit 15 ng cDNA/µl gewählt. Die Messung der Transkription erfolgte mittels Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System. Dabei wurden je Ansatz zwei technische Replikate erstellt. Als Referenzgen und interne Kontrolle diente *gyrB* (1:10 Verdünnung). Als Zielgene wurden *pckA* (1:10 Verdünnung), *citB* (1:10 Verdünnung), *spa* (1:10 Verdünnung), *RNA III* (1:200 Verdünnung) und *hla* (1:10 Verdünnung) untersucht. Als Negativkontrolle diente jeweils Wasser. Die Effizienz der PCR-Reaktionen wurde durch Verdünnungsreihen doppelt bestimmt und ergab vergleichbare Werte von 97,6 % - 105,4 %. Insgesamt wurden drei biologische Replikate untersucht. Das genutzte Programm ist der Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Einstellung des Programms für die qPCR

Zyklen	Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Sekunden)
1	Polymerase-Aktivierung Initiale Denaturierung	95	600
40	Denaturierung	95	15
	Annealing	60	60
1	Schmelzkurve	95	15
1	Schmelzkurve	60	20
1	Schmelzkurve	95	15

Die Transkriptionslevel der Zielgene wurden gegen die mRNA-Konzentration des Haushaltsgens *Gyrase B* nach der $2^{-\Delta CT}$ -Methode normalisiert [84].

Die relative Expression wurde durch die Formel

$$2^{-\Delta CT}$$

berechnet.

Hierbei gilt: $\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}(gyrB)}$. Es wurden jeweils die Mittelwerte der technischen Duplikate verwendet.

3.2.3 Murines Abszessmodell

3.2.3.1 Organismen und Haltungsbedingungen für die Tierversuche

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden nach Vorlage des Tierschutzantrags 60/2015 beim Landesamt für Soziales, Saarbrücken, Saarland genehmigt. Alle Versuche wurden entsprechend den tierschutzrechtlichen Bestimmungen am Universitätsklinikum des Saarlandes im Tierstall des Gebäudes 43 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene durchgeführt. Für das murine Abszessmodell wurden weibliche Mäuse der Linie C57BL/6N (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) genutzt. Zum Lieferzeitpunkt betrug das Alter der Mäuse sechs bis sieben Wochen und das Gewicht circa 20 Gramm. In Käfiggruppen von minimal drei bis maximal zehn Tieren betrug die minimale Eingewöhnungszeit bis zum Versuchsbeginn sieben Tage. Wasser und Futter wurde den Tieren unbegrenzt zur Verfügung gestellt. Die Luftfeuchtigkeit betrug 55% (+/- 20%) und die Raumtemperatur 22 °C (+/- 2 °C). Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden.

3.2.3.2 Herstellung des bakteriellen Inokulums

Zwei Tage vor der geplanten Infektion wurden die Bakterienstämme aus dem Glycerolstock auf Blutagarplatten (WT, Nm-*ptsH*, Nm-*ccpA*, Nm-*ptsH_ccpA*) beziehungsweise auf Tet5 Platten (Nm-*ptsH**, Nm-*ptsH_complementante*) aufgetragen (3-Ösen-Ausstrich Verfahren) und über Nacht für 16 Stunden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Am Vorabend der Infektion wurden aus den ausgestrichenen Bakterien Übernachtskulturen (ÜNK) hergestellt, die am Infektionstag zur Inokulumherstellung benötigt wurden. Die Bakterien wurden in 2 ml TSB angeimpft und über Nacht (ca. 12 Stunden) bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Am Infektionstag (Tag 1) wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) der ÜNK mit einer 1:20 Verdünnung bestimmt und im Anschluss daraus eine 10 ml Hauptkultur (HK) erstellt, die auf die OD_{600} 0,05 eingestellt wurde. Danach wurde die OD_{600} der HK unverdünnt überprüft. Die Kultur wurde für zwei Stunden bei 37 °C und 225 rpm inkubiert, und die OD_{600} mit einer 1:10 Verdünnung geprüft. Anschließend wurde die Kultur 10 Minuten bei 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 1x PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml großes Gefäß (Eppendorf, Deutschland) überführt und erneut für 2 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Danach wurde das Pellet erneut in 1 ml 1x PBS aufgenommen und die OD_{600} mit einer 1:20 Verdünnung bestimmt. Das den Mäusen retroorbital injizierte Inokulum wurde auf die OD_{600} 0,12 in 4 ml 1x PBS eingestellt und die darin enthaltene Bakterienanzahl überprüft.

Zur CFU Bestimmung wurde die Methode einer seriellen Verdünnungsreihe in 1xPBS angewandt. Hierzu wurden 1:10 Verdünnungen der Bakteriensuspensionen mit einem Gesamtvolumen von 1000 µl in Reaktionsgefäßen vorbereitet. Dann wurden serielle Verdünnungsreihen der Suspensionen bis zur 6. Verdünnungsstufe hergestellt und aus der vierten, fünften sowie sechsten Verdünnungsstufe jeweils 100

µl auf Blutagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C für 16 Stunden über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt. Die Ziel-CFU betrug 1×10^7 CFU/100 µl.

3.2.3.3 Retroorbitale Infektion

Pro Tier wurden je 100 µl der jeweiligen Bakteriensuspensionen in eine 1 Milliliter Spritze aufgezogen, wobei Kanülen in Größe 27 Gauge zur Applikation verwendet wurden. Analog zum obigen Vorgehen, wurden 200 µl Analgetikum (Carbofen 5mg/kg Körpergewicht in 0,9% NaCl) vorbereitet, welches den Tieren unmittelbar nach der Infektion in die Nackenfalte appliziert wurde. Die Anästhesie der Tiere erfolgte jeweils einzeln unter Spontanatmung mittels Isofluran 3,5 - 4%, für circa zwei Minuten bei einer Sauerstoffflussrate von 1 l/min in einer Narkosebox.

Sobald das Tier ausreichend narkotisiert war, wurde die Lagerung zur Infektion unter der Sicherheitswerkbank vorbereitet. Die Narkosetiefe wurde mittels Zwischenzehreflex überprüft. Die Maus lag in Linksseitenlagerung mit dem Kopf nach rechts, sodass mit dem linkem Zeigefinger und dem Daumen der linken Hand das rechte Auge fixiert wurde, um einen leichten Druck nach *occipital* auf den gesamten Schädel auszuüben, ohne den Blutfluss in den umliegenden Gefäßen zu beeinträchtigen. Dieser Druck protrahierte den Bulbus aus der *Orbita* und ermöglichte so den bestmöglichen Zugangsweg zum retroorbitalen venösen Sinus, in den die Bakteriensuspension von 100 µl injiziert wurde. Hierbei wurde mit der rechten Hand die 1 Milliliter Spritze umfasst und die Kanüle, mit ihrer abgeschrägten Seite nach unten, am medialen Augenwinkel, im 30° Winkel eingeführt, ohne die *Cornea* zu berühren. Die Kanüle wurde entlang des Bulbus soweit eingeführt, bis die Nadelspitze den Orbitaboden erreichte. Die korrekte Positionierung der Injektionsnadel ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Dann wurde die Bakteriensuspension langsam in den retroorbitalen Sinus injiziert. Die Nadel wurde unter der Injektion langsam zurückgezogen um ein Verteilen im Venengeflecht zu ermöglichen.

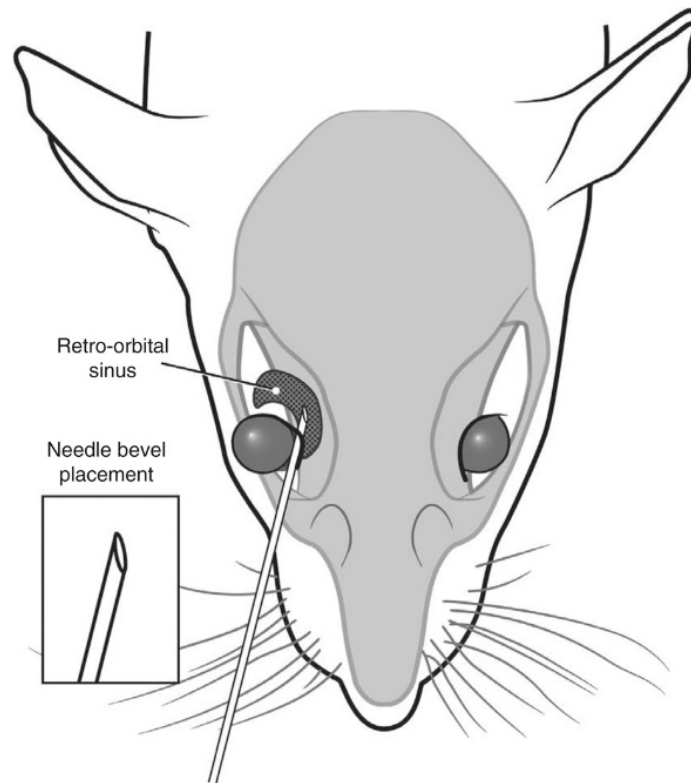


Abbildung 7: Retroorbitale Injektion.

Die Injektion von 100 µl Inokulum erfolgte in den retroorbitalen Sinus unter volatiler Narkose [132].

Nach der Infektion wurden die Tiere zur eindeutigen Identifikation farblich am Schwanz markiert. Anschließend wurde das Gewicht mit Hilfe einer Waage bestimmt. Danach wurden die Mäuse jeweils nach den injizierten Bakterienstämmen getrennt, in Käfige gesetzt. Die genutzten Arbeitsflächen wurden mit Ethanol 70% gereinigt.

3.2.3.4 Kontrolle und Messung des Gewichtes

Täglich wurde der Allgemeinzustand und das Verhalten anhand des Schemas in Tabelle 13 kontrolliert um die Belastungszustände bei der Maus zu untersuchen. Ab einem Belastungsgrad von 3 wurden Tiere aus dem Versuch genommen.

Tabelle 13: Scoringtabelle für das murine Abszessmodell

	0	1	5	10	20
Körpergewicht	Unbeeinflusst oder Anstieg	Abnahme um <5%	Abnahme um 5-10%	Abnahme um 11-20%	Abnahme >20%
Allgemeinzustand	Fell glatt, glänzend, Körperöffnungen sauber, Augen klar, glänzend	Felldefekte (verminderte oder übersteigerte Körperpflege)	Fell stumpf, ungeordnete, ungepflegte Körperöffnungen, erhöhter Muskeltonus, Augen trüb, eingesunken, vermehrtes Zwinkern bei intaktem Auge (Schmerzmittelgabe)	Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnatürliche Körperhaltung, hoher Muskeltonus, Augen trüb, eingesunken mit leichter Verletzung des Auges (Schmerzmittelgabe)	Verkrampfung, Lähmungserscheinungen, Atemgeräusche, Tier fühlt sich kalt an, Augen trüb, eingesunken mit deutlicher Verletzung des Auges
Spontanverhalten	Normales Verhalten (Schlafen, Neugier, Sozialkontakte, Reaktion auf Berührung)	Geringe Abweichung vom Normalverhalten	Ungewöhnliches Verhalten z.B. eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	Selbstisolation, Lethargie, ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypen, Koordinationsstörungen	Schmerzlaute beim Ergreifen, Automutilation
Klinischer Befund	Puls, Atmung, Temperatur normal, Extremitäten warm, Schleimhäute gut durchblutet	Geringe Abweichungen von der Normalsituation		Atmung und Puls deutlich erhöht (30%)	Atmung und Puls deutlich erhöht (50%)

Bewertung und Maßnahmen nach TVV 60/2015: Tiere mit einer Punktzahl von 0 wurden dem „Belastungsgrad 0“ zugeordnet und gelten als nicht durch den Versuch belastet. Der „Belastungsgrad 1“ entspricht einer Punktzahl von 1-10 und damit einer geringen Belastung. Die Tiere wurden weiter beobachtet. Im „Belastungsgrad 2“ (11-19 Punkte) wurde ggf. eine medizinische Versorgung eingeleitet. Im „Belastungsgrad 3“ (>19 Punkte) musste eine medizinische Versorgung eingeleitet und der Leiter des Versuchsvorhabens und/oder die Tierschutzbeauftragte hinzugezogen werden.

3.2.3.5 Tötung, Organentnahme und CFU-Bestimmung

Am vierten Tag nach der Infektion wurden die Tiere in Narkose zur Entnahme von Leber, Nieren und Milz getötet.

Vor Versuchsbeginn wurde die sterile Werkbank bestückt mit:

- Chirurgischem Besteck (zwei spitze Pinzetten, eine stumpfe Pinzette, eine Schere)
- Kanülen Abwurf
- Kadaver Abwurf
- beschriftete Reaktionsgefäße, gefüllt mit 5 ml Formaldehyd 4% (Arbeitsnummer, Organname, Bakterienstamm, Entnahmedatum) für die Verwahrung der linken Niere und Anteil des linken Leberlappens zur späteren histologischen Auswertung
- beschriftete 2 ml Reaktionsgefäße (Arbeitsnummer, Organkürzel) für Milz und rechte Niere
- beschriftete 10 ml Greiner Reaktionsgefäße (Arbeitsnummer, Organkürzel) für ein Stück der Leber
- beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße (Arbeitsnummer, Blut) zur Aufbewahrung des Blutes nach Herzpunktion
- beschrifteten 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Arbeitsnummer, PBS) gefüllt mit 25 µl
1 x PBS zur Durchmischung des gewonnenen Blutes
- Blutagarplatten um einen Blutaussstrich vorzunehmen
- 100 µl Pipette mit gelben Spitzen um das Blut zu mischen und aufzutragen
- Eis Box um die Organe zu kühlen
- Ethanol 70% Sprühflasche
- 1 ml - Spritzen und Kanülen 20 Gauge zur Herzpunktion
- Sechs Kanülen 17 Gauge zur Fixierung der Maus
- Korkplatte umhüllt mit Alufolie
- Papiertücher

Die Narkose erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion. Es wurde pro Tier eine 2 ml Spritze mit 500 µl Narkotikum und 27 Gauge Kanüle vorbereitet. Das Narkotikum wurde in einer Dosis von 10 mg/kg KG Rompun, 100mg/kg KG Ketamin verwendet. Die Maus wurde in der linken Hand in Rückenlage sowie Kopftieflagerung fixiert, um eine Organverlagerung nach *kranial* zu erreichen, damit bei der intraperitonealen Punktion keine abdominalen Organe perforiert werden. Die Punktion erfolgte möglichst *kaudal* im 30 Grad Winkel in den linken unteren abdominalen Quadranten. 200 µl wurden langsam appliziert und die Nadel danach langsam entfernt. Die Tiere wurden nach der Injektion wieder zurück in den Käfig gesetzt, nach 3-4 Minuten war eine ausreichende Narkosetiefe eingetreten. Danach wurde die Maus gewogen und auf der Korkplatte platziert. Mit der stumpfen Pinzette wurde der Zwischenzehenreflex, als Hinweis auf eine ausreichend tiefe Narkose, getestet. Es wurden alle Extremitäten der Maus mit der 17 Gauge Kanüle in der Korkplatte fixiert und der Thorax sowie

Abdomen mit 70% Ethanol desinfiziert. Es erfolgte die Eröffnung des Bauchsitus durch eine Längslaparotomie in kaudocranialer Schnittrichtung mit Pinzette und Schere. Die Laparotomie wird durch eine links parasternale Thorakotomie fortgeführt. Mit einem Kanülen Stich durch die Thoraxwand wurde die Eröffnung auf dem Untergrund fixiert. Der eröffnete Bauchsitus einer Maus ist exemplarisch in Abbildung 8 dargestellt. Eine 20 Gauge Kanüle mit 1 ml Spritze wurde im 30 Grad Winkel in den linken Ventrikel des Herzens eingeführt und langsam Blut aspiriert. Das Blut wurde in das Reaktionsgefäß appliziert und die Kanüle abgeworfen. 25 µl Blut wurden mit der Pipette aufgenommen und in dem mit PBS gefüllten Reaktionsgefäß gemischt. 50 µl des Blut-PBS-Gemischs wurden auf die Blutagarplatte aufgetragen, um nach der Inkubation (über Nacht) bei 37 °C, auf das Vorhandensein einer Bakteriämie rückschließen zu können.

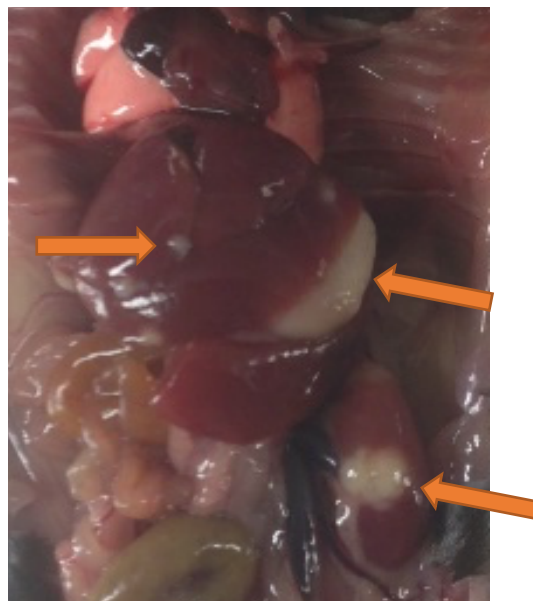


Abbildung 8: Eröffneter Bauchsitus einer Maus.

Oben in hellrot ist die Lunge zu sehen. Unten im Bild sind Darmteile dargestellt. Im Bereich der Leber und der linken Niere sind Abszesse zu sehen.

Durch die Herzpunktion wurde die Maus getötet. Danach erfolgte die Entnahme der linken Niere durch Durchtrennung der Gefäße am Nierenhilum und scharfer Freipräparation der Niere aus der Fettkapsel. Das Organ wurde in Formaldehyd 4% eingelegt und zur histologischen Auswertung gegeben. Anschließend wurde die Milz in gleicher Weise am Milzhilum entnommen und in das vorbereitete Gefäß gegeben. Die rechte Niere wurde analog zur linken Niere freipräpariert und in einem Gefäß ohne Formaldehyd bis zur Bestimmung der bakteriellen Last gelagert. Als letztes Organ wurde die Leber entnommen. Zuerst wurde die *Facies diaphragmatica* vom Zwerchfell abgelöst. Der vordere untere Leberrand wurde angehoben und die Gefäße am *Ligamentum hepaticoduodenale* durchtrennt. Weiteres Freipräparieren erfolgte nach dorsal um die Leber von der *Vena cava* zu lösen. Circa 1/4 der Gesamtlebergröße wurde vom linken Leberlappen abgesetzt und in Formaldehyd 4% zur histologischen

Auswertung eingelegt. Die restliche Leber wurde in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Alle Organe wurden sofort auf Eis aufbewahrt. Während der Organexplantation wurden die Abszessbildungen mittels Blickdiagnostik untersucht und das Ergebnis in Form von semi-quantitativen Angaben (+++/++/+/-) notiert. Der Mausekadaver wurde im Abwurf entsorgt. Die Arbeitsflächen sowie alle Instrumente wurden mit Ethanol 70% desinfiziert.

Das Leergewicht der Reaktionsgefäße wurde vor Explantation tariert, um das Organgewicht ermitteln zu können. Anhand der Formel

$$\frac{\text{Organgewicht}}{0,2} * 0,8$$

konnte das Volumen 1x PBS ermittelt werden, welches zu jedem Reaktionsgefäß inklusive Organ hinzugegeben wurde. Pro 200 mg Organ wurden also 800 µl 1x PBS hinzugegeben. Organ und PBS wurden dann mit Hilfe eines Homogenisators unter der Werkbank zu einer homogenen Masse verarbeitet. Zur CFU Bestimmung von Leber und Niere wurden serielle 1:10 Verdünnungsreihen, bis zur 5. Verdünnungsstufe, der Organ-Homogenisate hergestellt und aus der zweiten, dritten, vierten sowie fünften Verdünnungsstufe jeweils 100 µl auf Blutagarplatten ausplattiert. 100 µl unverdünnte Bakteriensuspension wurde ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht 16 Stunden inkubiert, und anschließend ausgezählt. Die gleiche Prozedur erfolgte für die Milz. Hierbei wurden 100 µl der unverdünnten Bakteriensuspension und die erste Verdünnungsstufe ausplattiert.

Die restlichen Homogenisatproben von Leber und Niere wurden bei 4 °C für 5 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt und bei -70 °C aserviert. Die Milzproben wurden nach der Verdünnungsreihe verworfen.

3.2.4 Statistik

Die Statistiken wurden mit dem Programm GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla) berechnet. Die Signifikanzen wurden folgendermaßen festgelegt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Die Generationszeiten sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die statistische Signifikanz der Generationszeiten gegenüber *S. aureus* Newman und der angegebenen Mutanten ist mit dem one-way ANOVA und Holm-Sidak-Test angegeben.

Die Wachstumsunterschiede während der exponentiellen und postexponentiellen Wachstumsphase zu Stunde zwei, zu Stunde fünf und zu Stunde 12 wurden im Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung überprüft und anschließend in der Varianzanalyse mittels one-way ANOVA auf Signifikanzen getestet, gefolgt von einem post-hoc-Vergleich mittels Holm-Sidak-Test.

Die Parameter Glukose, Acetat und Ammonium sind deskriptiv durch Mittelwert und Standardabweichung beschrieben.

Die relative Genexpression ist deskriptiv mit Mittelwert und Standardabweichung beschrieben.

Die Signifikanz-Analyse der Bakterienlast im murinen Modell wurde für ordinalskalierte Daten mittels one-way ANOVA auf Signifikanzen getestet, gefolgt von einem post-hoc-Vergleich mittels Holm-Sidak-Test.

4 Ergebnisse

4.1 Inaktivierung von *ptsH* bzw. *ccpA* verändert den Wachstums- und pH-Verlauf

Um das Wachstumsverhalten der *S. aureus* Stämme Newman (Wildtyp), Nm-*ptsH*, Nm-*ptsH_ptsH* (komplementierte *ptsH*-Mutante), Nm-*ccpA*, Nm-*ptsH_ccpA* und Nm-*ptsH** untereinander zu vergleichen, wurden Messungen der optischen Dichte und des pH-Wertes durchgeführt. Abbildung 9 zeigt das Wachstumsverhalten der verschiedenen Stämme sowie die pH-Wert Änderung im zeitlichen Verlauf.

Der *S. aureus* Wildtyp Newman und die chromosomal komplementierte *ptsH*-Mutante (Nm-*ptsH_ptsH*) zeigten von der frühen exponentiellen bis zur stationären Wachstumsphase ein nahezu identisches Wachstumsverhalten (Abbildung 9 a, b) mit optischen Dichten bis zu maximal OD₆₀₀ 18. Ebenso ähnelten sich die pH Verläufe beider Kulturen über den gesamten Zeitverlauf (Abbildung 9 c). Die pH-Werte sanken in der *lag* Phase (Stunde 0 - 1) nur langsam ab (7,3 bis 7,2). Die Absinkgeschwindigkeiten wurden dann in der exponentiellen Phase (Stunde 1 – 4) gesteigert, bis nach etwa 5-6 Stunden pH-Minima von 5,9 bis 6,0 in der postexponentiellen Phase erreicht wurden. Anschließend stiegen die pH-Werte wieder stetig an und erreichten mit einem pH von 8,0 nach 12 Stunden Kultivierung in der stationären Wachstumsphase höhere Maxima als die Ursprungswerte (Abbildung 9 c).

Bei der Nm-*ptsH* Deletionsmutante zeigte sich eine Wachstumsverzögerung von der exponentiellen Phase bis in die frühe stationäre Phase im Vergleich zum Wildtyp Newman (Abbildung 9 a, b). Eine exemplarische Darstellung der 2 Stunden Werte aus der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 9 b) zeigt eine um 1,8-fach reduzierte optische Dichte in der Nm-*ptsH* Kultur im Vergleich zum Wildtyp ($p \leq 0,01$, one-way ANOVA). Diese Wachstumsverzögerung spiegelte sich auch in den aus den exponentiellen Wachstumsdaten errechneten Generationszeiten der einzelnen Stämme wider (Tabelle 14), in der die Nm-*ptsH* Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp und der Komplementante eine um ~6 Minuten verlangsamte Verdopplungszeit aufwies. Diese Wachstumsverzögerung ist auch in der post-exponentiellen Wachstumsphase (5 Stunden) ersichtlich, ebenfalls mit einer 1,8-fachen Reduktion der OD₆₀₀ ($p \leq 0,01$, one-way ANOVA) (Abbildung 9 b). Auch in Hinblick auf die pH Kinetik wies die Kultur der Nm-*ptsH* Mutante Unterschiede zu den Kulturen des Wildtyps und der Komplementante auf (Abbildung 9 c). Zu ersehen ist, dass der pH-Wert bei der Nm-*ptsH* Mutante, anders als bei Wildtyp und Komplementante, keinen pH Abfall in der exponentiellen oder postexponentiellen Phase aufwies, sondern konstant blieb, und dann über die Zeit anstieg (Abbildung 9 c).

Die Nm-*ptsH** Mutante wies, verglichen mit dem Wildtyp, in der exponentiellen ($p \leq 0,01$, Abbildung 9 b) und postexponentiellen Wachstumsphase ($p \leq 0,01$, Abbildung 9 b) ebenfalls eine Wachstumsverzögerung auf. Auch in Hinblick auf die Verdopplungszeiten in der exponentiellen Phase zeigte sich bei der Nm-*ptsH** Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine verlängerte Generationszeit ($p < 0,01$, Tabelle 14). Bei dem pH Verlauf der Kulturen zeigte sich für die Nm-*ptsH** Mutante hingegen eine Kinetik, die zwischen den pH Verläufen des Wildtyps und der *ptsH*-Deletionsmutante lag

(Abbildung 9 c). So konnte für die Kulturen der Nm-*ptsH** Mutante in den frühen Wachstumsphasen, ähnlich wie beim Wildtyp, ein pH Abfall beobachtet werden, der mit einem pH Minimum von 6,5 jedoch schwächer ausfiel, als dies bei Wildtyp und Komplementante zu beobachten war.

Vergleicht man die Nm-*ccpA* Mutante und den Wildtyp miteinander, so fiel auf, dass sich beide Stämme in Hinblick auf ihr Wachstumsverhalten nur geringfügig voneinander unterschieden (Abbildung 9 a). Deutlich wurde dies vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 9 b). Im Gegensatz dazu zeigte die Nm-*ccpA*-Mutante im Vergleich zur Nm-*ptsH**-Mutante sowohl in der exponentiellen als auch in der postexponentiellen Wachstumsphase ein unterschiedliches Wachstumsverhalten (Abbildung 9 a, b). Allerdings fiel auf, dass sich beide Kulturen im pH-Verlauf ähneln (Abbildung 9 c).

Ebenso waren bei den Kulturen der Nm-*ccpA*-Mutante Verdopplungszeiten in der exponentiellen Phase von $30 \pm 1,3$ Minuten zu beobachten, die tendenziell dichter an den Verdopplungszeiten der Wildtyp Kulturen ($28,6 \pm 1,9$ Minuten) als an denen der Nm-*ptsH** Kulturen ($33,3 \pm 1,4$ Minuten) lagen (Tabelle 14). Vergleicht man die pH Verläufe der Kulturen, so zeigten die Kulturen der Nm-*ccpA*-Mutante eine pH Kinetik, die sich von der pH Kinetik der Wildtyp Kulturen in Hinblick auf die maximale Ansäuerung des Mediums klar unterschied. So wiesen die Kulturen der Nm-*ccpA*-Mutante pH Minima von um die pH 7 auf, die im Vergleich zum Wildtyp auch erst zu einem späteren Zeitpunkt (7 Stunden) erreicht wurden.

Die Doppelmutante, bei der *ptsH* als auch *ccpA* ausgeschaltet sind, wies ein analoges Wachstumsverhalten während der exponentiellen Phase (Abbildung 9 b) als auch ein ähnliches pH-Verhalten (Abbildung 9 c) auf wie die Nm-*ptsH*-Mutante. Dies lässt sich auch an den fast identischen Generationszeiten von $34,8 \pm 1,6$ Minuten (Nm-*pstH*) und $34,3 \pm 1,0$ Minuten (Nm-*ptsH_ccpA*) erkennen.

Tabelle 14: Ermittelte Generationszeiten

Stamm	Generationszeit [min]^a	p-Wert^b
Newman	28,6 ± 1,9	-
Nm- <i>ptsH_ptsH</i>	27,8 ± 1,3	0,34
Nm- <i>ptsH</i>	34,8 ± 1,6	<0,01
Nm- <i>ptsH_ccpA</i>	34,3 ± 1,0	0,01
Nm- <i>ccpA</i>	30 ± 1,3	0,19
Nm- <i>ptsH</i> *	33,3 ± 1,4	0,01

^aMittelwerte ± Standardabweichung aus sechs unabhängigen Experimenten.

^bStatistische Signifikanz der Generationszeiten gegenüber *S. aureus* Wildtyp Newman und der Mutanten (One-way ANOVA, Post-Hoc-Test: Holm-Sidak-Test).

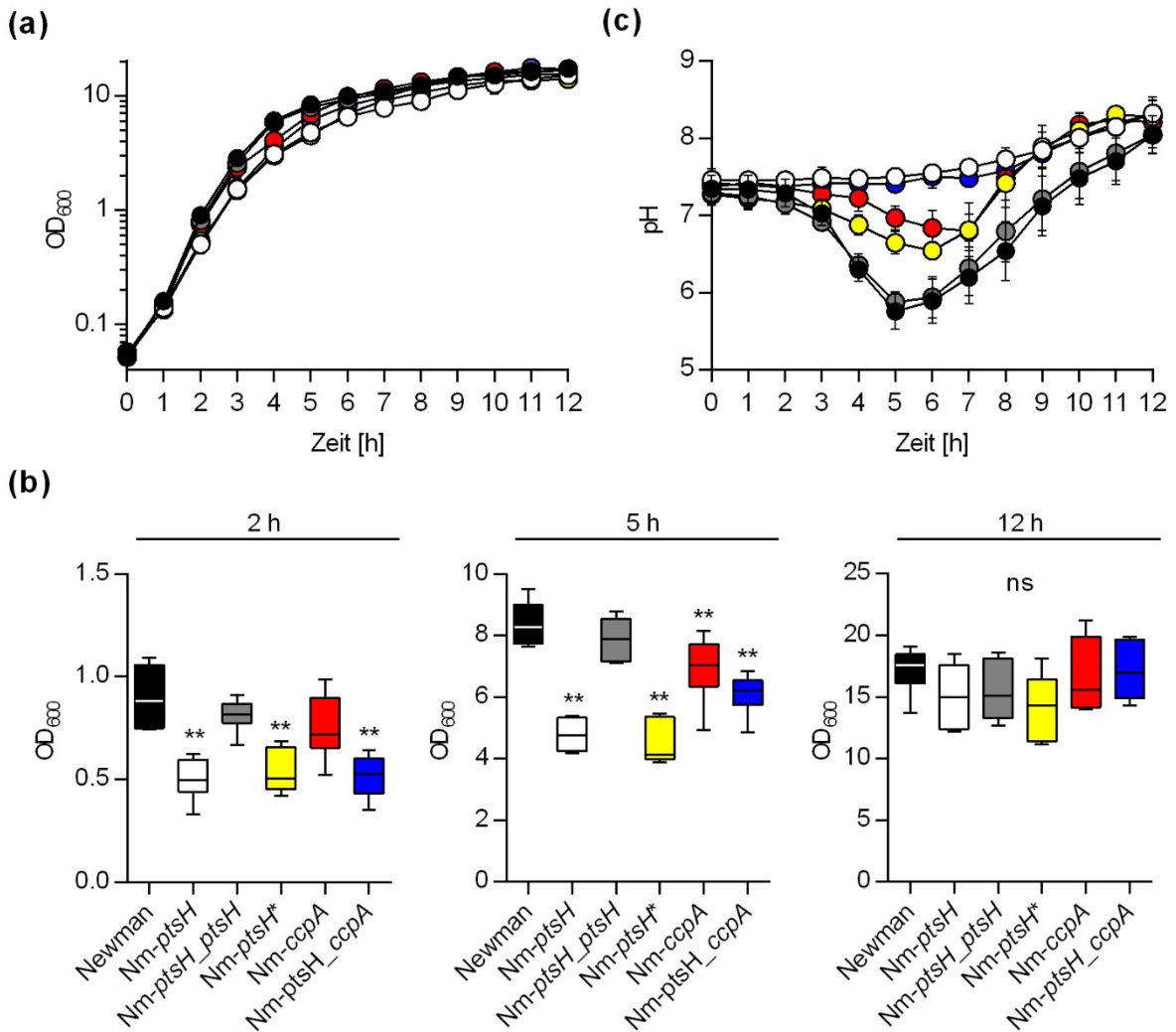


Abbildung 9: Auswirkungen von *ptsH* und *ccpA* auf Wachstum und pH-Verlauf von *S. aureus* TSB Kulturen.

Kultivierung von *S. aureus* ausgehend von einem Inokulum OD₆₀₀ 0,05 unter aeroben Bedingungen bei 225 rpm und 37 °C in TSB. Die OD₆₀₀ (a) sowie der pH-Wert (c) der Kulturüberstände wurden stündlich gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6). Abgebildet ist der *S. aureus* Wildtyp Newman (schwarze Symbole), die Nm-*ptsH* Mutante (weiße Symbole), die Nm-*ptsH_ptsH* Mutante (graue Symbole), die Nm-*ptsH** Mutante (gelbe Symbole), die Nm-*ccpA* Mutante (rote Symbole) und die Nm-*ptsH_ccpA* Mutante (blaue Symbole). (b) Dargestellt sind die OD₆₀₀ Messwerte der Zellkulturen nach zwei, fünf und zwölf Stunden Inkubation. Die Daten sind als Box- und Whiskerplot mit dem Interquartilsabstand (25-75%) aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6) dargestellt. Der Querstrich kennzeichnet den Mittelwert und der Balken die Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. Unterschiede sind nur zwischen Newman und den Muntanten dargestellt.

4.2 Der Kohlenstoffmetabolismus ist durch HPr stark beeinträchtigt

Die Rolle von HPr für den Kohlenstoffmetabolismus in *S. aureus* wurde durch Bestimmung von Metaboliten im Kulturüberstand von Newman und den isogenen Mutanten adressiert. In Bezug auf den Glukoseverbrauch zeigten sich bei den getesteten Stämmen drei unterschiedliche Gruppen, die jeweils aus zwei Stämmen bestehen und innerhalb der Gruppe einen ähnlichen Glukoseverbrauch über die Zeit aufwiesen. Zellen der Komplementante und des Wildtyps haben nach 5 Stunden die Glukose aus dem Kulturmedium vollständig verbraucht (Abbildung 10). Während Nm-*ptsH** und die Nm-*ccpA* Mutanten nach etwa 7 bis 8 Stunden die Glukose vollständig aus dem Medium aufgenommen haben, konnte bei der Nm-*ptsH_ccpA* Doppelmutante (Abbildung 10) und der Nm-*ptsH* Einzelmutante nach 10 Stunden immer noch Glukose detektiert werden (Abbildung 10).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Nm-*ptsH** Mutante und die Nm-*ccpA* Mutante, die ein für die Glukoseaufnahme mittels PTS funktionales HPr Protein besitzen, den Zucker schneller aufnehmen und verwerten können als Stämme, in denen *ptsH* deletiert wurde (Nm-*ptsH* und Nm-*ptsH_ccpA*). Im Gegensatz dazu sind die Nm-*ptsH_ccpA* Doppelmutante und die Nm-*ptsH* Einzelmutante, durch das vollständige Fehlen von HPr und seiner Funktion im PTS, in der Glukoseaufnahme erheblich beeinträchtigt. Diese Unterschiede spiegeln sich, wie unter 4.1 beschrieben, auch im Wachstum bzw. pH-Verlauf wider. Der Umstand, dass auch bei den Kulturen der Nm-*ptsH* Einzelmutante und der Nm-*ptsH_ccpA* Doppelmutante über die Zeit immer weniger Glukose in den Kulturüberständen zu detektieren war, zeigt auf, dass *S. aureus* prinzipiell jedoch dazu in der Lage ist, Glukose auch PTS-unabhängig aufzunehmen.

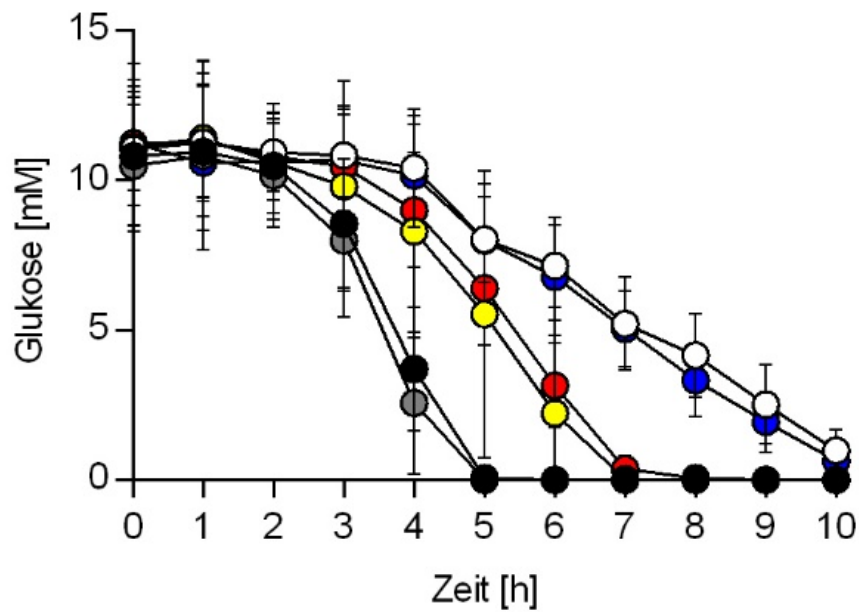


Abbildung 10: Auswirkungen von *ptsH* und *ccpA* auf den Glukoseverbrauch von *S. aureus* TSB Kulturen.

Ausgehend von einem Inokulum einer OD_{600} von 0,05 wurden alle Stämme unter aeroben Bedingungen bei 225 rpm und 37 °C in TSB inkubiert. Der Glukosegehalt [mM] der Kulturüberstände wurde stündlich gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Abgebildet ist der *S. aureus* Wildtyp Newman (schwarze Symbole, n=6), die Nm-*ptsH* Mutante (weiße Symbole, n=6), die Nm-*ptsH_ptsH* Mutante (graue Symbole, n=3), die Nm-*ptsH** Mutante (gelbe Symbole, n=3), die Nm-*ccpA* Mutante (rote Symbole, n=6) und die Nm-*ptsH_ccpA* Mutante (blaue Symbole, n=6).

Um den Acetatkatabolismus in *S. aureus* zu beurteilen, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Acetatmessungen im Kulturüberstand vorgenommen (Abbildung 11). Die Glykolyse und der Citratzyklus sind eng miteinander verbunden (Abb. 5). Die Acetatakkumulation im Kulturüberstand kann analog zur Glukoseverstoffwechslung in die zuvor schon beschriebenen drei Gruppen eingeteilt werden. In den ersten 5 bis 6 Stunden akkumulierten Wildtyp und Nm-*ptsH* Komplementante 23 mM bzw. 21 mM Acetat im Medium. Nach diesen Maxima fiel die Konzentration bei beiden Stämmen wieder ab, bis nach 10 Stunden nur noch wenig Acetat im Medium nachweisbar war (Abbildung 11). Die Nm-*ccpA* Mutante als auch Nm-*ptsH** Mutante erreichten die maximalen Acetatmengen im Kulturüberstand nach etwa 6 Stunden (Abbildung 11), wiesen jedoch mit 16,4 mM (Nm-*ccpA*) und 15,4 mM (Nm-*ptsH**) geringere extrazelluläre Acetatkonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp auf. Bei beiden Mutanten war nach 10 Stunden nahezu kein Acetat mehr im Überstand messbar. Die geringsten extrazellulären Acetatmengen von allen sechs untersuchten Stämmen waren bei der Nm-*ptsH* Deletionsmutante nachzuweisen (Abbildung 11). Die höchsten extrazellulären Acetatmengen konnten bei dieser Mutante mit 7,5 mM auch nach 6 Stunden Wachstum beobachtet werden, die dann bis 10 Stunden langsam wieder abfielen. Die Doppelmutante erreichte ebenfalls nach 5 bis 6 Stunden ein Acetatmaximum im Überstand, das mit 9,0 mM etwas über der maximalen extrazellulären Acetatkonzentration der Nm-*ptsH* Mutante lag und anschließend ebenfalls abgesunken ist (Abbildung 11).

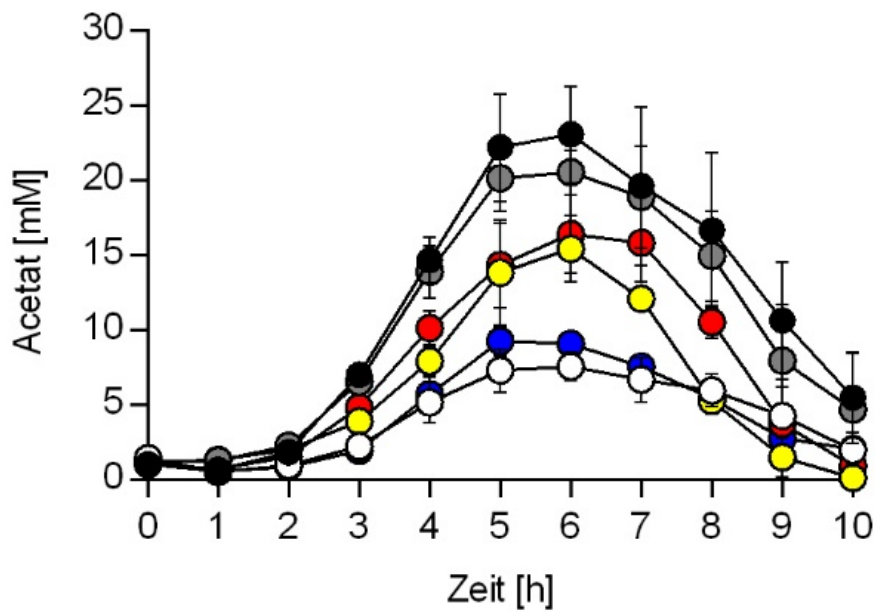


Abbildung 11: Auswirkungen von *ptsH* und *ccpA* auf die Acetatproduktion von *S. aureus* TSB Kulturen.

Ausgehend von einem Inokulum einer OD_{600} von 0,05 wurden alle Stämme unter aeroben Bedingungen bei 225 rpm und 37 °C in TSB inkubiert. Der Acetatgehalt [mM] der Kulturüberstände wurde stündlich gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Abgebildet ist der *S. aureus* Wildtyp Newman (schwarze Symbole, n=7), die Nm-*ptsH* Mutante (weiße Symbole, n=7), die Nm-*ptsH_ptsH* Mutante (graue Symbole, n=4), die Nm-*ptsH** Mutante (gelbe Symbole, n=4), die Nm-*ccpA* Mutante (rote Symbole, n=7) und die Nm-*ptsH_ccpA* Mutante (blaue Symbole, n=6).

Um den Aminosäure-Katabolismus der verschiedenen Stämme unter diesen Kultivierungsbedingungen einschätzen zu können, wurden alle sechs Stämme auch hinsichtlich ihrer Ammoniumproduktion untersucht. In den vorangeschrittenen Wachstumsphasen entsteht Ammonium durch den Abbau von Aminosäuren als weitere sekundäre Nährstoffquellen von *S. aureus* [106]. Bei der Ammoniumproduktion sind die bisher beschriebenen Gruppierungen der Stämme weniger klar ersichtlich. In den ersten 2 Stunden war die Ammoniumkonzentration im Medium bei allen Stämmen annähernd bei 5 mM konstant. Im weiteren Wachstumsverlauf kam es in den Kulturen des Wildtyps und der Nm-*ptsH* Komplementante erst ab Stunde 5 zu einer stetigen und weitgehend linearen Zunahme an Ammonium in den Kulturüberständen, die nach 10 Stunden die maximalen Konzentrationen von 20 mM erreichten (Abbildung 12).

Die Kulturen der Nm-*ptsH* Deletionsmutante, der Nm-*ccpA* Deletionsmutante, als auch der Nm-*ptsH_ccpA* Doppelmutante hingegen zeigten bereits während der exponentiellen Wachstumsphase (nach 3 Stunden) eine Zunahme an Ammonium in den Kulturüberständen. In der stationären Wachstumsphase wurden Konzentrationen von 27 mM (Nm-*ptsH*), 32 mM (Nm-*ccpA*) und 25 mM (Nm-*ptsH_ccpA*) erreicht. Die Kulturen der Nm-*ptsH**-Mutante zeigten wiederum erst ab der 5. Stunde eine dann aber starke Zunahme der Ammoniumkonzentration im Überstand, deren Maximum von 30 mM in der 9. Stunde erreicht wurde (Abbildung 13). Generell zeigte sich somit, dass die *ptsH* und *ccpA* Mutanten eine veränderte, stärkere Ammoniumproduktion aufwiesen als der Wildtyp und die Komplementante, die sich jedoch in Hinblick auf ihre Kinetiken voneinander unterschieden.

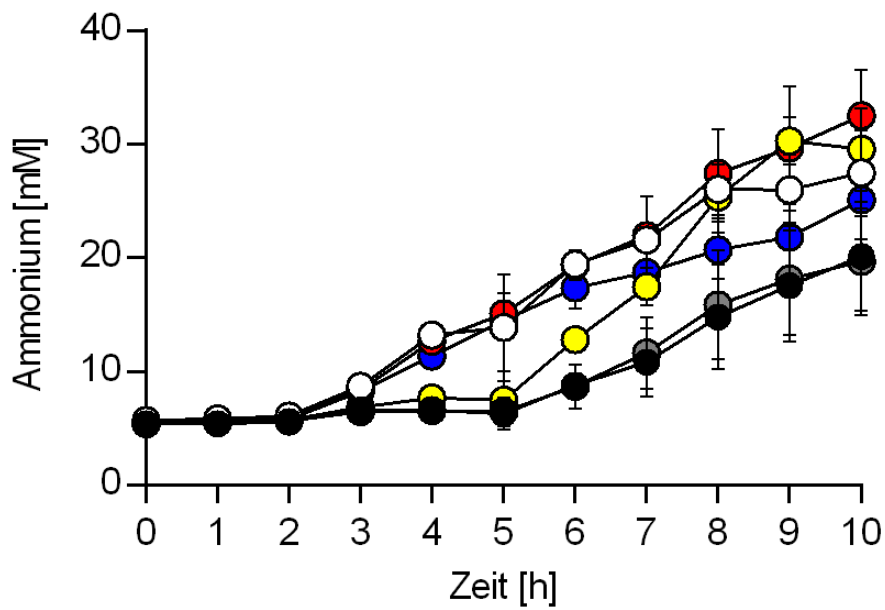


Abbildung 12: Auswirkungen von *ptsH* und *ccpA* auf die Ammoniumproduktion von *S. aureus* TSB Kulturen.

Ausgehend von einem Inokulum einer OD_{600} von 0,05 wurden alle Stämme unter aeroben Bedingungen bei 225 rpm und 37 °C in TSB inkubiert. Der Ammoniumgehalt [mM] der Kulturüberstände wurde stündlich gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Abgebildet ist der *S. aureus* Wildtyp Newman (schwarze Symbole, n=5), die Nm-*ptsH* Mutante (weiße Symbole, n=5), die Nm-*ptsH_ptsH* Mutante (graue Symbole, n=4), die Nm-*ptsH** Mutante (gelbe Symbole, n=4), die Nm-*ccpA* Mutante (rote Symbole, n=7) und die Nm-*ptsH_ccpA* Mutante (blaue Symbole, n=6).

4.3 Einfluss von *ptsH* auf die metabolischen Gene *citB* und *pckA*

CcpA konnte bereits in *S. aureus* als Protein entdeckt werden, welches an der Regulation der Gene *citB* und *pckA* beteiligt ist [102]. Daher stellte sich die Frage, ob HPr ebenfalls einen solchen Einfluss auf die Regulation beider Gene ausübt. Um diese Fragestellung zu überprüfen, wurde eine Transkriptionsanalyse zur Bestimmung der relativen Quantität mittels qRT-PCR der Stämme Newman, Nm-*ccpA*, Nm-*ptsH*, Nm-*ptsH**, Nm-*ptsH_ccpA* und der *ptsH* Komplementante nach 2, 4, 6 und 8 Stunden aerober Kultivierung in TSB durchgeführt.

Das Gen *citB* kodiert für das TCA-Zyklus Schlüsselenzym Aconitase, wohingegen *pckA* für das Gluconeogenese Schlüsselenzym Phosphoenolpyruvat Carboxykinase kodiert. Das Enzym Aconitase gewinnt, wie bereits in der Einleitung beschrieben, in Glukose-haltigem Kulturmedium insbesondere in der postexponentiellen Wachstumsphase, wenn die Zuckequelle verbraucht ist, von *S. aureus* an Bedeutung, indem es Citrat zu Isocitrat umwandelt und mithilfe des aktiven TCA-Zyklus und seinen Intermediaten an vielen katabolen und anabolen Biosynthesewegen beteiligt ist. Analog dazu ist das Enzym Phosphoenolpyruvat Carboxykinase wichtig für das Einschleusen des TCA-Zyklus Metaboliten Oxalacetat in die Gluconeogenese (Abbildung 5) und damit die Synthese verschiedener Kohlenstoffmetaboliten ermöglicht.

In Einklang mit der Literatur [93] lagen die mRNA Transkripte von *pckA* im Wildtyp während der exponentiellen Wachstumsphase bei Anwesenheit von Glukose nur in sehr geringeren Mengen vor, wohingegen in der postexponentiellen und frühen stationären Wachstumsphase die *pckA* Transkriptmenge anstieg (Abbildung 13 a). Ein ähnliches Transkriptionsmuster konnte bei der Komplementante festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Nm-*ptsH_ccpA* Doppelmutante und die Nm-*ptsH* Einzelmutante schon während der frühen exponentiellen Phase (Stunde 2) und späten exponentiellen Phase (Stunde 4), verglichen mit dem Wildtyp, eine erhöhte Transkription von *pckA*. Auch die Nm-*ccpA* Einzelmutante und Nm-*ptsH** Mutante zeigten schon in der exponentiellen Wachstumsphase hohe *pckA* Transkriptionsraten, die sich, wie schon von Seidl *et al.* [93] beobachtet, für die Nm-*ccpA* Mutante über die Zeit nicht maßgeblich veränderten.

Auch für die *citB* Transkription konnte, wie schon für das *S. aureus* Isolat DSM20231 beschrieben [12], eine wachstumsphasenabhängige Transkription im Wildtyp und der Komplementante beobachtet werden (Abbildung 13 b). Beide Stämme wiesen während der exponentiellen Wachstumsphase (Stunde 2-4) eine nur schwache Transkription von *citB* auf, die sich dann im Verlauf des weiteren Wachstums steigerte. In allen weiteren hier untersuchten Mutanten wurde hingegen bereits in der exponentiellen Phase eine vergleichsweise hohe Menge an *citB* Transkripten vorgefunden, die in etwa auf dem Niveau der *citB* Transkription des Wildtyps während der stationären Phase lag, und über die Zeit hinweg weitestgehend konstant blieb. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass in allen untersuchten Mutanten bereits in den frühen Wachstumsphasen der TCA-Zyklus dereprimiert ist und dass dieser Effekt vermutlich auf CcpA und HPr zurückzuführen ist.

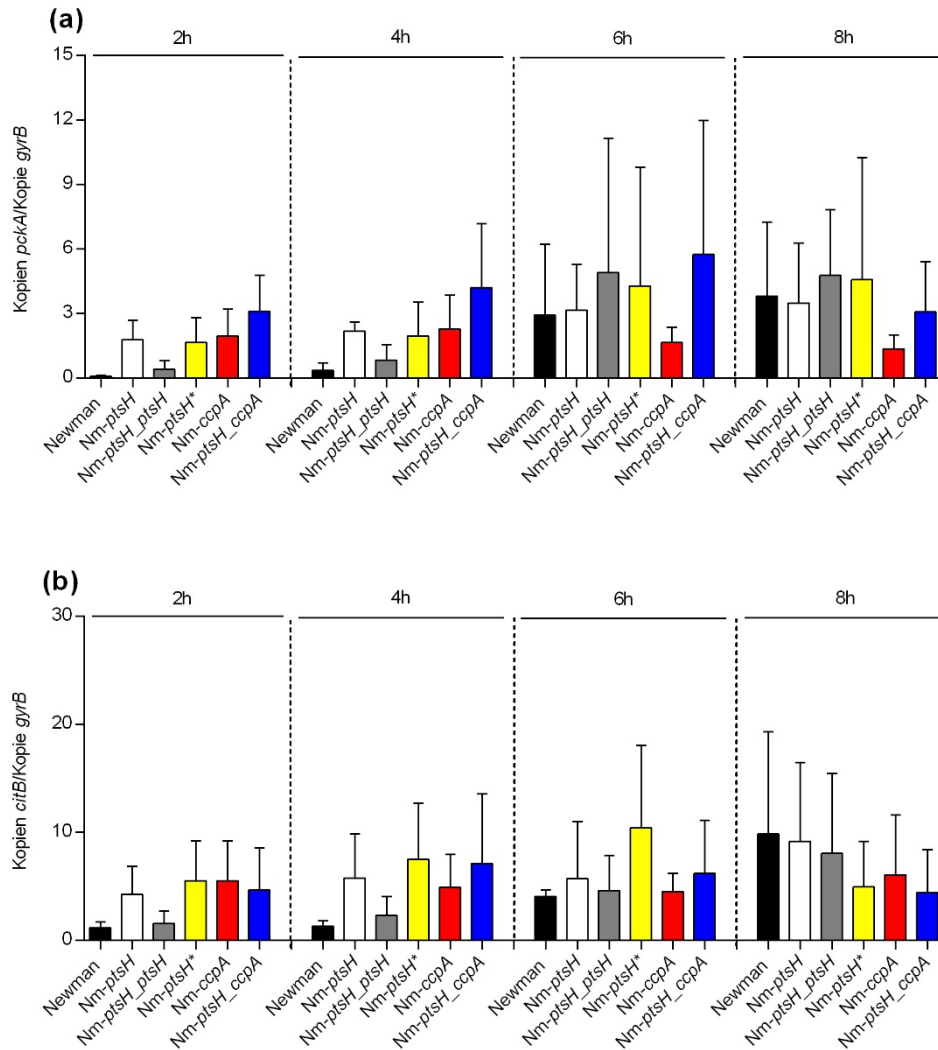


Abbildung 13: Relative, quantitative Transkriptionsanalyse von *pckA* und *citB*.

Quantitative Real-Time RT-PCR aus isolierter Gesamt-RNA von *pckA* (Phosphoenolpyruvat Carboxykinase) (a) und *citB* (Aconitase) (b) normiert auf das Haushaltsgen *gyrB* (*Gyrase B*) in *S. aureus* Stamm Newman, der *Nm-ptsH*-, *Nm-ptsH_ptsH*-, *Nm-ptsH**-, *Nm-ccpA*- und *Nm-ptsH_ccpA*-Mutante nach 2, 4, 6, und 8 Stunden Wachstum in TSB. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten/biologischen Replikaten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

4.4 Einfluss von *ptsH* auf die Virulenzgene *RNAlIIII*, *hla* und *spa*

CcpA ist bereits als metabolischer Regulator bekannt, der außerdem die Transkription von verschiedenen Virulenzgenen beeinflusst [102]. So konnte in der Publikation Seidl *et al.* [100] gezeigt werden, dass ein funktionstüchtiges CcpA Protein direkten Einfluss auf die Transkription der Gene *spa* (kodiert für Protein A) und *hla* (kodiert für α -Hämolysin) nimmt und auf indirektem Weg ebenso die Transkription von *RNAlIIII*, dem Effektormolekül des *agr*-Locus, beeinflusst [100]. Aufgrund dieser Beobachtungen sollte daher auch die Auswirkung der Deletion von *ptsH* auf die Transkription von *RNAlIIII*, *hla*, und *spa* erforscht werden.

Wie in Abbildung 14 a zu erkennen, zeigte sich, wie für *S. aureus* aus der Literatur bekannt [57], während der exponentiellen Wachstumsphase nur eine sehr geringe Transkription von *RNAlIIII* in allen sechs untersuchten Stämmen, die dann über die Zeit anstieg. Überraschenderweise konnte der von Seidl *et al.* [93] für CcpA in *S. aureus* COLn beschriebene positive Effekt auf die *RNAlIIII* Transkription in den späteren Wachstumsphasen hier nicht beobachtet werden. Bis auf die Komplementante, die insbesondere in der postexponentiellen Wachstumsphase höhere Transkriptmengen an *RNAlIIII* zeigte, wiesen alle anderen Mutanten in Hinblick auf die Transkriptmengen dem Wildtyp vergleichbare *RNAlIIII* Werte auf (Abbildung 14 a). Dies konnte insbesondere während Stunde 2, 4 und 6 beobachtet werden.

Ebenso wie für *RNAlIIII* ist von *hla* bekannt, dass dieses Gen in Schüttelkulturen bevorzugt in den späteren Wachstumsphasen transkribiert wird [100]. Diese Beobachtung konnte mit allen hier getesteten Stämmen bestätigt werden (Abbildung 14 b). Alle sechs Stämme zeigten zu Beginn in der exponentiellen Wachstumsphase eine geringe *hla* Transkription, die über die Zeit in der post-exponentiellen Wachstumsphase zunahm.

Ähnlich wie *hla* unterliegt die Transkription von *spa* in *S. aureus* einem komplexen regulatorischen Netzwerk, das zwischen verschiedenen Stämmen zum Teil sehr unterschiedlich sein kann [110]. Wie aus der Literatur für den Stamm Newman bekannt [134], konnte im Rahmen dieser Arbeit für den Wildtyp bereits in der frühen Wachstumsphase (Stunde 2) die größte Menge an *spa* Transkripten beobachtet werden (Abbildung 14 c), die in den späteren Wachstumsphasen abnahm und insgesamt in nur noch sehr geringen Mengen detektiert werden konnte. Im Unterschied dazu konnte bei allen Mutanten nach 2 Stunden höhere *spa* Transkriptionsraten beobachtet werden (Abbildung 14 c). Überraschenderweise zeigte auch die Komplementante erhöhte Transkriptlevels in der exponentiellen Wachstumsphase, die über die Zeit schneller und stärker abnahmen, während für für alle Deletionsmutanten eine eher moderate Abnahme der *spa* Transkription über die Zeit zu beobachten war. In der postexponentiellen Wachstumsphase konnte in allen Stämmen eine nur noch sehr geringe Menge an *spa* detektiert werden.

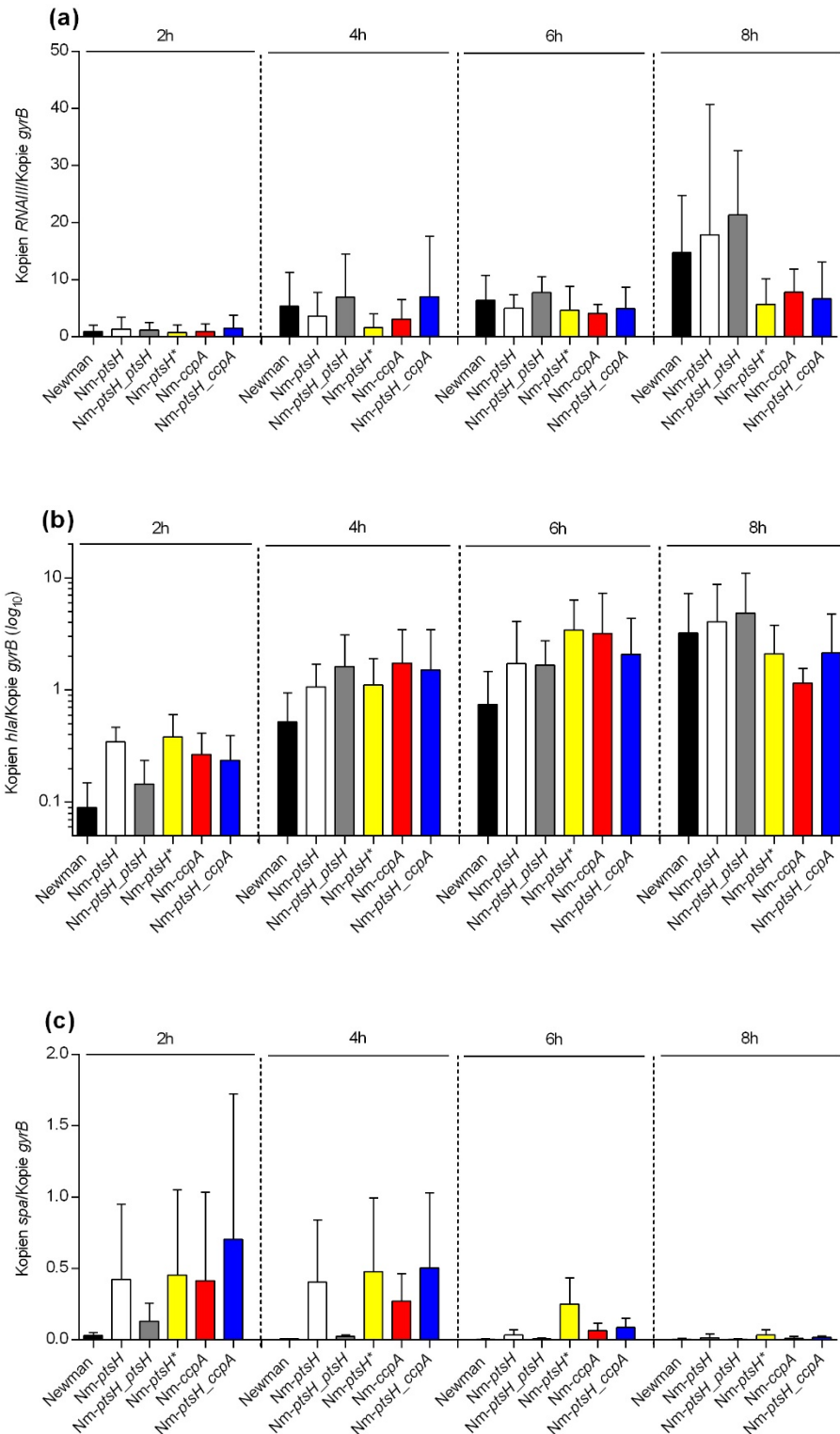


Abbildung 14: Relative, quantitative Transkriptionsanalyse von *RNAIII*, *hla* und *spa*.

Quantitative Real-Time RT-PCR aus isolierter Gesamt-RNA von *RNAIII* (a), *hla* (α -Hämolyisin) (b) und *spa* (Protein A) (c) normiert auf das Haushaltsgen *gyrB* (*Gyrase B*) in *S. aureus* Stamm Newman, der *Nm-ptsH*-, *Nm-ptsH_ptsH*-, *Nm-ptsH*⁺-, *Nm-ccpA*- und *Nm-ptsH_ccpA*-Mutante nach 2, 4, 6, und 8 Stunden Wachstum in TSB. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten/biologischen Replikaten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

4.5 Die *ptsH* Mutante zeigt einen abgeschwächten Infektionsverlauf im Abszessmodell

Um mögliche Auswirkungen der *ptsH* sowie *ccpA* Deletion und der strukturellen Änderung innerhalb des HPr Proteins (Phosphorylierungsstelle am Serin 46 durch Alanin ersetzt) auf den Infektionsverlauf von *S. aureus* festzustellen, wurden normoglykämische Mäuse der Linie C57BL/6N mit einem festgelegten bakteriellen Inokulum retroorbital infiziert. Zur Bakterienlastbestimmung wurde den Mäusen nach vier Tagen Leber, Niere und Milz explantiert. Im Folgenden ist die Anzahl an verwendeten Versuchstieren pro Stamm aufgezählt:

Newman: n=10, Nm-*ptsH*: n=10, Nm-*ccpA*: n=9, Nm-*ptsH_ccpA*: n=10, Nm-*ptsH**: n=8, Nm-*ptsH_ptsH*: n=10. Im Rahmen dieser Dissertation wurden dabei für die Nm-*ccpA*-Mutante nur vier Tiere verwendet, da für diese Mutante für weitere fünf Tiere bereits Daten zur Abszessbildung in der Leber aus einer Vorgängerstudie verfügbar waren. Bis auf ein Tier haben alle den Untersuchungszeitraum überlebt. Ein Tier wurde wegen zu starker Belastung aus dem Versuch genommen.

Nach Organentnahme wurden die Abszesse makroskopisch begutachtet. So zeigten sich bei allen Tieren, die mit dem Wildtyp oder der Komplementante infiziert wurden, vor allem an der Leber, aber auch in der Niere regelmäßig mehrere Abszesse. Im Gegensatz dazu konnte man bei den Mäusen, die mit den Deletionsmutanten infiziert wurden, lediglich vereinzelt kleine Abszesse erkennen.

Dieser optische Eindruck konnte mittels Bakterienlastbestimmung der einzelnen Organe verifiziert werden. In den Lebern der mit dem Wildtyp oder der Komplementante infizierten Mäuse zeigten sich mit etwa 5×10^7 bis 1×10^7 CFU pro g homogenisiertes Gewebe die höchste Bakterienlast (Abbildung 15). Im Gegensatz dazu führten die Deletion von *ptsH* und ebenso das im PTS funktionelle, jedoch in der CCR funktionell beeinträchtigte, HPr (Nm-*ptsH**) zu einer um etwa vier Logstufen verminderten Bakterienlast in der Leber. Die mit der Nm-*ccpA*-Mutante infizierten Mäuse zeigten, wie schon zuvor beobachtet [9], ebenfalls eine Reduktion der Bakterienzahl in der Leber, die im Vergleich zum Wildtyp um etwa drei Logstufen abnahm. Der direkte Vergleich der bakteriellen Last in den Lebern der mit der Nm-*ptsH* Mutante und der Nm-*ccpA* Mutante infizierten Tiere zeigte auf, dass das Fehlen von HPr einen größeren Einfluss auf die bakteriell-induzierte Abszessbildung in der Leber ausübt als das Fehlen von CcpA. Ebenso zeigten sich in den Lebern der mit der Doppelmutante infizierten Tiere niedrigere CFU Raten als in den Lebern der mit der Nm-*ccpA* Mutante infizierten Tiere. Dieser Phänotyp war nicht bei den mit der Nm-*ptsH** Mutante infizierten Tieren zu beobachten. Allerdings zeigte sich in dieser Versuchsgruppe auch die größte Streuung der CFU Raten. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass ein funktionelles HPr Protein wichtig für einen erfolgreichen Infektionsverlauf mit Abszessbildung in der Leber ist und noch größere Effekte aufzeigt als CcpA.

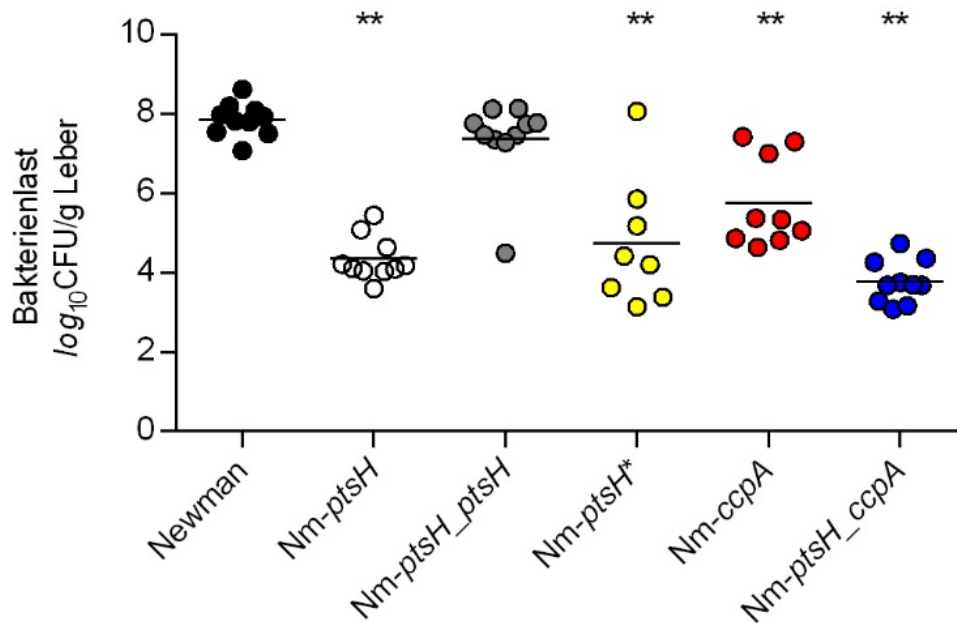


Abbildung 15: Die Deletion von *ptsH* und/oder *ccpA* bewirkt eine verminderte Bakterienlast in der Leber von *S. aureus* Newman in einem Maus-Abszessmodell.

C57BL/6N Mäuse wurden mit 1×10^7 CFU des *S. aureus* Stammes Newman (schwarze Symbole, n=10), der Nm-*ptsH* Mutante (weiße Symbole, n=10), der Nm-*ptsH_ptsH* Mutante (graue Symbole, n=10), der Nm-*ptsH** Mutante (gelbe Symbole, n=8), der Nm-*ccpA* Mutante (rote Symbole, n=9) und der Nm-*ptsH_ccpA* (blaue Symbole, n=10) retroorbital infiziert. Nach vier Tagen Infektionsverlauf wurden die Organe entnommen, homogenisiert und die Bakterienlast mittels CFU- Bestimmung untersucht. Die individuellen Tiere sind als einzelne Symbole dargestellt, wobei der Strich den Median kennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. Unterschiede sind nur zwischen Newman und den Muntanten dargestellt.

Nach der Infektion der Mäuse mit dem Wildtyp oder den Deletionsmutanten konnten Unterschiede in der Bakterienlast beobachtet werden (Abbildung 16). In der Niere zeigte sich die höchste Bakterienlast bei den mit dem Wildtyp oder der Komplementante infizierten Mäusen. Im Gegensatz zu den Befunden in der Leber zeigte sich in der Niere generell jedoch eine höhere Streuung der Werte, sodass ein signifikanter Unterschied in den CFU Raten nur zwischen Wildtyp und Doppelmutante sowie Wildtyp und Nm-*ptsH** beobachtet werden konnte. Tendenziell wurde eine geringere Bakterienlast auch in den mit der Nm-*ptsH* Mutante infizierten Tieren beobachtet (Median = $6,93 \times 10^7$ CFU/g Organgewebe), dieser Unterschied fiel jedoch im Vergleich zur Bakterienlast in der Niere der mit dem Wildtyp infizierten Tiere (Median = $8,09 \times 10^7$ CFU/g Organgewebe) nicht signifikant aus. Für die mit der Nm-*ccpA*-Mutante infizierten Mäuse zeigte sich in der Niere, wenn mit Wildtyp-infizierten Mäusen verglichen, kein klarer Unterschied in der bakteriellen Last, auch wenn hier nur ein Datensatz mit einem n von 4 Tieren zur Verfügung steht, da in der Vorgängerstudie auf eine Bestimmung der CFU Raten in der Niere verzichtet wurde. Nichtsdestotrotz ist dieser Befund in Einklang mit der Literatur, da auch Li und Kollegen [62] zuvor schon in ihrer Studie zum Einfluss von CcpA auf die Infektiosität von *S. aureus* in der Maus für eine Nm-*ccpA*-Mutante zwar einen klaren Effekt auf die Abszessbildung in der Leber, aber nicht bei der Abszessbildung in der Niere beobachteten.

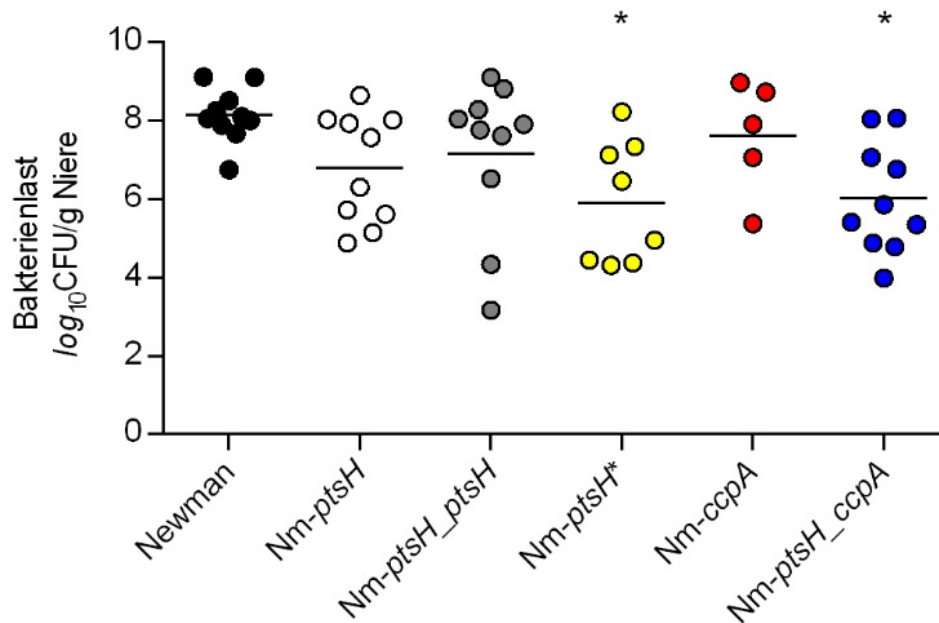


Abbildung 16: Die Deletion von *ptsH* und/oder *ccpA* bewirkt eine verminderte Bakterienlast in der Niere von *S. aureus* Newman in einem Maus-Abszessmodell.

C57BL/6N Mäuse wurden mit 1×10^7 CFU des *S. aureus* Stammes Newman (schwarze Symbole, n=10), der Nm-*ptsH* Mutante (weiße Symbole, n=10), der Nm-*ptsH_ptsH* Mutante (graue Symbole, n=10), der Nm-*ptsH** Mutante (gelbe Symbole, n=8), der Nm-*ccpA* Mutante (rote Symbole, n=5) und der Nm-*ptsH_ccpA* (blaue Symbole, n=10) retroorbital infiziert. Nach vier Tagen Infektionsverlauf wurden die Organe entnommen, homogenisiert und die Bakterienlast mittels CFU- Bestimmung untersucht. Die individuellen Tiere sind als einzelne Symbole dargestellt, wobei der Strich den Median kennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA und Holm-Sidak-Test. Unterschiede sind nur zwischen Newman und den Muntanten dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Veränderungen im HPr Protein beeinflussen den Glukosemetabolismus und das Wachstumsverhalten in *S. aureus*

Alle Lebewesen benötigen Energie für ihren Stoffwechsel und ihre Vermehrung. Diese Energie wird meistens durch enzymatischen Abbau von Kohlenhydraten, Fetten oder Proteinen generiert. Pathogene Bakterien wie *S. aureus* erlangen diese Nährstoffe vielfach in einer parasitären Art und Weise durch Destruktion des Wirtsgewebes. Mit Hilfe von Virulenzfaktoren wird dies möglich gemacht [110]. Virulenz und Metabolismus des Pathogens sind dabei in der Regel eng miteinander verknüpft [110]. Glykolyse und TCA-Zyklus spielen eine zentrale Rolle im Stoffwechsel von *S. aureus*. Ist eine gute exogene Nährstoffbasis vorhanden, z.B durch ausreichend Glukose, so wird der TCA-Zyklus reprimiert [110]. Seidl *et. al.* konnten bereits CcpA als einen auf Glukose-Metabolite reagierenden Repressor des TCA-Zyklus in *S. aureus* identifizieren [102]. Sobald die favorisierte Nährstoffquelle, im Infektionsgeschehen in der Regel Glukose, aufgebraucht ist, wird der TCA-Zyklus aktiviert, um andere Metaboliten, wie z.B. Acetat, Lactat oder Aminosäuren als alternative Kohlenstoffquelle zu nutzen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit das hitzestabile Histidin-haltige Phosphatträger-Protein HPr den Kohlenstoffmetabolismus und damit auch das Wachstum beeinflusst und welche Auswirkungen dies auf die Virulenz des Pathogens hat. Hierzu wurde das HPr kodierende Gen *ptsH* genetisch manipuliert bzw. inaktiviert und das Wachstumsverhalten sowie die Konzentrationsverläufe der Schlüsselmetaboliten Glukose, Acetat und Ammonium im Kulturüberstand bestimmt.

Verglichen mit dem Wildtyp zeigte sich bei der Nm-*ptsH* Deletionsmutante und bei der Nm-*ptsH_ccpA* Doppeldeletionsmutante eine deutliche Wachstumsverzögerung, die sich auch in verlängerten Generationszeiten widerspiegelte. Diese Wachstumsverzögerung während der exponentiellen Wachstumsphase ist vermutlich maßgeblich auf den verminderten Glukoseimport in beiden Stämmen zurückzuführen (Abbildung 10). Die beiden Mutanten, bei denen das Protein HPr gänzlich fehlt, zeigten die stärkste Verzögerung bei der Glukoseaufnahme, zugleich aber auch die längsten Verdopplungszeiten. HPr besitzt als elementarer Faktor des PTS eine wichtige Rolle im PTS-abhängigen Glukoseimport in vielen verschiedenen Bakterien, wie z.B. *E. coli* oder *Bacillus subtilis* [11]. Erstmals wurde 1964 ein solcher Zuckeraufnahmemechanismus in *E. coli* von Kundig *et al.* beschrieben [60]. Auch in *S. aureus* existiert ein HPr Protein und es besitzt eine essentielle Schlüsselrolle im Kohlenhydratmetabolismus [32]. HPr dient als Phosphatträger im PTS und es überträgt seine Phosphatgruppe über den EII-Komplex auf das zu importierende Zuckermolekül, um dieses in die Zelle einzuschleusen (Abbildung 6). Unter Berücksichtigung dieses Aspektes wird klar, warum die Mutanten, denen HPr fehlt, den Zucker nur langsam in die Zelle aufnehmen können. Der verzögerte Glukoseimport in *ptsH* Deletionsmutanten ist daher wahrscheinlich durch den Ausfall des PTS bedingt [83]. Die in den Kulturüberständen durchgeführten Glukosemessungen zeigen aber auch, dass, auch wenn der Glukoseimport von der Nm-*ptsH* Einzel- und der Nm-*ptsH_ccpA* Doppelmutante

erschwert ist, beide Mutanten dennoch dazu in der Lage sind, Glukose aufzunehmen, wenn auch langsamer und in geringerem Ausmaß. Dementsprechend stehen *S. aureus*, neben dem PTS, weitere Wege zur Verfügung, Glukose in die Zelle aufzunehmen. Solche weiteren Zuckeraufnahme System sind bereits gut in *E.coli* erforscht, wie zum Beispiel elektrochemische Symporter oder ABC Transporter, über die Glukose in die Zelle gelangen kann [44]. Auch *S. aureus* nutzt ebenfalls diese alternativen Glukoseaufnahmesysteme. So existiert das Gen *abcA*, das für ein ABC Transporter Protein kodiert [29]. Mit diesem Protein ist *S. aureus* in der Lage, unter der Nutzung von ATP, Proteine, Polysaccharide und Vitamine in die Zelle zu importieren [54].

Interessanterweise gleicht sich im Verlauf der postexponentiellen Phase die Doppelmutante, nicht aber die *Nm-ptsH*-Einzelmutante, dem Wildtyp bezüglich ihres Wachstumsverhaltens an. Dieser Unterschied zwischen den beiden *ptsH* Deletionsstämmen ist damit vermutlich auf CcpA zurückzuführen. Nach aktuellem Wissensstand wird die Aktivität von CcpA maßgeblich durch die Komplexbildung mit P-Ser-HPr gefördert, welche eine verstärkte Bindung an die *cre*-Sequenz ermöglicht und so unter anderem durch Repression von *citB* den TCA-Zyklus reprimieren kann [39]. Der oben beschriebene Wachstumsunterschied weist darauf hin, dass CcpA auch unabhängig von HPr eine Aktivität hervorruft. Diese Beobachtung machten auch Li *et. al* anhand von *in vitro* Versuchen, in denen demonstriert wurde, dass CcpA auch ohne eine Komplexbildung mit P-Ser-HPr an *cre* Sequenzen binden kann [62].

Im Wildtyp besitzt HPr zum einen eine Aufgabe im PTS (als P-His-HPr) und zum anderen in der CCR (als P-Ser-HPr). Durch das Phosphatträger Protein sind damit diese beiden Systeme eng miteinander verknüpft. In der *Nm-ptsH** Mutante wurden diese beiden Aufgaben des Proteins voneinander entkoppelt, indem das Serin 46 von HPr durch Alanin ersetzt wurde, um so ein funktionsloses HPr in der CCR zu erstellen. Interessanterweise konnte auch bei der *Nm-ptsH** Mutante, analog zur *Nm-ccpA* Mutante, ein Defizit im Glukoseimport festgestellt werden. Dieser Sachverhalt ist vermutlich nicht auf ein Problem im PTS zurückzuführen, da beiden Mutanten ein funktionales PTS zu Verfügung stehen sollte. Eine Erklärung für die reduzierte Glukoseaufnahme der *Nm-ccpA* Mutante könnte durch eine veränderte Phosphorylierung von HPr bedingt sein [83]. Dieser Sachverhalt konnte bereits in *B. subtilis* von Ludwig *et al.* festgestellt werden. Sie zeigten in einer *B. subtilis ccpA* Mutante, dass die Kinaseaktivität der HprK/P gegenüber der Phosphataseaktivität erhöht ist und dementsprechend der größte Teil von HPr in Form von P-Ser-HPr vorhanden ist [67]. Eine zu ausgeprägte Phosphorylierung am Serin 46 Rest wirkt jedoch eher wie ein negativer Feedback-Mechanismus auf die Phosphorylierungsreaktion am P-His-HPr durch Enzym 1 im PTS [89]. Konsekutiv kann HPr nicht mehr in ausreichendem Maße seiner Funktion im PTS nachkommen und folglich weniger Glukose importieren [67].

Die Hauptfunktionen von HPr im Zuckerimport und als Corepressor der CCR sind bereits gut erforscht. Es stellte sich die Frage, welche weiteren Funktionen HPr besitzt. Möglich wäre zum Beispiel, dass HPr noch mit weiteren transkriptionellen Regulationspartnern interagieren kann, die die CCR unabhängig

von CcpA beeinflussen können. Die Arbeitsgruppe von Grand *et al.* konnte unter *in vitro* Bedingungen feststellen, dass die CCR in *Enterococcus faecalis* unabhängig von CcpA durch einen weiteren Transkriptionsregulator aus der LacI/GaIR-Familie, nämlich MalR, beeinflusst wird. P-Ser-HPr geht mit MalR einen Komplex ein, um eine suffiziente CCR zu erreichen [41]. Fehlt diese Verbindung bleibt die CCR aus [42] und das Wachstum könnte dadurch beeinträchtigt sein, wie in der Nm-*ptsH**-Mutante beobachtet.

In vivo Untersuchungen der Arbeitsgruppe V. Mondero konnten anhand einer *Lactococcus lactis ptsHI* Mutante zeigen, dass diese ohne P-Ser-HPr nicht dazu im Stande ist, an der so genannten „Inducer exclusion“ mitzuwirken. Durch die Inducer exclusion wird die Verstoffwechslung von Nicht-PTS Kohlenstoffquellen durch einen inhibitorischen Glukoseeffekt unterdrückt. In der *L. lactis ptsHI* Mutante blieb der inhibitorische Effekt der Glukose aus und stattdessen wurde vermehrt Maltose und nur wenig Glukose aufgenommen und verbraucht. Durch das Wegfallen der Inducer exclusion werden also parallel mehrere Zucker als Nahrungsquelle erschlossen. Dieser Vorgang ist weniger effizient für das Bakterium, da der effektivste Weg für ein schnelles Wachstum die Metabolisierung einer einzigen Kohlenstoffquelle (Glukose) über das PTS ist. Außerdem müssen verschiedene weitere Proteine produziert werden, die für den Import und die Metabolisierung anderer Zucker benötigt werden. Dieser Vorgang ist für das Bakterium energetisch weniger effektiv. Weiterhin können andere Zucker, verglichen mit Glukose, weniger gut energetisch umgesetzt werden. Dieser Effekt, der ineffektiven Inducer exclusion könnte in der Nm-*ptsH** Mutante mit dafür verantwortlich sein, dass Glukose in verminderter Geschwindigkeit aufgenommen wird. Konsekutiv ist auch das Wachstum in der Nm-*ptsH** Mutante dementsprechend verändert [25]. Die Komplexbildung aus P-Ser-HPr mit CcpA fördert in Anwesenheit von Glukose die Transkription von Genen, die für die Glukoseaufnahme und die Glykolyse von Bedeutung sind. So konnte die Arbeitsgruppe von Seidl *et al.* anhand einer quantitativen Proteinanalyse feststellen, dass der *S. aureus* Wildtyp Stamm, verglichen mit einer *ccpA*-Deletionsmutante erhöhte Mengen an Tpi (Triose-3-phosphate-Isomerase, Pgi (Phosphoglycerat-Kinase), GapB (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und Fbp (Fructose-1,6-Bisphosphatase), die an der Glykolyse und Gluconegense beteiligt sind, aufweist [102]. Fehlt der P-Ser-HPr-CcpA Komplex wie in der Nm-*ptsH**-Mutante jedoch gänzlich, so ist die Transkription der vorher genannten Gene abgeschwächt. Diese Tatsache könnte die verminderte Glukose Aufnahme und die Wachstumsverzögerung in der Nm-*ptsH** Mutante erklären. Nicht ausgeschlossen werden kann auch, dass der S46A Austausch in HPr möglicherweise zu einer verminderten Stabilität des Proteins führt und auf diese Weise die Glukoseaufnahme der Nm-*ptsH** Mutante induziert [83].

5.2 HPr beeinflusst den TCA-Zyklus in *S. aureus*

Der Gehalt an Acetat im Kulturmedium ist ein guter Indikator für die Aktivität des TCA-Zyklus. Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase wird in Glukose-haltigem Medium Acetat oder Lactat aus der Bakterienzelle sezerniert, so lange Glukose in ausreichendem Maße vorhanden ist und verstoffwechselt werden kann. Im Rahmen der Glykolyse wird Glukose dabei zu Acetyl-CoA umgewandelt und bei ausreichender Sauerstoffversorgung als Acetat ausgeschieden [31]. Sinkt die Menge an Acetat im Kulturmedium, liegt dies in der Regel daran, dass Glukose als Nahrungsquelle nicht mehr zur Verfügung steht und alternative Kohlenstoffquellen aus dem Medium aufgenommen werden, die dann maßgeblich über den TCA Zyklus verstoffwechselt werden [103]. Wie bereits aus Vorarbeiten bekannt, korreliert dabei das Acetat-Maximum mit dem pH-Minimum. So konnten Sadykov *et al.* [94] zeigen, dass die Repression des TCA-Zyklus durch CcpA zu einer Akkumulation von Acetat und einem gleichzeitigen Absinken des pH-Wertes im Kulturmedium führte. Der pH-Wert einer Kultur spielt dabei neben der Verfügbarkeit von Nährstoffen eine wichtige Rolle für das optimale Wachstum von Bakterien. So liegt das pH-Optimum für *S. aureus* zwischen einem pH von 6 bis 7 [122]. Da neben der gestörten Zuckeraufnahme in der Nm-*ptsH* Mutante und der Nm-*ptsH_ccpA* Doppelmutante auch eine geringere Acetat-Akkumulation und damit konstant erhöhte pH-Werte im Kulturüberstand gemessen wurden, könnten die pH-Werte der Kulturen der beiden Nm-*ptsH* Mutanten, die konstant über einem pH von 7 lagen, für die für beide Mutanten beobachtete Wachstumsverzögerung mitverantwortlich sein.

In den Kulturüberständen des Wildtyps und der Komplementante stimmten die Zeitpunkte der Acetat-Maxima mit den Zeitpunkten, an denen die Glukose aus dem Kulturüberstand vollständig verbraucht wurde, überein. Dieser Zusammenhang ist durch die CCR erklärbar: solange Glukose als favorisierte Nährstoffquelle verfügbar ist, wird bei ausreichender Sauerstoffversorgung über die Glykolyse Glukose zu Acetat verstoffwechselt, welches dann aus dem bakteriellen Organismus in das Kulturmedium abgegeben wird, da der TCA-Zyklus zu diesem Zeitpunkt noch unterdrückt ist. Nimmt im Verlauf des Wachstums der Glukosegehalt im Medium ab, lässt dementsprechend auch die Unterdrückung des TCA-Zyklus nach und Acetat wird als alternative Kohlenstoffquelle wieder aus dem Kulturüberstand rückgewonnen und über den TCA-Zyklus metabolisiert. Bei der Nm-*ptsH* Mutante als auch der Nm-*ptsH_ccpA* Doppelmutante hingegen stimmten die Acetat-Maxima jedoch nicht mit den Glukose-Minima überein. Die höchste Acetat-Akkumulation wurde in diesen Kulturen bereits einige Stunden vor dem vollständigen Verbrauch der Glukose erreicht. Dieser Sachverhalt wird vermutlich durch eine erhöhte TCA-Zyklusaktivität in diesen Mutanten hervorgerufen. Für eine erfolgreiche CCR werden im speziellen die beiden Proteine CcpA und HPr benötigt (Abbildung 6), die in der Doppelmutante beide deletiert sind. Die Komplexbildung aus CcpA und P-Ser-HPr bewirkt eine Repression des TCA-Zyklus [75]. Fehlt hingegen HPr, so bleibt diese Komplexbildung aus und es kommt in der Folge zu keiner CCR-bedingten Unterdrückung des TCA-Zyklus. Diese Hypothese wird auch durch die im Rahmen dieser Arbeit für *citB* durchgeführten Transkriptionsanalysen unterstützt, in der für beide *ptsH* Mutanten

besonders in den frühen Wachstumsphasen (2 und 4 Stunden) eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhte *citB* Transkription detektiert werden konnte (siehe auch Punkt 5.2.1).

Auch in der Nm-*ccpA* Einzelmutante sollte die TCA-Zyklusaktivität im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls erhöht sein, was sich anhand des niedrigeren Acetat-Maximums und der erhöhten *citB* Transkriptionsraten in den frühen Wachstumsphasen auch im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit bestätigte (Abbildungen 11, 13 b). Interessanterweise zeigte sich bei der Nm-*ccpA* Mutante jedoch ein höheres Acetat-Maximum als bei der Nm-*ptsH* Mutante und der Nm-*ptsH-ccpA* Doppelmutante. Dieser Unterschied wird vermutlich durch den deutlich besseren Glukoseimport der *ccpA* Deletionsmutante im Vergleich zu den beiden *ptsH* Deletionsmutanten verursacht (Abbildung 10).

Wie anhand der Vorarbeiten mit *B. subtilis* erwartet [64] wiesen die Kulturen der Nm-*ccpA* Einzelmutante sowie die Nm-*ptsH** Mutante in Hinblick auf die Acetatproduktion/-metabolisation beide sehr ähnliche Werte auf, die sich klar von den mit den Kulturen der Nm-*ptsH* Mutante erhaltenen Werten unterschieden. Diese Unterschiede lassen sich vermutlich darauf zurückführen, dass bei den ersten beiden Mutanten ein funktionstüchtiges P-His-HPr vorliegt, was für eine effektive Glukoseaufnahme über das PTS wichtig ist, während bei der Nm-*ptsH* Mutante HPr hingegen gänzlich fehlt, weswegen eine mangelhafte Glukoseaufnahme in die Zelle entsteht. Diese verringerte Glukoseaufnahme, gepaart mit einer fehlenden P-Ser-HPr/CcpA Reprimierung der TCA-Zyklusaktivität, führt letztendlich dazu, dass in der Nm-*ptsH* Mutante weniger Acetat intrazellulär akkumuliert und in der Folge ins Medium sekretiert wird.

5.2.1 HPr beeinflusst die Transkription der metabolischen Gene *citB* und *pckA*

Die Aktivierung bzw. Reprimierung des TCA-Zyklus über CcpA wird primär auf transkriptioneller Ebene moduliert. Wichtige Zielgene für CcpA sind hierbei *citB* und *pckA* [102]. Das Enzym Aconitase, welches durch *citB* codiert wird, gilt dabei als Schlüsselenzym des TCA-Zyklus und katalysiert die Umwandlung von Citrat zu Isocitrat. Das Gen *pckA* kodiert für das Enzym Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, welches als Schlüsselenzym für die Gluconeogenese gilt und unter ATP Verbrauch die Umwandlung des TCA-Zyklusmetabolits Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat, CO₂ und ADP katalysiert. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der quantitativen Transkriptionsanalyse auch untersucht werden, inwieweit *ptsH* Einfluss auf die Modulation dieser beiden Gene nimmt.

Für CcpA konnten Seidl *et al.* [102] bereits zeigen, dass dieses Protein in Glukose-haltigem Medium in den frühen Wachstumsphasen als Repressor der TCA-Zyklus und Gluconeogenesegene *citB* und *pckA* wirkt. Diese Ergebnisse konnten auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Im Wildtyp und der Komplementante konnte besonders in der exponentiellen Phase eine reduzierte Transkription beider Gene beobachtet werden, was darauf schliessen lässt, dass der TCA-Zyklus und damit auch die Oxalacetat befeuerte Gluconeogenese durch die CCR über P-Ser-HPr/CcpA reprimiert ist. In den späteren Wachstumsphasen hingegen, wenn die Glukose durch die Bakterien vollständig aus dem Medium depletiert wurde, sind sowohl erhöhte *citB* als auch *pckA* Transkriptmengen in den

Bakterienpopulationen zu beobachten. Dieser Anstieg der *citB* und *pckA* Transkriptionsraten ist unter anderem dem Umstand geschuldet, dass es in diesen Wachstumsphasen zu einer markanten Verminderung der Glykolyse kommt. Die Verminderung bewirkt eine Abnahme des intrazellulären Fruktose-6-Bisphosphatlevels, was wiederum dazu führt, dass weniger HPr an Serin 46 über HprP/K phosphoryliert wird und konsekutiv weniger P-Ser-HPr/CcpA Komplexe innerhalb der Bakterienzellen vorliegen, sodass in den späten Wachstumsphasen die Transkription der Gene *citB* und *pckA* nicht mehr über P-Ser-HPr/CcpA reprimiert werden kann. Die Deletion von *ccpA* (in Doppel- und Einzelmutanten) im Stamm Newman führte, wie aus der Literatur bekannt [99], bereits zu Beginn des Wachstumsverlaufs (in der exponentiellen Wachstumsphase) zu erhöhten Transkriptionsraten beider Gene in den entsprechenden Mutanten. Dass auch nach der Deletion von *ptsH* ähnliche hohe Transkriptionsraten in exponentielle Phase-Zellen der Mutanten zu beobachten waren, unterstützt die Hypothese, dass die CCR in *S. aureus* neben CcpA auch maßgeblich von HPr beeinflusst wird.

Mit Hilfe der Nm-*ptsH**-Mutante sollte weitergehend überprüft werden, inwieweit die Expression der beiden metabolischen Gene maßgeblich von der Interaktion zwischen P-Ser-HPr und CcpA abhängig ist oder ob HPr auch eigenständig, also ohne CcpA-Komplexbildung, an der Expression dieser Gene beteiligt ist. Die entsprechenden Transkriptionsanalysen der Kulturen der Nm-*ptsH** Mutante brachten dabei sehr ähnliche *citB* und *pckA* Transkriptionskinetiken zu Tage wie zuvor in den Kulturen der Nm-*ccpA* Einzelmutante beobachtet. Ebenso war die Transkription der für die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese und des TCA-Zyklus kodierenden Gene in den frühen Wachstumsphasen in einer ähnlichen Art und Weise erhöht, wie dies in den Kulturen der Nm-*ptsH* Mutante zu beobachten war, obwohl in beiden ersteren Mutanten kein P-His-HPr-abhängiges Glukoseaufnahmefizit bestand. Zusammengenommen lassen diese Beobachtung darauf schließen, dass HPr keinen direkten Einfluss auf die Genregulation von *citB* und *pckA* nimmt.

5.2.2 HPr beeinflusst den Aminosäurestoffwechsel in *S. aureus*

Neben der Acetatsekretion und Wiederaufnahme wurde ebenfalls die Ammoniumsekretion in *S. aureus* untersucht. Die Ammoniumanreicherung im Kulturüberstand gilt als Zeichen für die Aufnahme und den Abbau von Aminosäuren. Dieser Vorgang, der auch als Desaminierung bezeichnet wird, ist insbesondere in Glukose-armen Kulturmedien bzw. nach Depletion der Zuckerquelle von großer Bedeutung, da viele dieser Aminosäuren als weitere Kohlenstoffquelle genutzt werden können, indem sie über den TCA-Zyklus metabolisiert werden [110].

Bei den mit dem Wildtyp bzw. der Komplementante beimpften Kulturen blieb der Ammoniumgehalt in den Überständen bis zur Stunde 5 weitestgehend konstant auf dem Level des Zeitpunkts 0, was darauf schließen lässt, dass beide Stämme in den ersten 5 Stunden des Wachstums keine relevanten Mengen an Aminosäuren verstoffwechseln. In den Newman *ptsH* und *ccpA* Deletionsmutanten (Nm-*ptsH*, Nm-*ccpA*, Nm-*ptsH_ccpA*) hingegen konnte bereits nach 3 Stunden Kultur eine klare Zunahme der NH_4^+ Mengen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass, obwohl noch Glukose im Medium vorrätig

war, in diesen Mutanten bereits in den frühen Wachstumsphasen ein verstärkter Abbau von Aminosäuren als alternative Kohlenstoffquelle stattfand. Die Mutanten griffen vermutlich schon frühzeitig auf eine alternative Nahrungsquelle zurück, da sowohl die Glukoseaufnahme und -verwertung durch das fehlende HPr gestört war, als auch eine P-Ser-HPr/CcpA bedingte Reprimierung der entsprechenden Stoffwechselwege.

Erstaunlicherweise war dieser Effekt bei der Nm-*ptsH** Mutante so nicht vorzufinden, in deren Kulturüberständen, ähnlich wie beim Wildtyp, erst nach Stunde 6 eine klare Steigerung der Ammonium Mengen im Überstand zu detektieren war. Da sowohl die Nm-*ptsH** als auch die Nm-*ccpA* Kulturen sehr ähnliche Glukoseaufnahme- und Acetatsekretionskinetiken aufwiesen, kann gemutmaßt werden, dass CcpA die Aminosäureverstoffwechslung in *S. aureus* weitgehend unabhängig von P-Ser-HPr, aber abhängig von der Glukoseverfügbarkeit innerhalb der Bakterienzelle moduliert.

Sommerville *et al.* [106] zeigten in ihrer Arbeit, dass eine geringere Aktivität des TCA-Zyklus in einer niedrigeren Ammoniumproduktion resultierte. Im Umkehrschluss zeigte sich in dieser Arbeit, dass der fehlende Einfluss von CcpA und HPr auf die Repression des TCA-Zyklus zu einer erhöhten *citB* Transkription und folglich einer erhöhten Aconitaseverstoffwechslung über den TCA-Zyklus in den Mutanten mündete. Die Unterschiede in der Ammoniumakkumulation in den Überständen der Nm-*ptsH**- und Nm-*ccpA* Mutanten deuten aber darauf hin, dass die Aminosäureverstoffwechslungsraten der Mutanten nicht alleine über die Aktivität des TCA-Zyklus erklärt werden können.

5.3 HPr beeinflusst den Metabolismus in *S. aureus* und dadurch die Virulenz

5.3.1 Einfluss von HPr auf die Transkription wichtiger Virulenzfaktoren

Die Erforschung der Abszessbildung in Staphylokokken gewann in der jüngeren Vergangenheit vermehrt an Bedeutung, da die Behandlung von *S. aureus* Infektionen durch eine Abszessbildung deutlich erschwert ist [87]. Für die Entstehung eines Abszesses konnten einige wichtige Moleküle in *S. aureus* bereits identifiziert werden. Die dabei eine Rolle spielenden Virulenzfaktoren kann man in zwei wichtige Gruppen einteilen. Zum einen produziert *S. aureus* Moleküle, die dem Bakterium dabei helfen, der Immunabwehr des Wirtes zu entgehen und sich zu tarnen. Zum anderen produziert *S. aureus* eine Reihe an Faktoren, die Zellen der Immunabwehr in Form von Zytolyse direkt zerstören [59]. Protein A (*spa*) ist eine wichtige Komponente, die zur ersten Gruppe gehört, wohingegen α -Hämolysin (*hla*) zur zweiten Gruppe gehört.

Ein weiterer wichtiger Parameter, der zur erhöhten Pathogenität und damit auch zur Abszessbildung beitragen kann, nämlich der bakterieneigene Metabolismus, wurde bereits von Li *et.al.* [62] sowie Bischoff *et.al.* [9] untersucht. Von beiden Forschergruppen konnte nachgewiesen werden, dass CcpA, als Masterregulator der CCR in *S. aureus*, in der Abszessentstehung bei systemischer Infektion involviert ist. So konnte beobachtet werden, dass eine Deletion von *ccpA* einen abgeschwächten Infektionsverlauf mit weniger Abszessbildung zur Folge hat [9, 60].

Auf transkriptioneller Ebene konnten die schon aus der Literatur für CcpA bekannten Effekte auf *RNAIII*, *hla* und *spa* im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur eingeschränkt reproduziert werden. Dies mag zum einen der Tatsache geschuldet sein, dass es im Rahmen dieser Arbeit nur möglich war, die Transkriptionsdaten anhand von drei biologischen Wiederholungen zu ermitteln. Da das Verfahren der qRT-PCR zudem sehr sensitiv ist und mit relativ hohen methodenbedingten Abweichungen, insbesondere bei mit dieser Technik unerfahrenen Untersuchern assoziiert ist, sollten die in Abbildung 14 dargestellten Beobachtungen nur mit Vorbehalt interpretiert werden. So konnte zum Beispiel der von Seidl *et al.* [102] beobachtete starke positive Effekt von CcpA auf die Transkription von *RNAIII* in Glukose-haltigem Medium in der frühen stationären Phase im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Ursächlich hierfür könnte unter anderem sein, dass Seidl und Kollegen in ihrer Studie den pH des Kulturmediums mit Hilfe einer Pufferlösung nahezu konstant hielten [100], während in dieser Arbeit eine stoffwechselbedingte Variation des pHs bewusst nachverfolgt wurde. Des Weiteren wurden in der Arbeit von Seidl *et al.* [100] mit dem Isolat COLn ein anderer *S. aureus* Stamm verwendet, der dafür bekannt ist, einen verlangsamten Glukosestoffwechsel unter *in vitro* Kultivierungsbedingungen aufzuweisen [109].

Für die von CcpA sehr wahrscheinlich direkt regulierten Virulenzgene *hla* und *spa* [100] konnten jedoch in dieser Arbeit stärker mit der Literatur übereinstimmende Transkriptionsraten beobachtet werden (Abbildung 14 b, c). So konnten in Einklang mit der Literatur [100] für die *ccpA* Mutanten des Stammes Newman, verglichen mit dem Wildtyp, schon in den frühen Wachstumsphasen erhöhte *hla* und *spa* Transkriptionsraten beobachtet werden, die darauf schließen lassen, dass CcpA in Anwesenheit von Glukose reprimierend auf die Transkription beider Gene wirkt. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für alle *ptsH* Mutanten gemacht werden, was vermuten lässt, dass P-Ser-HPr für diesen CcpA Effekt von elementarer Bedeutung ist.

5.3.2 Attenuierte Virulenz von *S. aureus* in einem murinen Abszessmodell nach Deletion von *ptsH*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem auch der Einfluss von HPr als möglicher weiterer, CcpA-unabhängiger Pathogenitätsfaktor auf die Abszessbildung von *S. aureus* untersucht. Hierzu wurde das Infektionsverhalten von einer Nm-*ptsH* Einzelmutante, einer Nm-*ptsH_ccpA* Doppelmutante, der Nm-*ccpA* Einzelmutante und der Nm-*ptsH** Mutante im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Um mögliche Auswirkungen der Deletion von *ptsH* und *ccpA*, sowie einem im PTS aktiven jedoch in der CCR funktionslosem HPr erforschen zu können, wurde ein murines *S. aureus* Infektionsmodell herangezogen, dass in der Arbeitsgruppe bereits zuvor für die Untersuchung des Einflusses von CcpA auf die Infektiosität von *S. aureus* genutzt wurde [9]. Sowohl anhand der makroskopischen Beurteilung (geringere Anzahl an Abszessen) als auch in der signifikant verminderten Bakterienlast um bis zu 4-Logstufen zeigte sich deutlich, dass die Nm-*ptsH* Mutanten (Einzelmutante sowie Doppelmutante) im

Vergleich zum Wildtyp in ihrer Infektiosität stark attenuiert sind. Das Vorhandensein von HPr scheint also für die Virulenz und damit auch für die Infektiosität und Abszessbildung von *S. aureus* von hoher Bedeutung zu sein. Auch die Nm-*ccpA* Einzelmutante und die Nm-*ptsH** Mutante zeigten in diesem murinen Infektionsmodell eine im Vergleich zum Wildtyp geringe Abszessbildung, wenn auch nicht im selben Maße wie die zuvor genannten *ptsH* Mutanten. Die Nm-*ptsH** Mutante zeigte *in vitro*, wenn mit der Nm-*ccpA* Einzelmutante verglichen, wie bereits zuvor beschrieben, ein verzögertes Wachstum. In Einklang mit dieser Beobachtung zeigte sich im Rahmen des Infektionsmodelles bei der Nm-*ptsH** Mutante auch eine weniger ausgeprägte Abszessbildung in der Leber im Vergleich zur Nm-*ccpA* Einzelmutante. Sowohl die Wachstumsverzögerung als auch die verminderte Abszessbildung können vermutlich nicht auf einen Glukoseaufnahmeeffekt der Nm-*ptsH** Mutante zurückzuführen sein, da beide Mutanten unter *in vitro* Kulturbedingungen einen sehr ähnlichen Glukoseimport aufweisen (Abbildung 10). Der Umstand, dass die Nm-*ptsH** Mutante im Vergleich zur Nm-*ccpA* Mutante *in vitro* einen verlangsamten Aminosäurekatabolismus aufweist, lässt eher darauf schließen, dass für die erfolgreiche Abszessbildung von *S. aureus* in der Maus auch ein aktiver Aminosäurekatabolismus benötigt wird, der in der Nm-*ptsH** Mutante beeinträchtigt ist. Nicht auszuschließen ist aber auch, dass P-Ser-HPr, welches in der Nm-*ptsH**-Mutante nicht gebildet werden kann, auch einen CcpA-unabhängigen Einfluss auf die Virulenzregulation hat und dadurch den Unterschied in der Abszessbildung hervorruft. In dem Gram-positiven Bakterium *Streptococcus pyogenes* konnte ein solcher Einfluss bereits gezeigt werden. Die Synthese des Virulenzgenregulators Mga scheint durch P-Ser-HPr reguliert zu werden. Mga ist für die Expression von Oberflächenproteinen verantwortlich, die in der Pathogenese der Abszessbildung beteiligt sind [25].

Ein weiterer Grund für die geringere Infektiosität der Nm-*ptsH* Mutanten könnte durch eine veränderte Stoffwechsellage bedingt sein. Eine optimale Zuckeraufnahme ist für die Virulenz ein wichtiger Faktor. Je besser die Glukoseverwertung ist, desto besser sind die Wachstumsbedingungen und damit verknüpft eine verbesserte Vermehrung am Infektionsort. Durch die vollständige Deletion von *ptsH* sind das PTS und die CCR beeinträchtigt. Dies spiegelt sich in der Virulenz der Nm-*ptsH*-Einzelmutante als auch in der Nm-*ptsH_ccpA*-Doppelmutante wider, die ähnliche geringere Bakterienlasten aufwiesen.

Eine weitere Erklärung für die Attenuierung der Infektiosität der *ccpA* Mutanten des Stammes Newman könnte durch einen veränderten pH-Wert bedingt sein. Durch die Deletion von *ccpA* in der Doppel- sowie Einzelmutante fehlt die Repression des TCA-Zyklus und dementsprechend wird Acetat nicht in dem Maße innerhalb der Zelle akkumuliert und in der Folge in das Kulturmedium sezerniert, wie dies beim Wildtyp zu beobachten ist, sondern zum Teil direkt weiter metabolisiert. In der Folge kommt es in den Kulturen der *ccpA* Mutanten zu einer verminderten Ansäuerung der Kulturüberstände. Im Abszessmodell zeigten sich in den Mäusen, die mit den Nm-*ccpA* Mutanten infiziert wurden, eine geringere Bakterienlast in Leber und Nieren im Vergleich zu den mit dem Wildtyp infizierten Tieren. Hier könnte die Rolle des pH-Wertes eine wichtige Stellschraube im Infektionsprozess spielen. Weinrick *et al.* untersuchten den Einfluss des pH-Wertes auf die Regulation einiger Virulenzgene in *S.*

aureus und stellten fest, dass ein eher saures Milieu einen fördernden Einfluss auf die Expression von Virulenzfaktoren hat. [128]. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe von Leimer ebenfalls beobachten, dass ein saurer pH-Wert die Bildung sogenannter small colony variants (SCV) fördert, welche häufig in Abszessen anzutreffen sind und aufgrund ihrer Stoffwechselddefekte nur schwer mit Antibiotika zu therapieren sind [61]. In der hier vorliegenden Arbeit zeigten alle Mutanten in den Schüttelkulturen im Vergleich zum Wildtyp einen höheren pH-Wert und mildere Infektionssymptome im Tiermodell. Einen reprimierenden Einfluss der Mutationen auf die Transkription der Virulenzfaktoren *hla* und *spa* konnte jedoch nicht beobachtet werden (siehe auch 5.3.1).

Interessanterweise konnte der abgeschwächte Infektionsverlauf der *ptsH* und *ccpA* Mutanten besser in der Leber als in der Niere beobachtet werden. Li *et al.* [62] konnten diesen Umstand ebenfalls bereits in ihren Untersuchungen zum Einfluss von CcpA auf die Virulenz von *S. aureus* beobachten. Dieser organspezifische Unterschied in der Infektiosität mag physiologische als auch immunologische Gründe haben. Die Leber ist als größtes Stoffwechselorgan insbesondere am Energiestoffwechsel beteiligt. Außerdem werden im Blut zirkulierende Bakterien in den Sinusoiden durch die lebereigenen Makrophagen, die so genannten Kupferzellen, phagozytiert [7]. Des Weiteren wird die adaptive Immunabwehr durch Neutrophile, die einen großen Teil eines Abszesses ausmachen, in der Leber hochreguliert, um die Bakterien zu eliminieren [43].

Der beobachtete mildere Infektionsverlauf nach Infektion mit der Nm-*ptsH* Mutanten könnte des Weiteren durch genregulatorische Effekte bedingt sein. CcpA ist bereits in *S. aureus* als Masterregulator der glukosemetabolisationsabhängigen Genexpression bekannt. Durch Transkriptom- und Proteomanalysen konnten 155 Gene identifiziert werden, die durch CcpA in *S. aureus* reguliert werden [102]. Darunter sind einige Gene zu finden, die für die Virulenz und den Metabolismus von *S. aureus* von großer Bedeutung sind. Im Einklang mit den Daten von Seidl *et al.* [100] konnte in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden, dass die Deletion von *ccpA* die Repression des TCA-Zyklus in Glukose-haltigem Medium in der exponentiellen Wachstumsphase aufhebt. Ebenso ist CcpA unter diesen Nährstoffbedingungen als Repressor der Virulenzgene *hla* und *spa* bekannt [100]. Auch diese Beobachtung konnte in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Eine Erklärung für die niedrigere Bakterienlast in den Lebern der mit den *ptsH* bzw. *ccpA* Mutanten infizierten Mäusen im Vergleich zu den mit dem Wildtyp infizierten Mäusen, könnte der Mangel an *hla* sein, da α -Hämolysin an der Abszess-Pathogenese elementar beteiligt ist [56].

Aktuell offen bleibt, ob die mit dem Fehlen von HPr eingehende geringere Infektiosität der *ptsH* Mutante im Vergleich zur *ccpA* Mutante primär auf Unterschiede im Kohlenstoffmetabolismus der Mutanten zurückzuführen sind, oder ob HPr neben der Regulation der CcpA Aktivität weitere genregulatorische Effekte auslöst. Neben den bereits erwähnten Virulenzgenen *hla* und *spa* könnten noch weitere Gene durch die *ptsH* Deletion in ihrer Expression betroffen sein, wie zum Beispiel *eap*, *clfA* und *clfB*, die alle an der Abszessentstehung beteiligt sind, aber nach bisherigem Wissenstand nicht über

CcpA reguliert werden. Daher bietet es sich an, eine Quantifizierung dieser Gene mittels qRT-PCR in den Nm-*ptsH* Mutanten durchzuführen, um weitere Erklärungen für die geringere Bakterienlast und die kleineren Abszesse der *ptsH* Mutante zu erhalten.

6 Zusammenfassung

1. Das Wachstum von *S. aureus* wird durch die Deletion von *ptsH* verzögert. Die Verdopplungszeit ist im Vergleich zum Wildtyp um circa 6 Minuten verlangsamt und die optische Dichte um das ca. 1,8 fache reduziert. Dies spiegelt sich in allen Wachstumsphasen wider.
2. Die *ptsH* Deletion in der Nm-*ptsH* Mutante bewirkt, verglichen mit dem Wildtyp, eine durch den Ausfall des PTS bedingte verzögerte Glukoseaufnahme. In der Nm-*ptsH* Mutante zeigte sich eine geringere Acetat Akkumulation. Eine noch bei Anwesenheit von Glukose bereits beginnende Acetat-Wiederaufnahme ist durch die erhöhte Aktivität des TCA-Zyklus der Nm-*ptsH* Mutante bedingt. Dies zeigte sich dadurch, dass bereits in der exponentiellen Wachstumsphase erhöhte Transkriptlevel der TCA Zyklus und Gluconeogenese Gene *citB* und *pckA* messbar waren. Die Deletion von *ptsH* bewirkt somit sehr wahrscheinlich eine Aufhebung der CCR.
3. Die Deletion von *ptsH* in *S. aureus* Newman beeinflusst die Transkription wichtiger Virulenzfaktoren kodierender Gene wie *hla* und *spa*. Diese Effekte sind insbesondere in den frühen Wachstumsphasen zu sehen, in denen Glukose noch im Medium verfügbar ist und lassen darauf schliessen, dass HPr über die CCR einen direkten Einfluss auf die Synthese dieser Virulenzfaktoren unter günstigen Nährstoffbedingungen nimmt.
4. In einem murinen Abszessmodell bewirkte die Deletion von *ptsH* im Stamm Newman 4 Tage nach der Infektion eine verminderte Bakterienlast in den untersuchten Organen Leber (Verminderung um drei bis vier Logstufen) und Niere.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Beobachtungen der bisherigen Forschung, dass der Stoffwechsel von *S. aureus* eng mit der Virulenz des Bakteriums verbunden ist, bestätigen. Neben anderen globalen Regulatoren wie CcpA, RpiRc und CodY konnte dem Protein HPr eine wichtige Schlüsselrolle als metabolischer Regulator zugewiesen werden, der auch die Virulenz beeinflusst. HPr besitzt eine wichtige Rolle in der CCR und ist in der Lage, den TCA-Zyklus in der exponentiellen Wachstumsphase zu reprimieren und gleichzeitig wichtige Virulenzfaktoren zu modulieren. Zudem ergeben sich aus dieser Arbeit erste Hinweise, dass HPr auch losgelöst von CcpA den Metabolismus und die Virulenz von *S. aureus* beeinflussen kann.

7 Literaturverzeichnis

1. Adhikari RP, Novick RP (2008) Regulatory organization of the staphylococcal *sae* locus. *Microbiology* 154:949–959
2. Adler A, Temper V, Block C, Abramson N, Moses A (2006) Panton-Valentine Leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 12:1789–1790
3. Arvidson S, Tegmark K (2001) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 291:159–170
4. Bahr T, Luttmann D, Marz W, Rak B, Gorke B (2011) Insight into Bacterial Phosphotransferase System-Mediated Signaling by Interspecies Transplantation of a Transcriptional Regulator. *J Bacteriol* 193:2013–2026
5. Balasubramanian D, Ohneck EA, Chapman J, Weiss A, Kim MK, Reyes-Robles T, Zhong J, Shaw LN, Lun DS, Ueberheide B, Shopsin B, Torres VJ (2016) *Staphylococcus aureus* Coordinates Leukocidin Expression and Pathogenesis by Sensing Metabolic Fluxes via RpiRc. *MBio* 7:1–13
6. Bayer MG, Heinrichs JH, Cheung AL (1996) The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 178:4563–4570
7. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL (2006) Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 26:1175–1186
8. Bischoff M, Entenza JM, Giachino P (2001) Influence of a Functional sigB Operon on the Global Regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183:5171–5179
9. Bischoff M, Wonnemberg B, Nippe N, Nyffenegger-Jann NJ, Voss M, Beisswenger C, Sunderkötter C, Molle V, Dinh QT, Lammert F, Bals R, Herrmann M, Somerville GA, Tschernig T, Gaupp R (2017) CcpA Affects Infectivity of *Staphylococcus aureus* in a Hyperglycemic Environment. *Front Cell Infect Microbiol* 7:1–10
10. Brown NL, Bottomley SP, Scawen MD, Gore MG (1998) A study of the interactions between an IgG-binding domain based on the B domain of staphylococcal protein a and rabbit IgG. *Mol Biotechnol* 10:9–16
11. Charrier V, Deutscher J, Darbon E, Rapoport G, Kilhoffer M-C, Martin-Verstraete I, Galinier A, Quentin Y, Haiech J (1999) The Q15H mutation enables Crh, a *Bacillus subtilis* HPr-like protein, to carry out some regulatory HPr functions, but does not make it an effective phosphocarrier for sugar transport. *Microbiology* 145:3195–3204
12. Chatterjee I, Becker P, Grundmeier M, Bischoff M, Somerville GA, Peters G, Sinha B, Harraghy N, Proctor RA, Herrmann M (2005) *Staphylococcus aureus* ClpC Is Required for Stress Resistance, Aconitase Activity, Growth Recovery, and Death. *J Bacteriol* 187:4488–4496
13. Chavakis T, Preissner KT, Herrmann M (2007) The anti-inflammatory activities of *Staphylococcus aureus*. *Trends Immunol* 28:408–418
14. Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O (2010) Contribution of Coagulases towards *Staphylococcus aureus* Disease and Protective Immunity. *PLoS Pathog* 6:e1001036
15. Cheng AG, DeDent AC, Schneewind O, Missiakas D (2011) A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends Microbiol* 19:225–232
16. Cheung AL, Yeaman MR, Sullam PM, Witt MD, Bayer AS (1994) Role of the *sar* locus of *Staphylococcus aureus* in induction of endocarditis in rabbits. *Infect Immun* 62:1719–25
17. Choe M, Park Y-H, Lee C-R, Kim Y-R, Seok Y-J (2017) The general PTS component HPr determines the preference for glucose over mannitol. *Sci Rep* 7:43431
18. Choi JH, Seo HS, Lim SY, Park K (2014) Cutaneous Immune Defenses Against *Staphylococcus aureus* Infections. *J Lifestyle Med* 4:39–46

19. Claes J, Ditzkowski B, Liesenborghs L, Veloso T, Entenza J, Moreillon P, Vanassche T, Verhamme P, Hoylaerts M, Heying R (2018) Assessment of the Dual Role of Clumping Factor A in *S. aureus* Adhesion to Endothelium in Absence and Presence of Plasma. *Thromb Haemost* 118:1230–1241
20. Clauditz A, Resch A, Wieland K-P, Peschel A, Gotz F (2006) Staphyloxanthin Plays a Role in the Fitness of *Staphylococcus aureus* and Its Ability To Cope with Oxidative Stress. *Infect Immun* 74:4950–4953
21. Colomer-Winter C, Flores-Mireles AL, Kundra S, Hultgren SJ, Lemos JA (2019) (p)ppGpp and CodY Promote Enterococcus faecalis Virulence in a Murine Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *mSphere* 4:
22. Cresawn SG, Bogel M, Day N, Jacobs-Sera D, Hendrix RW, Hatfull GF (2011) Phamerator: a bioinformatic tool for comparative bacteriophage genomics. *BMC Bioinformatics* 12:395
23. Dancer SJ, Noble WC (1991) Nasal, axillary, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* among women: identification of strains producing epidermolytic toxin. *J Clin Pathol* 44:681–684
24. Deutscher J, Küster E, Bergstedt U, Charrier V, Hillen W (1995) Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 15:1049–1053
25. Deutscher J, Herro R, Bourand A, Mijakovic I, Poncet S (2005) P-Ser-HPr—a link between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1754:118–125
26. Deutscher J (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 11:87–93
27. Ding Y, Liu X, Chen F, Di H, Xu B, Zhou L, Deng X, Wu M, Yang C-G, Lan L (2014) Metabolic sensor governing bacterial virulence in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci* 111:E4981–E4990
28. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13:16–34
29. Domanski TL, Bayles KW (1995) Analysis of *Staphylococcus aureus* genes encoding penicillin-binding protein 4 and an ABC-type transporter. *Gene* 167:111–3
30. Ericsson AC, Crim MJ, Franklin CL (2013) A brief history of animal modeling. *Mo Med* 110:201–205
31. Ferreira MT, Manso AS, Gaspar P, Pinho MG, Neves AR (2013) Effect of Oxygen on Glucose Metabolism: Utilization of Lactate in *Staphylococcus aureus* as Revealed by In Vivo NMR Studies. *PLoS One* 8:e58277
32. Friedman SA, Hays JB (1977) Initial Characterization of Hexose and Hexitol Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferases of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 130:991–999
33. Galinier A, Haiech J, Kilhoffer MC, Jaquinod M, Stülke J, Deutscher J, Martin-Verstraete I (1997) The *Bacillus subtilis* *crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8439–44
34. Gaupp R, Wirf J, Wönnenberg B, Biegel T, Eisenbeis J, Graham J, Herrmann M, Lee CY, Beisswenger C, Wolz C, Tschernig T, Bischoff M, Somerville GA (2016) RpiRc Is a Pleiotropic Effector of Virulence Determinant Synthesis and Attenuates Pathogenicity in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 84:2031–2041
35. Geiger T, Francois P, Liebeke M, Fraunholz M, Goerke C, Krismer B, Schrenzel J, Lalk M, Wolz C (2012) The stringent response of *Staphylococcus aureus* and its impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression. *PLoS Pathog* 8:e1003016

36. Gerke C, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O, Götz F (1998) Characterization of the N - Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. *J Biol Chem* 273:18586–18593
37. Giraud A (1999) The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol Lett* 177:15–22
38. Gonzy-Tréboul G, Zagorec M, Rain-Guion M-C, Steinmetz M (1989) Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of *ptsX*, *ptsH* and the 5'-end of *ptsI* and evidence for a *ptsHI* operon. *Mol Microbiol* 3:103–112
39. 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
40. Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier J-B, Silverman GJ (2000) Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci* 97:5399–5404
41. Grand M, Blancato VS, Espariz M, Deutscher J, Pikis A, Hartke A, Magni C, Sauvageot N (2020) *Enterococcus faecalis* MalR acts as a repressor of the maltose operons and additionally mediates their catabolite repression via direct interaction with seryl-phosphorylated-HPr. *Mol Microbiol* 113:464–477
42. Grand M, Riboulet-Bisson E, Deutscher J, Hartke A, Sauvageot N (2020) *Enterococcus faecalis* Maltodextrin Gene Regulation by Combined Action of Maltose Gene Regulator MalR and Pleiotropic Regulator CcpA. *Appl Environ Microbiol* 86:1–16
43. Gregory SH, Wing EJ (1998) Neutrophil-Kupffer-cell interaction in host defenses to systemic infections. *Immunol Today* 19:507–10
44. Guan L, Kaback HR (2004) Glucose/Sugar Transport in Bacteria. Elsevier URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0124437109002696>
45. Ha J-H, Hauk P, Cho K, Eo Y, Ma X, Stephens K, Cha S, Jeong M, Suh J-Y, Sintim HO, Bentley WE, Ryu K-S (2018) Evidence of link between quorum sensing and sugar metabolism in *Escherichia coli* revealed via cocrystal structures of LsrK and HPr. *Sci Adv* 4:eaar7063
46. Haggar A, Ehrnfelt C, Holgersson J, Flock J-I (2004) The Extracellular Adherence Protein from *Staphylococcus aureus* Inhibits Neutrophil Binding to Endothelial Cells. *Infect Immun* 72:6164–6167
47. Hajar R (2011) Animal testing and medicine. *Hear Views* 12:42
48. Halsey CR, Lei S, Wax JK, Lehman MK, Nuxoll AS, Steinke L, Sadykov M, Powers R, Fey PD (2017) Amino Acid Catabolism in *Staphylococcus aureus* and the Function of Carbon Catabolite Repression. *MBio* 8:1–19
49. Hartmann T, Zhang B, Baronian G, Schulthess B, Homerova D, Grubmüller 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 Tricarboxylic Acid Cycle Activity in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 288:36116–36128
50. Hartmann T, Baronian G, Nippe N, Voss M, Schulthess B, Wolz C, Eisenbeis J, Schmidt-Hohagen K, Gaupp R, Sunderkötter C, Beisswenger C, Bals R, Somerville GA, Herrmann M, Molle V, Bischoff M (2014) The Catabolite Control Protein E (CcpE) Affects Virulence Determinant Production and Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 289:29701–29711
51. Heinrichs JH, Bayer MG, Cheung AL (1996) Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 178:418–423
52. Hengstenberg W, Penberthy WK, Hill KL, Morse ML (1969) Phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*: its requirement for the accumulation and metabolism of galactosides. *J*

- Bacteriol 99:383–8
53. Herold G (2017) Innere Medizin, Kardiologie, Erkrankungen des Endokards, Infektiöse Endokarditis, 157-160
 54. Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67–113
 55. Holtfreter S, Roschack K, Eichler P, Eske K, Holtfreter B, Kohler C, Engelmann S, Hecker M, Greinacher A, Bröker BM (2006) *Staphylococcus aureus* Carriers Neutralize Superantigens by Antibodies Specific for Their Colonizing Strain: A Potential Explanation for Their Improved Prognosis in Severe Sepsis. *J Infect Dis* 193:1275–1278
 56. Hsieh H-Y, Tseng CW, Stewart GC (2008) Regulation of Rot Expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 190:546–554
 57. Huntzinger E, Boisset S, Saveanu C, Benito Y, Geissmann T, Namane A, Lina G, Etienne J, Ehresmann B, Ehresmann C, Jacquier A, Vandenesch F, Romby P (2005) *Staphylococcus aureus* RNAPIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J* 24:824–835
 58. Kirch E-L (2014) Die Bedeutung des Histidin-haltigen Phosphatträger-Proteins (HPr) für den Glucose-Import , den Kohlenstoffwechsel und die Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus*. Masterarbeit, ZHMB der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III und der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, 15
 59. Kobayashi SD, Malachowa N, DeLeo FR (2015) Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Abscesses. *Am J Pathol* 185:1518–1527
 60. Kundig W, Ghosh S, Roseman S (1964) Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system. *Proc Natl Acad Sci* 52:1067–1074
 61. Leimer N, Rachmühl C, Palheiros Marques M, Bahlmann AS, Furrer A, Eichenseher F, Seidl K, Matt U, Loessner MJ, Schuepbach RA, Zinkernagel AS (2016) Nonstable *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Induced by Low pH and Sensitized to Antimicrobial Therapy by Phagolysosomal Alkalinization. *J Infect Dis* 213:305–313
 62. 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* 192:3883–3892
 63. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J (1999) Involvement of Panton-Valentine Leukocidin--Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clin Infect Dis* 29:1128–1132
 64. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, LePendou J, Baric R (2003) Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 9:548–53
 65. Lorca GL, Chung YJ, Barabote RD, Weyler W, Schilling CH, Saier MH (2005) Catabolite Repression and Activation in *Bacillus subtilis*: Dependency on CcpA, HPr, and HprK. *J Bacteriol* 187:7826–7839
 66. LORENZ LL, DUTHIE ES (1952) Staphylococcal Coagulase: Mode of Action and Antigenicity. *Microbiology* 6:95–107
 67. Ludwig H, Rebhan N, Blencke H-M, Merzbacher M, Stulke J (2002) Control of the glycolytic *gapA* operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation. *Mol Microbiol* 45:543–553
 68. Lundqvist ML, McElveen BR, Middleton DL, Chapman R, Warr GW (2006) Evolution of antibody class switching: Identification and transcriptional control of an I κ B exon in the Duck (*Anas platyrhynchos*). *Dev Comp Immunol* 30:575–587
 69. Mazmanian SK (2003) Passage of Heme-Iron Across the Envelope of *Staphylococcus aureus*.

70. McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O (2012) *Staphylococcus aureus* Secretes Coagulase and von Willebrand Factor Binding Protein to Modify the Coagulation Cascade and Establish Host Infections. *J Innate Immun* 4:141–148
71. Mestas J, Hughes CCW (2004) Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol* 172:2731–2738
72. Michalik S, Depke M, Murr A, Gesell Salazar M, Kusebauch U, Sun Z, Meyer TC, Surmann K, Pfortner H, Hildebrandt P, Weiss S, Palma Medina LM, Gutjahr M, Hammer E, Becher D, Pribyl T, Hammerschmidt S, Deutsch EW, Bader SL, Hecker M, Moritz RL, Mäder U, Völker U, Schmidt F (2017) A global *Staphylococcus aureus* proteome resource applied to the in vivo characterization of host-pathogen interactions. *Sci Rep* 7:9718
73. Mishra AK, Yadav P, Mishra A (2016) A Systemic Review on Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS): A Rare and Critical Disease of Neonates. *Open Microbiol J* 10:150–159
74. Moesby L, Timm M, Hansen EW (2008) Effect of moist heat sterilisation on the pyrogenicity of cell wall components from *Staphylococcus aureus*. 5:442–446
75. Moglich A, Koch B, Gronwald W, Hengstenberg W, Brunner E, Kalbitzer HR (2004) Solution structure of the active-centre mutant I14A of the histidine-containing phosphocarrier protein from *Staphylococcus carnosus*. *Eur J Biochem* 271:4815–4824
76. Moisan H, Brouillette E, Jacob CL, Langlois-Begin P, Michaud S, Malouin F (2006) Transcription of Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Isolated from Cystic Fibrosis Patients Is Influenced by SigB. *J Bacteriol* 188:64–76
77. Moreillon P, Que Y-A (2004) Infective endocarditis. *Lancet* 363:139–149
78. Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S (1995) Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J* 14:4569–4577
79. Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F, Moghazeh S, Novick RP (1995) Theagr P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *MGG Mol Gen Genet* 248:446–458
80. Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 48:1429–1449
81. O’Riordan K, Lee JC (2004) *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 17:218–234
82. Ouellette AJ, Darmoul D, Tran D, Huttner KM, Yuan J, Selsted ME (1999) Peptide localization and gene structure of cryptdin 4, a differentially expressed mouse paneth cell alpha-defensin. *Infect Immun* 67:6643–51
83. Pätzold L, Brausch A-C, Bielefeld E-L, Zimmer L, Somerville GA, Bischoff M, Gaupp R (2021) Impact of the Histidine-Containing Phosphocarrier Protein HPr on Carbon Metabolism and Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms* 9:466
84. Pfaffl MW (2007) Relative quantification. *Real-time PCR*, 1st Edition, Taylor and Francis, 64–82
85. Pimentel de Araujo F, Tinelli M, Battisti A, Ercoli A, Anesi A, Pantosti A, Monaco M (2018) An outbreak of skin infections in neonates due to a *Staphylococcus aureus* strain producing the exfoliative toxin A. *Infection* 46:49–54
86. Pishchany G, Sheldon JR, Dickson CF, Alam MT, Read TD, Gell DA, Heinrichs DE, Skaar EP (2014) IsdB-dependent Hemoglobin Binding Is Required for Acquisition of Heme by *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 209:1764–1772
87. Rasmussen R V, Fowler Jr VG, Skov R, Bruun NE (2011) Future challenges and treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia with emphasis on MRSA. *Future Microbiol* 6:43–56

88. Rausch M, Deisinger JP, Ulm H, Müller A, Li W, Hardt P, Wang X, Li X, Sylvester M, Engeser M, Vollmer W, Müller CE, Sahl HG, Lee JC, Schneider T (2019) Coordination of capsule assembly and cell wall biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun* 10:1404
89. Reizer J, Sutrina SL, Saier MH, Stewart GC, Peterkofsky A, Reddy P (1989) Mechanistic and physiological consequences of HPr(ser) phosphorylation on the activities of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: studies with site-specific mutants of HPr. *EMBO J* 8:2111–20
90. Reizer J, Hoischen C, Titgemeyer F, Rivolta C, Rabus R, Stülke J, Karamata D, Saier Jr MH, Hillen W (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol Microbiol* 27:1157–1169
91. Risso A (2000) Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol* 68:785–92
92. 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
93. Sadaka A, Palmer K, Suzuki T, Gilmore MS (2014) In Vitro and In Vivo Models of *Staphylococcus aureus* Endophthalmitis Implicate Specific Nutrients in Ocular Infection. *PLoS One* 9:e110872
94. 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
95. Said-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, McNamara PJ, Arvidson S, Foster TJ, Projan SJ, Kreiswirth BN (2003) Global Regulation of *Staphylococcus aureus* Genes by Rot. *J Bacteriol* 185:610–619
96. Saier Jr. MH (2015) The Bacterial Phosphotransferase System: New Frontiers 50 Years after Its Discovery. *J Mol Microbiol Biotechnol* 25:73–78
97. Schelin J, Wallin-Carlquist N, Thorup Cohn M, Lindqvist R, Barker GC (2011) The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2:580–592
98. Schumacher MA, Allen GS, Diel M, Seidel G, Hillen W, Brennan RG (2004) Structural Basis for Allosteric Control of the Transcription Regulator CcpA by the Phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* 118:731–741
99. Seidel G, Diel M, Fuchsbauer N, Hillen W (2005) Quantitative interdependence of coeffectors, CcpA and *cre* in carbon catabolite regulation of *Bacillus subtilis*. *FEBS J* 272:2566–2577
100. Seidl K, Stucki M, Ruegg M, Goerke C, Wolz C, Harris L, Berger-Bächli B, Bischoff M (2006) *Staphylococcus aureus* CcpA Affects Virulence Determinant Production and Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1183–1194
101. Seidl K, Goerke C, Wolz C, Mack D, Berger-Bächli B, Bischoff M (2008) *Staphylococcus aureus* CcpA Affects Biofilm Formation. *Infect Immun* 76:2044–2050
102. 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
103. Sierra H, Cordova M, Chen C-SJ, Rajadhyaksha M (2015) Confocal Imaging–Guided Laser Ablation of Basal Cell Carcinomas: An Ex Vivo Study. *J Invest Dermatol* 135:612–615
104. Silverman GJ, Goodyear CS (2002) A Model B-Cell Superantigen and the Immunobiology of B Lymphocytes. *Clin Immunol* 102:117–134
105. Singh KD, Halbedel S, Görke B, Stülke J (2007) Control of the Phosphorylation State of the HPr

- Protein of the Phosphotransferase System in *Bacillus subtilis*: Implication of the Protein Phosphatase PrpC. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13:165–171
106. 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* 70:6373–82
 107. 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
 108. Somerville GA, Said-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
 109. 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
 110. Somerville GA, Proctor RA (2009) At the Crossroads of Bacterial Metabolism and Virulence Factor Synthesis in Staphylococci. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:233–248
 111. Sonenshein AL (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 5:917–927
 112. Spaan AN, van Strijp JAG, Torres VJ (2017) Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nat Rev Microbiol* 15:435–447
 113. Stathopoulos EN, Dambaki C, Kampa M, Theodoropoulos PA, Anezinis P, Delakas D, Delides GS, Castanas E (2003) Membrane androgen binding sites are preferentially expressed in human prostate carcinoma cells. *BMC Clin Pathol* 3:1
 114. Steinhuber A, Goerke C, Bayer MG, Döring G, Wolz C (2003) Molecular architecture of the regulatory Locus sae of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J Bacteriol* 185:6278–86
 115. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, Olin-Sandoval V, Grüning N, Krüger A, Tauqeer Alam M, Keller MA, Breitenbach M, Brindle KM, Rabinowitz JD, Ralser M (2015) The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev* 90:927–963
 116. Strominger JL, Park JT, Thompson RE (1959) Composition of the cell wall of *Staphylococcus aureus*: its relation to the mechanism of action of penicillin. *J Biol Chem* 234:3263–8
 117. Tan L, Li SR, Jiang B, Hu XM, Li S (2018) Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) System. *Front Microbiol* 9:1–11
 118. Thomer L, Schneewind O, Missiakas D (2016) Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 11:343–364
 119. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG (2015) *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev* 28:603–661
 120. Tuchscher L, Bischoff M, Lattar SM, Noto Llana M, Pförtner H, Niemann S, Geraci J, Van de Vyver H, Fraunholz MJ, Cheung AL, Herrmann M, Völker U, Sordelli DO, Peters G, Löffler B (2015) Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLOS Pathog* 11:e1004870
 121. Tuchscher L, Kreis CA, Hoerr V, Flint L, Hachmeister M, Geraci J, Bremer-Streck S, Kiehntopf M, Medina E, Kribus M, Raschke M, Pletz M, Peters G, Löffler B (2016) *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother* 71:438–448
 122. Valero A, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa JM, García-Gimeno RM, Zurera

- G (2009) Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int J Food Microbiol* 133:186–194
123. Viela F, Prystopiuk V, Leprince A, Mahillon J, Speziale P, Pietrocola G, Dufrêne YF (2019) Binding of *Staphylococcus aureus* Protein A to von Willebrand Factor Is Regulated by Mechanical Force. *MBio* 10:1–13
 124. Wang B, Muir TW (2016) Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chem Biol* 23:214–224
 125. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach T-HL, Queck SY, Li M, Kennedy AD, Dorward DW, Klebanoff SJ, Peschel A, DeLeo FR, Otto M (2007) Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 13:1510–1514
 126. Warner JB, Lolkema JS (2003) CcpA-Dependent Carbon Catabolite Repression in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:475–490
 127. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigó R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, LaHillier DW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520–562
 128. Weinrick B, Dunman PM, McAleese F, Murphy E, Projan SJ, Fang Y, Novick RP (2004) Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186:8407–23
 129. 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
 130. Wertheim HFL, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JAJW, van Keulen PH, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Meester MHM, Verbrugh HA (2004) Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 364:703–705

131. Wertheim HFL, Verveer J, Boelens HAM, van Belkum A, Verbrugh HA, Vos MC (2005) Effect of Mupirocin Treatment on Nasal, Pharyngeal, and Perineal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Healthy Adults. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1465–1467
132. Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S (2011) Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY)* 40:155–160
133. Yarwood JM, Schlievert PM (2003) Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest* 112:1620–1625
134. Ythier M, Resch G, Waridel P, Panchaud A, Gfeller A, Majcherczyk P, Quadroni M, Moreillon P (2012) Proteomic and Transcriptomic Profiling of *Staphylococcus aureus* Surface LPXTG-proteins: Correlation with *agr* Genotypes and Adherence Phenotypes. *Mol Cell Proteomics* 11:1123–1139
135. Zhu Y (2010) *Staphylococcus aureus* Virulence Factors Synthesis is Controlled by Central Metabolism. *Integrative Biomedical Science, The Graduate College at the University of Nebraska*. 3–4
136. Zhu Y, Nandakumar R, Sadykov MR, Madayiputhiya N, Luong TT, Gaupp R, Lee CY, Somerville GA (2011) RpiR Homologues May Link *Staphylococcus aureus* RNAlIIII Synthesis and Pentose Phosphate Pathway Regulation. *J Bacteriol* 193:6187–6196

8 Publikationen/Danksagung

8.1 Publikationen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in peer-begutachteten Abstractbänden oder Journalen veröffentlicht:

- Brausch AC, Kirch E, Bischoff M, Gaupp R. The small histidine-containing phosphocarrier protein HPr affects glucose metabolism and virulence in *Staphylococcus aureus*. *BIOspektrum Abstractbook 2017*, 175/MPV. 5th Joint Conference of the “Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie” (DGHM) and “Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie” (VAAM), Würzburg, Germany.
- Pätzold L, Brausch AC, Bielefeld EL, Zimmer L, Somerville GA, Bischoff M, Gaupp R. Impact of the Histidine-Containing Phosphocarrier Protein HPr on Carbon Metabolism and Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms* (2021) 9, 466. doi: 10.3390/microorganisms9030466

8.2 Danksagung

Zunächst danke ich Univ.-Prof. Dr. Dr. Sören Becker für die Möglichkeit zur Promotion in seinem Institut und Prof. Dr. Markus Bischoff, meinem Doktorvater, für die Bereitstellung des interessanten Themas und die vielen Ratschläge während meiner Forschungszeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Rosmarie Gaupp für die Betreuung dieser Arbeit. Durch deine Diskussionsbereitschaft, deine motivierende Art, unsere langen Gespräche und deine zahlreichen Ratschläge, habe ich sehr viel lernen können.

Forschung gelingt nur im Team und daher möchte ich mich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit während der Tierversuche bei Linda Pätzold und Jessica Wirf bedanken.

Herzlich danken möchte ich insbesondere Karin Hilgert sowie Philipp Jung, Janina Eisenbeis, Benjamin Kastel und Gubesh Gunaratnam für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und kompetente Hilfe während der Zeit im Labor.

Während angespannter Phasen waren meine Freunde unterstützend für mich da. Für die Motivation und die fachliche Unterstützung möchte ich ihnen, insbesondere Dr. Daniel Kiefer, danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und mir das Medizinstudium ermöglicht haben. Für die Beziehung, die wir haben und euren Rückhalt, bin ich mehr als dankbar.

Während meiner Forschungszeit hatte ich in meinen Mann Timo einen sehr wichtigen Ratgeber und Unterstützer, der mich immer wieder ermutigt hat und mir mit zahlreichen Ratschlägen zur Seite stand. Für die fachliche und emotionale Hilfe möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 04.11.2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Markus Bischoff
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Gabriela Krasteva-Christ