

Aus dem Bereich Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Theoretische Medizin und Biowissenschaften der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchung neuer Therapieoptionen und Wirkstoffoptimierung für *S. aureus*-induzierte Infektionen in murinen *in vivo* Modellen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften**

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

Januar 2021

vorgelegt von: Linda Pätzold

geb. am: 13.08.1991 in Radebeul

Tag der Promotion: 25.05.2023

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Bischoff  
Prof. Dr. Ulrich Boehm  
Prof. Dr. Thomas Volk  
Prof. Dr. Frieder Schaumburg

Vorsitzender: Prof. Dr. David Mick

Akademischer Mitarbeiter: Prof. Dr. Matthias Laschke

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. SUMMARY</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>3. EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1. Nosokomiale Infektionen</b> .....	<b>5</b>
3.1.1. Häufigkeit und Kosten .....	5
3.1.2. Risikofaktoren und Vorsorge .....	6
3.1.3. Typische nosokomiale Pathogene .....	7
<b>3.2. <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>9</b>
3.2.1. Krankheitsbilder .....	10
3.2.1.1. Wundinfektionen .....	11
3.2.1.2. Fremdkörper-assoziierte Infektionen .....	13
3.2.1.3. Systemische Infektionen .....	14
3.2.2. Erfolgsstrategien .....	16
3.2.3. Etablierte Behandlungsschemata .....	20
<b>3.3. Neue Therapieansätze für <i>S. aureus</i>-induzierte Infektionen</b> .....	<b>20</b>
3.3.1. Das Pathogen – neue Angriffspunkte für Wirkstoffe .....	23
3.3.1.1. Metabolismus .....	23
3.3.1.2. Proteinphosphorylierung .....	27
3.3.2. Neue Wirkstoffe und Wirkstoffoptimierung .....	28
3.3.2.1. RNA Polymerase-Inhibitoren als Breitbandantibiotika .....	29
3.3.2.2. PLGA-Nanokapseln als Wirkstoffapplikationssysteme .....	30
3.3.3. Der Wirt – Interleukin 17C als Target für Hautkrankheiten und Wundheilung .....	32
<b>3.4. Mäuse als Modellorganismen</b> .....	<b>33</b>
3.4.1. Wie wurde die Maus zum Modellorganismus? .....	35
3.4.2. Einsatzmöglichkeiten .....	36
3.4.3. Limitationen .....	36
<b>4. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>39</b>
<b>5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1. Das Histidin-haltige Phosphatträger Protein HPr in <i>S. aureus</i> als neues Antibiotika-Target</b> .....	<b>40</b>
<b>5.2. Die niedermolekularen Protein Phosphatasen PtpA und PtpB in <i>S. aureus</i> als neue Antibiotika-Targets</b> .....	<b>42</b>
<b>5.3. Optimierung von Rifampicin zur Behandlung <i>S. aureus</i>-infizierter Wunden</b> .....	<b>43</b>
<b>5.4. Einsatz von Polymer Nanokapseln zur Optimierung von Clarithromycin-Behandlungen</b> .....	<b>45</b>
<b>5.5. Der Einfluss des human Interleukins 17C auf die Heilung von <i>S. aureus</i>-infizierten Wunden</b> .....	<b>47</b>
<b>5.6. Ausblick</b> .....	<b>49</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIE</b> .....	<b>49</b>

<b>ANHANG – PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>62</b>
<b>Publikation A - Impact of the Histidine-Containing Phosphocarrier Protein HPr on Carbon Metabolism and Virulence in <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>Publikation B - PtpA, a secreted tyrosine phosphatase from <i>Staphylococcus aureus</i>, contributes to virulence and interacts with coronin-1A during infection.....</b>	<b>81</b>
<b>Publikation C - The Phosphoarginine Phosphatase PtpB from <i>Staphylococcus aureus</i> Is Involved in Bacterial Stress Adaptation during Infection .....</b>	<b>98</b>
<b>Publikation D - Evaluation of Bacterial RNA Polymerase Inhibitors in a <i>Staphylococcus aureus</i> Based Wound Infection Model in SKH1 Mice.....</b>	<b>118</b>
<b>Publikation E - PLGA nanocapsules improve the delivery of clarithromycin to kill intracellular <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Mycobacterium abscessus</i> .....</b>	<b>148</b>
<b>Publikation F - IL-17C and IL-17RE Promote Wound Closure in a <i>Staphylococcus aureus</i>-Based Murine Wound Infection Model .....</b>	<b>175</b>

## 1. Summary

Nosocomial infections are a major burden on the health care system worldwide and result in tens of thousands of deaths each year in addition to rising costs and extended hospitalization. A prominent cause of nosocomial infections is the gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Due to its various strategies to hide from the host immune response and antibiotic pressure, treatment of this pathogen is complicated. Diseases such as wound infections, sepsis, and foreign body infections, associated with biofilm formation, make *S. aureus* a challenging pathogen in hospitals and nursing homes. The development of resistance mechanisms against common antibiotics in recent decades has made antimicrobial treatment increasingly difficult.

The growing number of antibiotic-resistant bacteria necessitates the development of new treatment methods and substances, as well as the optimization of existing treatment options. The use of animal models to test *in vitro* promising substances and procedures under realistic and complex conditions is essential.

This work investigated new and optimized treatment options in different *S. aureus* based murine infection models to advance drug development, and included pathogen-, host- and substance-specific traits.

On the side of the pathogen, *S. aureus*, new target structures for drug development were investigated. In connection with the carbon metabolism of the bacterium, the histidine-containing protein HPr (encoded by *ptsH*) has been identified as a new promising target structure. Deletion of *ptsH* resulted in reduced biofilm formation and infectivity *in vivo* (publication A). From the range of protein phosphorylation mediating enzymes of *S. aureus*, the phosphatases PtpA and PtpB were identified as new promising target structures. The absence of even one of the phosphatases resulted in a drastic reduction of bacterial infectivity *in vivo* (publications B and C).

In the field of drug optimization, a new rifampicin derivative was investigated as an inhibitor of bacterial RNA polymerase. Rifampicin is an important antibiotic in tuberculosis treatment, and it serves as a reserve antibiotic for various bacterial infections. However, because of the increasing development of antibiotic resistance, optimization of this substance is urgently required. Although no positive treatment success was achieved with the *in vitro* highly potent substance under *in vivo* conditions, it was possible to establish a murine wound healing model in hairless SKH1 mice, and further structure analyses may help to develop a more functional derivative (publication D). In addition, an optimization of the treatment procedure for the antibiotic clarithromycin, which is poorly soluble in water, causes strong side effects, and is barely cell permeable, was sought. The inclusion of the active substance into polymer nano capsules greatly increased the bioavailability of the substance and the elimination of intracellularly surviving bacteria (publication E).

On the host side, the influence of interleukin 17C (IL-17C) on wound healing and elimination of bacteria in *S. aureus*-infected wounds was investigated. The peptide hormone mediates the immune response in the host and may cause skin diseases such as psoriasis in the event of dysfunction. Treatment with anti-IL-17C antibodies may cure this condition but is also considered to have an impact on wound healing and bacterial clearance. This study revealed that the expression of IL-17C in *S. aureus* infected wound tissue is significantly increased in humans. Although IL-17C-deficient mice had a significant delay in wound healing, a change in bacterial load in the wound could not be detected. The underlying mechanism for the delayed wound healing remained unclear (publication F).

In the scope of this work, murine infection models were used to identify new potential targets for antimicrobial substance development and to investigate their suitability. Existing therapeutic approaches were optimized, as well. The findings provide new approaches for the development of antimicrobial substances against the human pathogen *S. aureus*.

## 2. Zusammenfassung

Nosokomiale Infektionen stellen weltweit eine große Herausforderung für das Gesundheitssystem dar und resultieren, neben steigenden Kosten im Gesundheitswesen und verlängerten Aufenthalten der Patienten in der Klinik, in jährlich mehreren zehntausend Todesopfern. Ein prominenter Verursacher nosokomialer Infektionen ist das Gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Auf Grund diverser Strategien zur Umgehung der Wirtsimmunantwort und des Antibiotikadrucks, gestaltet sich eine Behandlung dieses Pathogens als besonders kompliziert. Krankheitsbilder wie Wundinfektionen, Sepsis und Fremdkörper-assoziierte Infektionen in Zusammenhang mit Biofilmbildung machen *S. aureus* zu einem gefürchteten Pathogen in Krankenhäusern und Pflegeheimen. Durch die Akkumulation von Resistenzmechanismen gegen gängige Antibiotika in den letzten Jahrzehnten wird eine antimikrobielle Behandlung zunehmend erschwert.

Die zunehmende Anzahl Antibiotika-resistenter Bakterien macht eine Entwicklung neuer Behandlungsmethoden und Substanzen, sowie die Optimierung bisheriger Behandlungsoptionen dringend erforderlich. Der Einsatz von Tiermodellen zur Testung vielversprechender Substanzen und Behandlungsschemata unter *in vivo* Bedingungen in einem dem Menschen nahekommenden Wirtssystem ist dabei unerlässlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse neue und optimierte Behandlungsoptionen in verschiedenen murinen Infektionsmodellen untersucht, um die Wirkstoffentwicklung voranzutreiben. Dabei wurden sowohl das Pathogen *S. aureus*, als auch der Wirt und die Wirkstoffe selbst in die Betrachtungen einbezogen.

Auf Seiten des Pathogens *S. aureus* wurden neue Zielstrukturen für Wirkstoffe näher beleuchtet. So konnte das, mit dem Kohlenstoffmetabolismus des Bakteriums in Verbindung stehende, Histidin-haltige Phosphatträgerprotein HPr als neue vielversprechende Zielstruktur identifiziert werden. Eine Deletion des für HPr codierenden Gens *ptsH* resultierte in einer verringerten Biofilmbildung und Infektiosität *in vivo* (Publikation A). Aus dem Reservoir der Proteinphosphorylierung-vermittelnden Enzyme von *S. aureus* konnten die beiden niedermolekularen Protein-Phosphatasen PtpA und PtpB als vielversprechende neue Zielstrukturen identifiziert werden. Das Fehlen bereits einer der Phosphatasen resultierte in einer drastischen Reduktion der Infektiosität des Bakteriums *in vivo* (Publikationen B und C).

Im Bereich der Wirkstoffoptimierung wurde zum einen ein neues Rifampicin-Derivat als Inhibitor der bakteriellen RNA-Polymerase untersucht. Auf Grund der enormen Bedeutung von Rifampicin für die Behandlung vieler Infektionskrankheiten und der zunehmenden Resistenzentwicklung ist eine Optimierung des Wirkstoffs dringend notwendig.

Zwar konnte im Rahmen der durchgeführten *in vivo* Experimente kein positiver Behandlungserfolg mit dem *in vitro* sehr potenten Wirkstoffkandidaten verzeichnet werden, doch es war möglich, ein neues, einfaches murines Wundmodell in haarlosen SKH1 Mäusen zu etablieren und die Grundlage für weiterführende Strukturanalysen zur Wirkstoffoptimierung zu schaffen (Publikation D). Zum anderen wurde die Behandlungsoptimierung des schlecht wasserlöslichen, starke Nebenwirkungen verursachenden und nur schwer zellgängigen Antibiotikums Clarithromycin angestrebt. Durch den Einschluss des Wirkstoffes in Polymer-Nanokapseln wurde die intrazelluläre Bioverfügbarkeit des Stoffes und die Abtötungskinetik intrazellulär persistierender Bakterien enorm gesteigert (Publikation E).

Auf Seiten des Wirtes wurde der Einfluss des Interleukins 17C (IL-17C) auf die Heilung und Bakterienbeseitigung in *S. aureus*-infizierten Wunden untersucht. Das Peptidhormon gilt als ein wichtiger Mediator der Immunantwort im Wirt und kann bei einer Dysfunktion Hauterkrankungen wie Psoriasis verursachen. Eine Behandlung mit Anti-IL-17C Antikörpern könnte dieses Krankheitsbild zwar lindern, gleichzeitig aber auch einen negativen Einfluss auf die Wundheilung haben. Die Untersuchungen zeigten, dass die Expression von IL-17C in *S. aureus* infiziertem Wundgewebe in Menschen deutlich erhöht ist. In IL-17C defiziente Mäuse konnte eine deutlich verlangsamte Heilungskinetik der infizierten Wunden festgestellt werden, es zeigten sich jedoch keinerlei Unterschiede in der Bakterienlast in den Wunden. Der zu Grunde liegende Mechanismus für die verminderte Wundheilung konnte nicht identifiziert werden (Publikation F).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch den Einsatz muriner Infektionsmodelle neue Angriffspunkte für die antimikrobielle Substanzentwicklung identifiziert und auf ihre Eignung zur Therapie von *S. aureus* untersucht werden. Zudem konnten bestehende Therapieansätze optimiert werden. Die Untersuchungen liefern somit eine Reihe neuer Ansatzpunkte für die zukünftige Entwicklung antimikrobieller Substanzen gegen das Humanpathogen *S. aureus*.



### **3. Einleitung**

#### **3.1. Nosokomiale Infektionen**

Das deutsche Infektionsschutzgesetz (IfSG) definiert eine nosokomiale Infektion als „eine Infektion mit lokalen oder systemischen Infektionszeichen als Reaktion auf das Vorhandensein von Erregern oder ihrer Toxine, die im zeitlichen Zusammenhang mit einer stationären oder einer ambulanten medizinischen Maßnahme steht, soweit die Infektion nicht bereits vorher bestand“ (§2 Nummer 8 IfSG). Auf Grund des definierten zeitlichen Zusammenhanges mit stationären oder ambulanten Aufenthalten sind nosokomiale Infektionen vor allem in Pflegeheimen und Krankenhäusern vorzufinden.

Nosokomiale Infektionen stellen weltweit ein beträchtliches Problem für das Gesundheitswesen dar, da sie Krankenhausaufenthalte verlängern und hohe Kosten verursachen. Die Krankheitsbilder variieren dabei stark. Das Krankheitsspektrum reicht von Wund- und Fremdkörperinfektionen über Blutstrominfektionen, Durchfallerkrankungen und Harnwegsinfekte bis hin zu respiratorischen Infektionen (KERWAT et al., 2010). Auf Grund des meist schlechten Gesundheitszustandes der Patienten und allfälliger Begleiterkrankungen, stellen nosokomiale Infektionen für den Patienten vielfach eine lebensbedrohliche Situation dar.

Die Verbreitung von nosokomialen Pathogenen (Pilze, Bakterien, Viren) kann auf verschiedensten Wegen erfolgen. Nosokomiale Pathogene (insbesondere Bakterien) leben oft als Kommensalen auf der Haut, in den oberen Atemwegen oder dem Verdauungstrakt von Menschen und verursachen bei intaktem Immunsystem keinerlei Krankheitssymptome. Erst bei einer Übertragung der Pathogene der natürlichen Flora des Menschen mittels kontaminierten Equipments, Wäscheartikeln oder direktem und indirektem (Aerosole) Kontakt von Personal mit immundefizienten Patienten (Vergleich **Abbildung 1**), kann es zur Ausbildung einer nosokomialen Infektion beim Patienten kommen (ROSENTHAL et al., 2008; SCHAAL, 1991).

##### **3.1.1. Häufigkeit und Kosten**

Laut WHO-Report aus dem Jahr 2011 erkranken in einkommensschwachen Ländern etwa 10 %, in einkommensstarken Ländern etwa 7 % aller im Krankenhaus behandelten Patienten an einer nosokomialen Infektion (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2011). Im weltweiten Durchschnitt erkranken etwa 8,7 % aller Krankenhauspatienten an einer nosokomialen Infektion (NI) und zu jedem Zeitpunkt kämpfen etwa 1,4 Millionen Menschen weltweit mit Komplikationen, die im Zusammenhang mit NIs stehen; eine Zahl, die sich in den letzten 30 Jahren kaum verändert hat (MAYON-WHITE et al., 1988; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2011).

In Deutschland erkranken jährlich etwa eine halbe Million Menschen an einer nosokomialen Infektion, 10.000 - 15.000 Patienten versterben an ihr (KERWAT et al., 2010). Damit stellen NIs eine große Belastung für das Gesundheitswesen dar. Die Behandlung von NIs verursacht durch verlängerte Krankenhausaufenthalte der Patienten und intensivere Folgebehandlungen und eventuelle Restaurierungen am Infektionsort enorme Kosten. So verlängert sich der Aufenthalt auf Intensivstationen bei nosokomial erworbenen Pneumonien in Zusammenhang mit künstlicher Beatmung (VAP – ventilator associated pneumonia) um 9,1 Tage, bei nosokomial erworbenen Katheter-induzierten Blutstrominfektionen (CLABSI – central line associated bloodstream infection) um bis zu 9,5 Tage (MEHTA et al., 2016). Bei der Behandlung von nosokomial erworbenen Blutstrominfektionen entstehen beispielsweise Mehrkosten von durchschnittlich 4.900 € (VRIJENS et al., 2010). Eine Optimierung der Behandlungsmethoden zur Senkung von Kosten und Mortalität ist neben der Verhinderung des Entstehens nosokomialer Infektionen (vor allem von großen Ausbruchsgeschehen) daher unerlässlich.

### **3.1.2. Risikofaktoren und Vorsorge**

Die Risikofaktoren, an einer NI zu erkranken, sind vielfältig und umfassen nicht nur den allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten, sondern auch die Krankenhausumgebung und die Qualität des Monitorings und Gesundheitsmanagements im entsprechenden Gebiet. So ist es wenig verwunderlich, dass das Risiko einer NI in einkommensschwachen Gegenden erhöht ist (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2011).

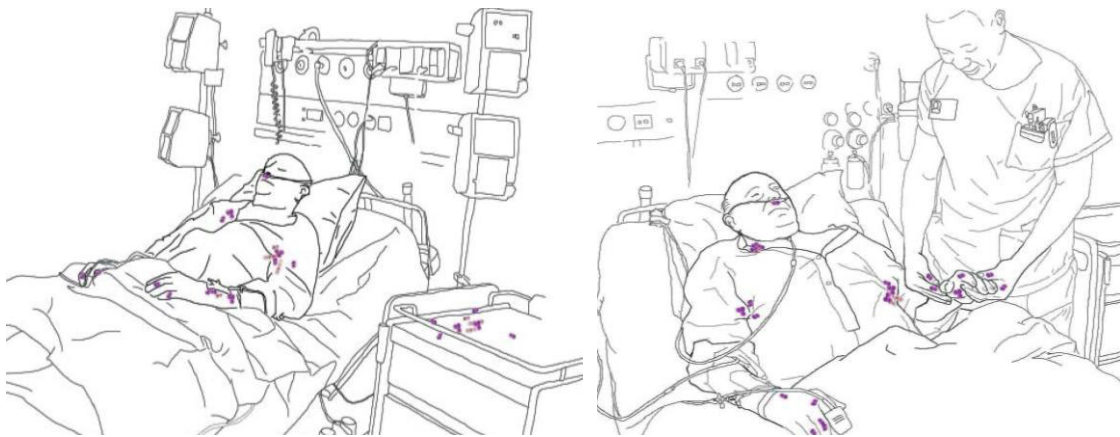
Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko einer nosokomialen Infektion, da Patienten oft Vorerkrankungen aufweisen, die zu häufigeren stationären und ambulanten Aufenthalten und somit zu einer erhöhten Exposition führen (KERWAT et al., 2010; SAFDAR, MAKI, 2002). Doch auch die Art der Verletzung beziehungsweise der Erkrankung, die einen Aufenthalt bedingt, kann das Risiko, an einer NI zu erkranken, erhöhen. So führen schwerwiegende Eingriffe und Operationen beispielsweise nach einem Organversagen und einer Organtransplantation dazu, dass Patienten vermehrt Kontakt zu invasiven Behandlungsformen und ein insgesamt geschwächtes Immunsystem, gepaart mit längeren Aufenthalten und massivem Antibiotikakontakt, haben, die das Risiko einer NI stark erhöhen (SAFDAR, MAKI, 2002). Auch der Verlust der körpereigenen Schutzmechanismen der Haut, wie sie beispielsweise nach Verbrennungen auftreten, erhöht das Risiko einer Infektion (KERWAT et al., 2010).

Neben der Prädisposition des Patienten ist auch das Gesundheitsmanagement der entsprechenden Einrichtung ein großer Risikofaktor für die Entstehung von NIs. Schlecht ausgebildetes Personal, unzureichende Hygienemaßnahmen im Krankenhausbetrieb (Wasser, Luft, Oberflächendesinfektion) und das fehlende Monitoring von Ausbruchsgeschehen erhöhen das Risiko für die Patienten (KERWAT et al., 2010).

Insbesondere Antibiotika-resistente Bakterien, die mit den im Klinikalltag gebräuchlichen Antibiotika nicht beseitigt werden können, stellen eine große Gefahr dar, da sie im schlimmsten Fall endemisch werden oder sich im gesamten Krankenhaus verbreiten können (BASTOS MDO et al., 2015; MAK et al., 2014).

Um das Risiko von NIs zu reduzieren, identifizierten Zingg und Kollegen aus 92 Studien, die im Zeitraum von 1996 bis 2012 publiziert wurden, 10 Schlüsselkomponenten, die zu einer verbesserten Krankenhaushygiene führen. Diese umfassen beispielsweise ein optimiertes Training der Belegschaft, eine Reduktion der Arbeitsmenge des Personals, Präventionsprogramme und eine engmaschigere Überwachung. Bereits durch diese einfach zu etablierenden und gut umsetzbaren Programme kann die Sicherheit der Patienten enorm gesteigert werden. (ZINGG et al., 2015)

Abbildung 1 fasst typische Übertragungswege für nosokomiale Pathogene anschaulich zusammen.



**Abbildung 1: Mögliche Ausgangspunkte für die Pathogentransmission**

Neben dem Patienten können auch Personal, medizinische Geräte und die Umgebung (Einrichtung) Ausgangspunkt für die Übertragung von Pathogenen und die Ausbildung einer nosokomialen Infektion sein (typischerweise kontaminierte Areale sind violett hervorgehoben).

Quelle: PITTET et al., 2006

### 3.1.3. Typische nosokomiale Pathogene

Nosokomiale Infektionen können sowohl von Bakterien, Viren, Parasiten, als auch von Pilzen verursacht werden (EICKHOFF, 1994; SCHAAL, 1991). Tabelle 1 zeigt eine Auswahl der häufigsten nosokomialen Ausbrüche in Deutschland, die für das Jahr 2019 vom Robert-Koch-Institut (RKI) registriert wurden.

**Tabelle 1: Nosokomiale Ausbrüche in Deutschland, 2019 (ROBERT KOCH INSTITUT (RKI), 2020).**

	<b>Erreger</b>	<b>Anzahl der Ausbrüche</b>	<b>Fallzahlen gesamt</b>	<b>Todesfälle gesamt</b>
<b>Viren</b>	Norovirus	1.268	13.398	34
	Influenzavirus	326	2.264	44
	Rotavirus	200	2.033	6
<b>Bakterien</b>	<i>Clostridioides difficile</i>	28	107	7
	<i>Klebsiella</i> spp.	12	106	12
	<i>Staphylococcus</i> spp.	7	61	0
	<i>Escherichia coli</i>	3	11	3
	<i>Pseudomonas</i> spp.	2	5	1
<b>Pilze</b>	<i>Candida</i> spp.	1	17	8
<b>Parasiten</b>	<i>Sarcoptes scabiei</i> (Scabies)	19	131	1
	<i>Pediculus humanus capitis</i> (Kopfläuse)	4	27	0

In der Erregergruppe der Bakterien stellen neben Clostridien und Klebsiellen die Staphylokokken einen Hauptverursacher von NIs dar. Insbesondere *Staphylococcus aureus* in seiner Methicillin-resistenten Form (MRSA – Methicillin-resistente *S. aureus*) bereitet seit mehreren Jahrzehnten große Probleme im Krankenhausalltag (LOWY, 1998; NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS), 1999). Die Mortalität ist bei MRSA-Isolaten im Vergleich zu sensitiven Stämmen (MSSA – Methicillin-sensitive *S. aureus*) drastisch erhöht (COSGROVE et al., 2003). Im Jahr 2019 wurden insgesamt 1.801 invasive MRSA Fälle in Blut und Liquor von Patienten nachgewiesen, 129 Patienten verstarben in direkter Folge der invasiven Infektion (ROBERT KOCH INSTITUT (RKI), 2020). Da diese Untersuchung auch Fallzahlen nicht-nosokomial erworbener MRSA Infektionen mit einbezieht, ist die Fallzahl im Vergleich zu Tabelle 1 deutlich erhöht. Nicht-meldepflichtige Infektionen mit MSSA wurden nicht erfasst.

Für eine bessere Einschätzung des Anteils von MRSA an nosokomialen *S. aureus* Infektionen, zeigt Tabelle 2 die Häufigkeit von MRSA und MSSA in verschiedenen Bereichen von Krankenhäusern von 2007 bis 2014. An der Studie nahmen bis 2014 mehr als 800 Intensivstationen und mehr als 900 operative Abteilungen teil. Ein Rückschluss auf die Gesamtfallzahl in Deutschland ist aus diesen Daten auf Grund der beschränkten Teilnehmerzahl jedoch nicht möglich. Über den Studienzeitraum konnte ein Rückgang der MRSA-Infektionen von 23 % festgestellt werden (ROBERT KOCH INSTITUT (RKI), 2016). Dennoch stellt *S. aureus* und insbesondere MRSA nach wie vor eine große Herausforderung in deutschen Krankenhäusern dar.

Tabelle 2: *S. aureus* Infektionen (inkl. MRSA) von 2007 bis 2014 in Deutschland (ROBERT KOCH INSTITUT (RKI), 2016).

	2007/2008	2009/2010	2011/2012	2013/2014
<b>Anzahl teilnehmender Intensivstationen</b>	465	533	645	832
<b>Anzahl teilnehmender operative Abteilungen</b>	432	558	681	963
<b>Anzahl nosokomialer <i>S. aureus</i> Infektionen (inkl. MRSA)</b>	2.654	2.727	2.856	3.177
<b>Anzahl nosokomialer MRSA Infektionen</b>	870	836	753	800
<b>Anzahl nosokomialer <i>S. aureus</i> Infektionen (inkl. MRSA) auf Intensivstationen</b>	1.913	1.965	2.072	2.246
<b>Anzahl nosokomialer MRSA Infektionen auf Intensivstationen</b>	719	679	627	657
<b>Anzahl nosokomialer <i>S. aureus</i> Infektionen (inkl. MRSA) in operativen Abteilungen</b>	741	762	784	931
<b>Anzahl nosokomialer MRSA Infektionen in operativen Abteilungen</b>	151	157	126	143

### 3.2. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* ist ein Gram-positives, immobiles Bakterium aus der Familie der *Staphylococcaceae* und hat eine Größe von 0,8 – 1,2 µm (EUZEBY, 2010). Die Namensgebung des Bakteriums verweist auf einige typische Eigenschaften: das griechische *staphylé* (Weintraube) und *kókkus* (Beere) beziehen sich auf die traubenähnliche Clusteranordnung der kugelförmigen Zellen (Vergleich Abbildung 2), während das lateinische *aureus* (golden) auf die gold-gelbe Pigmentierung der Kolonien hinweist (WILKINSON, 1997).

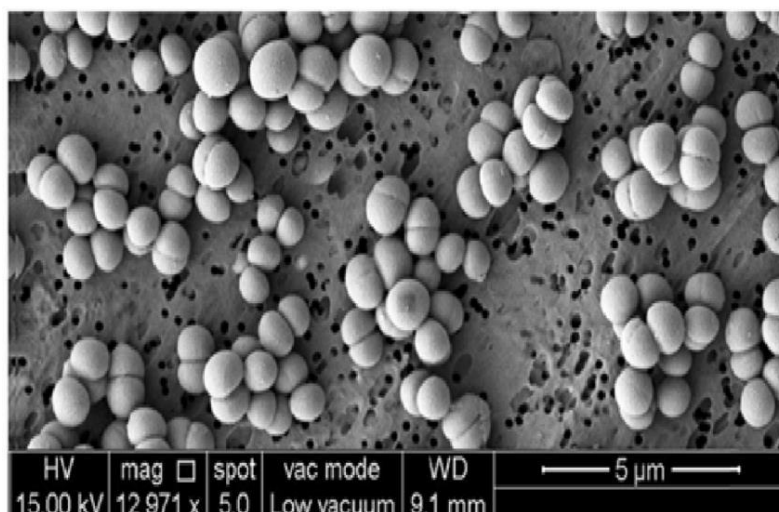


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* (12971-fache Vergrößerung)

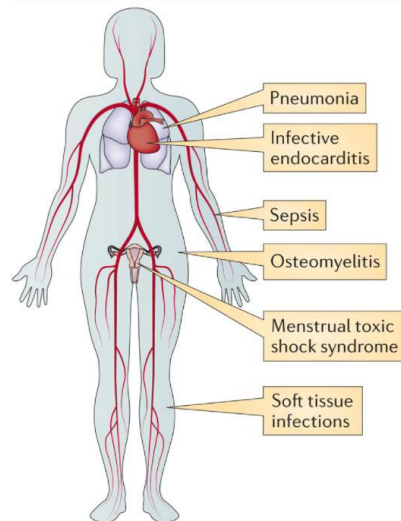
Quelle: ALDUJAILY et al., 2019

Das Bakterium kolonisiert Schleimhäute (und die Haut) von Vögeln und Säugetieren (LOWY, 1998), wobei es vornehmlich im oberen respiratorischen Trakt, dem Intimbereich und unter den Achseln, seltener auf der Haut (durch Verschleppung) nachweisbar ist (ARMSTRONG-ESTHER, SMITH, 1976; BROWN et al., 2014; GUINAN et al., 1982). Etwa 30 % der Bevölkerung weltweit sind dauerhaft und in der Regel asymptomatisch mit Bakterien dieser Spezies besiedelt (WERTHEIM et al., 2005), die Rate der temporären Trägerschaft liegt bei bis zu 60 % (VAN BELKUM et al., 2009). Aufgrund der hohen Trägerrate und der Fähigkeit des Bakteriums, auf unbelebter Materie (z.B. Türgriffe) für mehrere Wochen zu überleben, ist *S. aureus* ein bedeutsames nosokomiales Pathogen (KRAMER et al., 2006). Begünstigt wird diese Lebensweise durch die Ausbildung einer Mikrokapsel, welche nicht nur vor ungünstigen Lebensbedingungen und Austrocknung, sondern auch vor Phagozytose durch Wirtszellen schützt (LOWY, 1998).

Das Genom von *S. aureus* weist eine Größe von ~ 2,8 Megabasenpaaren (Mbp) auf und umfasst eine Vielzahl mobiler chromosomaler und extra-chromosomaler genetischer Elemente (z.B. Prophagen, Transposons und Plasmide) und Gene, die für Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzen kodieren (LOWY, 1998; NOVICK, 1990). Auf Grund der großen Anzahl mobiler genetischer Elemente ist die Art *S. aureus* sehr heterogen (ALIBAYOV et al., 2014). Eine detailliertere Betrachtung der Resistenzmechanismen und Virulenzfaktoren erfolgt im Kapitel 3.2.2.

### **3.2.1. Krankheitsbilder**

In der Regel verläuft eine Trägerschaft des Bakteriums asymptomatisch, solange der Wirt ein intaktes Immunsystem aufweist. Abhängig von der Veranlagung und dem Gesundheitszustand des Wirtes, sowie dem Virulenzfaktorrepertoire des Bakteriums, kann *S. aureus* eine Bandbreite unterschiedlich schwerwiegender Krankheitsbilder verursachen (Vergleich Abbildung 3). *S. aureus*-assoziierte Erkrankungen reichen dabei von oberflächlichen Hautinfektionen wie Impetigo contagiosa (hochinfektiöser, nässender Hautausschlag) und exfoliativer Dermatitis über tief sitzende Haut- und Gewebeanfektionen (Furunkel und Abszesse) bis hin zu schwerwiegenden, potentiell tödlichen, Erkrankungen wie Pneumonie, Sepsis, Endokarditis, nekrotisierende Faszitis, Osteomyelitis, das toxische Schocksyndrom (vor allem in Zusammenhang mit unzureichender Menstruationshygiene) und Implantat-assoziierte Infektionen (DAUM, 2007; MCCAIG et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2009; SALGADO-PABON, SCHLIEVERT, 2014; TONG et al., 2015).



**Abbildung 3: *S. aureus*-induzierte Krankheitsbilder im Menschen**

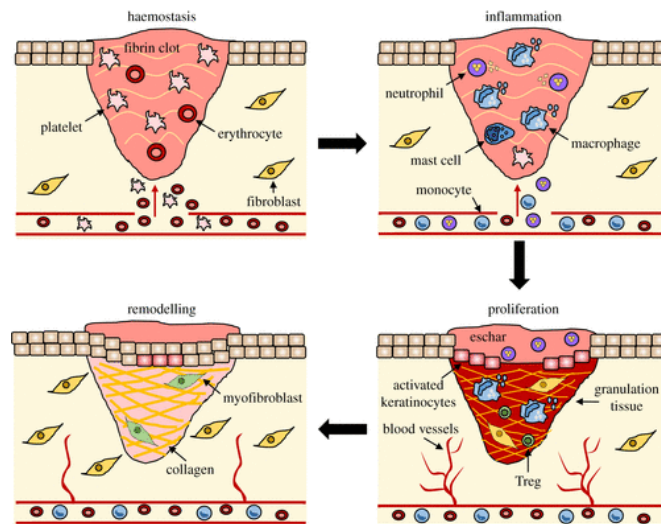
Die Bandbreite von *S. aureus*-induzierten Erkrankungen reicht von Hautinfektionen über systemische Infektionen (Sepsis), bis hin zu Pneumonie und Osteomyelitis.

Quelle: SALGADO, SCHLIEVERT, 2014

Im Nachfolgenden soll auf einige der Krankheitsbilder eingegangen werden, welche mit den Pathogenitätsmechanismen in Zusammenhang stehen, die im Rahmen dieser Arbeit betrachtet werden.

### **3.2.1.1. Wundinfektionen**

Wundheilung ist ein hochkomplexer Ablauf, bei dem Gewebe-reparierende Zellen und Zellen des Immunsystems wie Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten und Leukozyten koordiniert zusammenwirken müssen. Während der Wundheilung laufen nacheinander Hämostase, Inflammation (Entzündungsreaktion), Zellproliferation und Remodellierung ab (JOHNSON, WILGUS, 2014; WANG et al., 2012). Abbildung 4 veranschaulicht diese Abläufe auf zellulärer Ebene.



**Abbildung 4: Phasen der Wundheilung nicht-infizierter Wunden**

Durch Ausbildung eines Blutpfropfs wird die Blutung gestillt (haemostasis). Immunzellen strömen ein und beseitigen Zelltrümmer und Fremdkörper wie Bakterien (inflammation). Ausgehend von den Wundrändern kommt es zu einer vermehrten Proliferation von Keratinozyten und dem Einwandern in den Wundbereich, um die Wunde zu verschließen (proliferation). Abschließend wird das neu gebildete Gewebe durch Kollagenfasern stabilisiert und durch eine Epithelschicht nach außen abgegrenzt (remodelling).  
Quelle: WILKINSON, HARDMAN, 2020

Nach einer Verletzung werden in der ersten Phase (Hämostasis) durch eine Verengung der Blutgefäße (Konstriktion) und die Bildung eines Blutplättchen-Pfropfs eventuelle Blutungen gestoppt und die geschädigten Gefäßwände abgedichtet. Gleichzeitig wird eine vorläufige Fibrinmatrix ausgebildet, an der sich nachfolgende Zellen zur Wunde hinbewegen können. Die Wanddurchlässigkeit kleinster Blutgefäße im Wundbereich nimmt zu, sodass vermehrt Neutrophile in den Wundbereich einwandern können. Induziert wird dieser Neutrophileinstrom durch die Freisetzung von Histaminen aus Mastzellen und der Freisetzung von beispielsweise Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Chemokinen aus den beschädigten Zellen im Wundbereich. Mit zeitlicher Verzögerung erreichen auch Monozyten die Wunde und differenzieren zu Makrophagen. Der gesamte Prozess der Inflammation dient der Beseitigung von Zelltrümmern und etwaigen Fremdkörpern (z.B. Bakterien). Während der Proliferationsphase kommt es zu einer verstärkten Zellteilung der Keratinozyten im Bereich der Wundränder, welche anschließend in die Wunde einwandern und so einen Wundschluss, ausgehend von den Wundrändern her, einleiten. Unterstützt wird die Migration durch den Austausch der initialen Fibrinmatrix durch Granulationsgewebe (Fibroblasten) und stabilisierende Kollagen-Vorstufen, die ein Zusammenziehen der Wundränder und damit eine Verkleinerung der Wunde begünstigen. Durch die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) wird zudem das stark proliferierende Gewebe mit Nährstoffen versorgt. Makrophagen und regulatorische T-Zellen (Tregs) unterstützen die Angiogenese. Abschließend erfolgt eine Stabilisierung und Vernetzung der Kollagenfaser-Vorstufen, wodurch ein Narbengewebe entsteht. Epithelzellen, die von den Wundrändern einwandern, bedecken schließlich die gesamte Wundoberfläche (Re-Epithelisierung). (BROUGHTON et al., 2006; RODRIGUES et al., 2018; TAKEO et al., 2015; VELNAR et al., 2009; WILKINSON, HARDMAN, 2020)



In chronischen Wunden (Wundheilung ist nach 8 Wochen nicht abgeschlossen (DISSEMOND et al., 2017)) werden hingegen von den aktivierten Leukozyten vermehrt zytolytische Enzyme wie reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), Matrix-Metalloproteasen und inflammatorische Mediatoren ausgeschüttet. Dies dient vor allem dem Abbau von nicht-wiederherstellbarem Gewebe und klingt im normalen Wundheilungsverlauf nach wenigen Tagen wieder ab. In chronischen Wunden verbleiben die zytolytischen Enzyme jedoch im Gewebe (FRYKBERG, BANKS, 2015). So entsteht im Wundbereich ein Ungleichgewicht, das wiederum die Besiedlung mit Bakterien begünstigt (SERRA et al., 2016). Diese chronischen Wunden heilen deutlich langsamer und mit häufigeren Komplikationen. Besonders oft treten sie bei älteren Patienten, Diabetikern oder in Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen auf (GUEST et al., 2015; LINDHOLM, SEARLE, 2016). So konnte bei 60 % der chronischen Wunden die verzögerte Wundheilung auf das Vorliegen bakterieller Biofilme zurückgeführt werden (JAMES et al., 2008). Auch *S. aureus* ist in der Lage, Biofilme auszubilden und so einen Überlebensvorteil zu generieren. Auf die Biofilmbildung des Bakteriums wird in Kapitel 3.2.2. genauer eingegangen.

### **3.2.1.2. Fremdkörper-assoziierte Infektionen**

In der immer älter werdenden Gesellschaft nimmt der Einsatz von invasiven, medizinischen Fremdkörpern wie Kathetern (intravaskulär oder venös), Herzschrittmachern, Dialyse-Ports, Prothesen und Harnkathetern stetig zu. Diese Fremdkörper können Ausgangspunkt schwerwiegender bakterieller Infektionen in Form von Biofilmen am implantierten Material werden (DONLAN, 2001; HOGAN et al., 2019). Grund hierfür ist, dass es selbst unter idealen Bedingungen nahezu unmöglich ist, sterile Wunden zu generieren. So konnte zum Zeitpunkt des operativen Wundschlusses bei 90% der ursprünglich „sauberen“ Wunden *S. aureus* nachgewiesen werden (NELSON, 1979; OAKES, WOOD, 1986). Die Übertragung kann hierbei durch kontaminiertes Material, den Patienten selbst oder durch das Personal verursacht werden. Rund 45 % der NIs stehen in Zusammenhang mit kontaminierten Fremdkörpern und medizinischen Geräten. Eine Vielzahl der Infektionen könnte verhindert werden, wenn sich strikt an die Regeln und Protokolle der Infektionskontrolle gehalten werden würde (SCHIERHOLZ, BEUTH, 2001). Besonders anfällig für bakterielle (*S. aureus*) Infektionen sind Knorpel, Knochen, Implantatmaterial und traumatisiertes Gewebe, da die Bakterien sehr gut an geschädigtes Gewebe adhären können und es ihnen gleichzeitig wertvolle Nährstoffe liefert (GRISTINA, 1987).

In der Regel ist das Immunsystem des Wirtes dazu in der Lage, die eingedrungenen Bakterien zu beseitigen, doch ein geschwächtes Immunsystem begünstigt, ebenso wie traumatisierte Gewebeoberflächen, Implantate oder sehr hohe Bakterienmengen im Inokulum (Pathogen-haltige Substanz, über die die Infektion initiiert wird), die Bildung von Infektionen (SCHIERHOLZ, BEUTH, 2001).

Hauptverursacher von Fremdkörper-assoziierten Infektionen sind die Gram-positiven Bakterien *S. aureus* und *S. epidermidis*, wobei letzteres ein typischer Hautkommensale des Menschen ist, doch auch Enterokokken, Streptokokken und die Gram-negativen Pathogene *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* werden häufig als Verursacher dieser Infektionen identifiziert (DONLAN, 2001; SCHIERHOLZ, BEUTH, 2001). Im Falle von *S. aureus* wird diese Art der Infektion durch seine weitverbreitete Besiedlung des Menschen und durch seine Fähigkeit, Biofilme ausbilden zu können, begünstigt.

Eine Behandlung von Fremdkörper-assoziierten Infektionen ist in der Regel äußerst kompliziert, zeitaufwendig, mit vielen Komplikationen verbunden und eine große Belastung für den Patienten. So erfolgt die Beseitigung von Biofilmen an Prothesen mit einer Kombination aus Antibiotikatherapie und Débridement, also der Entfernung infizierten, geschädigten oder nekrotischen Gewebes. Da eine vollständige Beseitigung der Bakterien meist jedoch nicht möglich ist, erfolgt in vielen Fällen eine vollständige Entfernung des Implantates. (EL HAJ et al., 2017)

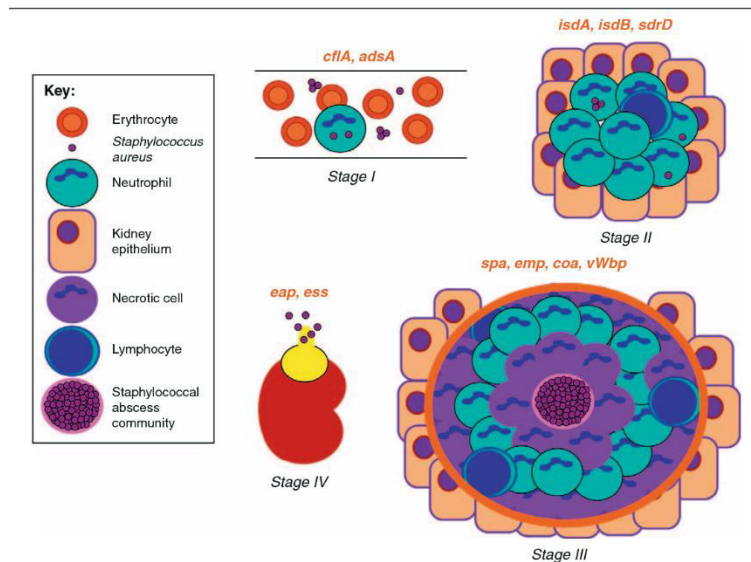
### **3.2.1.3. Systemische Infektionen**

Systemische Infektionen gehören zu den schwerwiegendsten Krankheitsbildern, die von *S. aureus* verursacht werden können. Die Angaben zur Inzidenz schwanken hierbei in Abhängigkeit des Umfangs der durchgeführten Studien, doch es konnte ein enger Zusammenhang der Inzidenzen mit der Qualität des Gesundheitssystems und der Kontrolle von Infektionsgeschehen durch die entsprechenden Institutionen identifiziert werden. So konnte eine weltweite jährliche Inzidenz von 20-30 Fällen von *S. aureus*-induzierten Blutstrominfektionen pro 100.000 Einwohner ermittelt werden. Isolierte Gemeinschaften mit geringer medizinischer Versorgung wie die Aboriginies in Australien weisen hingegen jährliche Inzidenzen von bis zu 172 Fällen pro 100.000 Einwohnern auf. Die beiden anderen bedeutenden Blutstrominfektionen-verursachenden Pathogene *Escherichia coli* und *Streptococcus pneumoniae* weisen durchschnittlich eine weltweite jährliche Inzidenz von 35 bzw. 10 Fällen pro 100.000 Einwohner auf. (LAUPLAND et al., 2013)

Die Sterblichkeit innerhalb eines Jahres liegt bei *S. aureus* induzierten Blutstrominfektionen bei bis zu 30 % (HUGGAN et al., 2010).

Die Invasion des Bakteriums kann auf unterschiedlichsten Wegen stattfinden. So kann das Bakterium unter anderem von außen durch Schnitte in der Haut oder kontaminiertes medizinisches Material in den Körper gelangen oder, ausgehend von manifestierten eitrigen Abszessen und Entzündungen des Gewebes, über das Blut- und Lymphsystem weiter im Körper verbreitet werden und so zur Bildung neuer Abszesse führen (LOWY, 1998).

Cheng und Kollegen (CHENG et al., 2011) gelang es, mit Hilfe eines murinen *in vivo* Modells, ein auf den Menschen übertragbares Modell für die Entstehung bakterieller Abszesse im Rahmen systemischer Infektionen zu entwickeln (Vergleich Abbildung 5). Die Übertragbarkeit auf den Menschen konnte durch Übereinstimmungen in den Infektionsbildern und bereits bekannte charakteristische Abläufe im Menschen bestätigt werden (CHENG et al., 2009; POLLITT et al., 2018).



**Abbildung 5: Ablauf der bakteriellen Abszessbildung an der Niere im Rahmen systemischer Infektionen**

Das Bakterium liegt nach intravenöser Injektion extrazellulär oder nach Phagozytose in Neutrophilen vor (Stage I). Die Ansiedlung im peripheren Gewebe verursacht eine Entzündungsreaktion, die Immunzellen zum Entzündungsort rekrutiert (Stage II). Innerhalb von 4 Tagen bildet sich in der Mitte der Läsion ein Abszess, der durch eine fibrinhaltige Pseudokapsel (rosa) vor den umgebenden Immunzellen geschützt ist (Stage III). Durch eine Ruptur des Abszesses kommt es zur Freisetzung von Bakterien, die an anderer Stelle neue Läsionen hervorrufen können (Stage IV). Beteiligte Gene sind in oranger Schrift der jeweiligen Stufe zugeordnet.

Quelle: CHENG et al., 2011

Die Abszessbildung findet nach Eindringen des Bakteriums in die Blutbahn in vier Stufen in Nieren, Leber, Milz und Lunge statt. Das Bakterium wird von Immunzellen phagozytiert und überlebt intrazellulär (eine Überlebensstrategie von *S. aureus*, auf die in Kapitel 3.2.2. näher eingegangen wird) oder zirkuliert extrazellulär (Stufe 1) im Gefäßsystem, bevor es sich in peripheres Gewebe absiedelt und dabei eine Entzündungsreaktion hervorruft. Die Entzündung initiiert eine Rekrutierung von Neutrophilen und Phagozyten (Stufe 2) sowie die Abkapselung des umgebenden gesunden Gewebes durch Fibrineinlagerungen des Wirts. Das sich replizierende Bakterium verursacht eine massive Läsion im Gewebe, indem es Wirtszellen lysiert, um an Nährstoffe zu gelangen. Innerhalb von vier Tagen entwickelt sich im Zentrum der Läsion ein isolierter Abszess (SAC – staphylococcal abscess community), der durch eine fibrinhaltige Pseudokapsel vor den umgebenden Immunzellen geschützt ist (Stufe 3). Durch die zunehmende Zahl Immunzellen und eine Überreaktion des Immunsystems wird das umgebende, gesunde Gewebe zunehmend nekrotisch, die Abszesse rupturieren und, ausgehend von der Läsion, verbreiten sich die Bakterien weiter im Organismus. (CHENG et al., 2011; CHENG et al., 2009; CHENG et al., 2010; LOWY, 1998)

Neben der Ausbildung von Metastasen im ursprünglich befallenen Organ können so auch Endokarditis, Osteomyelitis oder septische Arthritis ausgelöst werden (MORRIS, RUSSELL, 2016).

### 3.2.2. Erfolgsstrategien

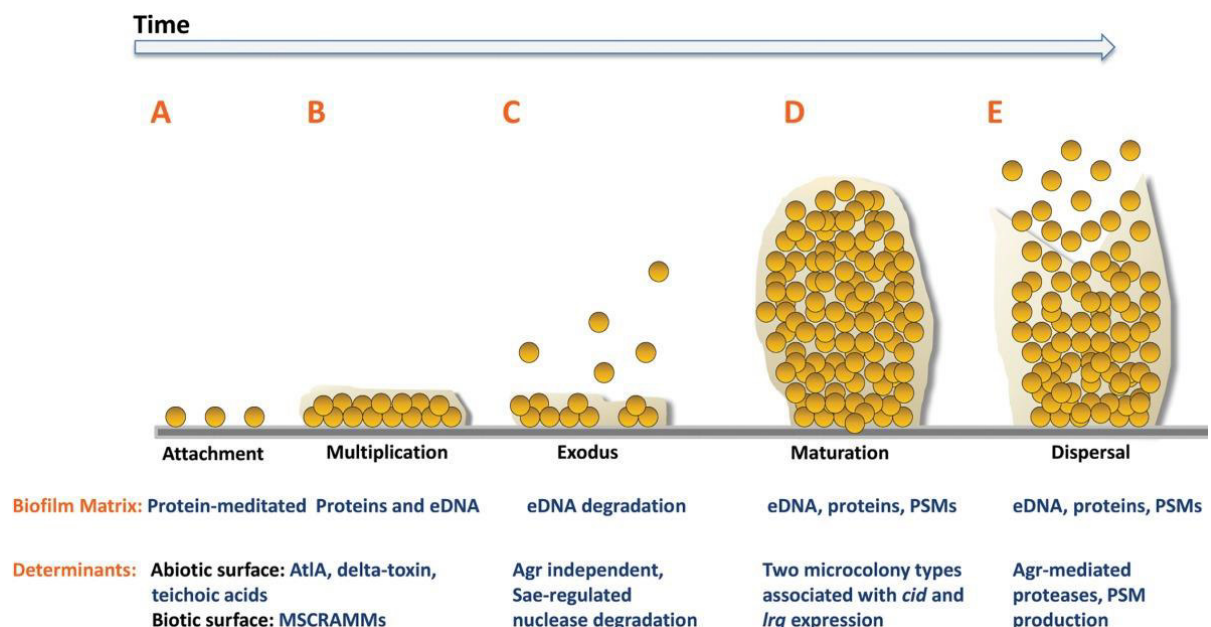
Das Bakterium *S. aureus* hat ein breites Repertoire an Strategien entwickelt, um seine Überlebenschancen außerhalb des Wirtes und im Wirt zu steigern. So ist das Bakterium dazu in der Lage, für mehrere Tage bis Wochen auf unbelebter Materie anzuheften und zu überleben (z.B. auf Türgriffen oder medizinischen Geräten) (KRAMER et al., 2006).

Auch im Wirt kann das Bakterium nach der Phagozytose durch Makrophagen bis zu vier Tage überleben. Zwar wird zu Beginn der Infektion ein Großteil der Bakterienpopulation durch die Wirts-Immunantwort beseitigt, doch ein Teil der Population kann ohne nennenswerten Viabilitätsverlust im Phagolysosom überleben, bevor die Bakterienzellen ins Zytoplasma entkommen und sich weiter vermehren (FOSTER, 2005; KUBICA et al., 2008). Zur Nährstoffgewinnung zerstört *S. aureus* anschließend während der stationären Wachstumsphase Wirtsgewebe mit Hilfe von Lipasen, Proteasen und Hyaluronidasen (GORDON, LOWY, 2008; TAM, TORRES, 2019).

Eine weitere Methode, das Überleben zu sichern, ist die Vielzahl an Virulenzfaktoren, die *S. aureus* exprimiert. Die zu den Virulenzfaktoren zählenden Adhäsionsfaktoren werden in kovalent in der Zellwand verankerte CWA (cell wall-anchored) Proteine wie beispielsweise die Clumpingfaktoren A und B oder das Protein Spa (Staphylococcal protein A) (BIEN et al., 2011) und sekretierte SERAMs (secretable expanded repertoire adhesive molecules) wie das extrazelluläre Adhärenzprotein Eap unterteilt (CHAVAKIS et al., 2005). Während des exponentiellen Wachstums werden vornehmlich Zellwand-gebundene Virulenzfaktoren exprimiert, sekretierte Virulenzfaktoren werden insbesondere in der stationären Wachstumsphase exprimiert (BRELLE et al., 2015). Neben den Adhäsionsfaktoren verfügt *S. aureus* zudem über eine Vielzahl Exoproteine wie beispielsweise Invasine (Kinasen, Proteasen, u. A.) und Toxine (Hämolyse, Exotoxine, u. A.), die einen Aufschluss des Wirtsgewebes zur Nährstofffreisetzung ermöglichen, aber auch immunmodulierende Faktoren wie das IgG-Bindeprotein oder Koagulase, die im Zusammenspiel mit immunmodulierenden Toxinen die Immunantwort des Wirtes umgehen können (ZECCONI, SCALI, 2013). Das Repertoire an exprimierten Virulenzfaktoren kann sich dabei zwischen verschiedenen Isolaten markant voneinander unterscheiden. Mit Hilfe seiner Virulenzfaktoren kann *S. aureus* die Immunantwort des Wirtes auf verschiedene Weisen umgehen, indem es nach Adhärenz an die Wirtszellen beispielsweise die Immunantwort manipuliert, Biofilme ausbildet oder interzelluläre Verknüpfungen und ganze Wirtszellen degradiert (FOSTER, 2005; FOSTER, HÖÖK, 1998; GRUMANN et al., 2014).

Einige Virulenzfaktoren ermöglichen es *S. aureus* zudem in Wirtszellen zu internalisieren. Vermittelt wird dieser Prozess durch Adhäsine (Fibronectin Bindeproteine FnBPA und B), Invasine (Lipasen und Proteasen) und immunmodulierende Faktoren (Koagulase). Durch die Ausbildung von Fibronectinbrücken vermitteln FnBPs die Adhäsion an Wirtszellen und stimulieren die Aktinpolymerisierung, die zu einem Umbau des Zytoskeletts der Wirtszelle führt (DZIEWANOWSKA et al., 2000; PIROTH et al., 2008; QUE et al., 2005). So wird das Bakterium in die Wirtszelle aufgenommen. In der Wirtszelle ist das Bakterium vor Antibiotikastress und der Immunantwort des Wirtes geschützt (CHIFIRIUC et al., 2008; LOWY, 1998).

Einen weiteren Mechanismus zur Vermeidung von Antibiotika- und Immunantwort-induziertem Stress stellt die Ausbildung von Biofilmen dar. Bis zu 80 % der Bakterieninfektionen im Menschen stehen in Zusammenhang mit Biofilm-bildenden Organismen wie *S. aureus* (RÖMLING, BALSALOBRE, 2012). Biofilme sind Zellgemeinschaften, die in eine exopolymere Matrix eingebettet sind und an belebter und unbelebter Oberfläche anheften können (PAHARIK, HORSWILL, 2016). Bei *S. aureus* setzt sich die Matrix aus extrazellulärer DNA (eDNA) lysierter Bakterienzellen (regulierte Autolyse), sowie PIA (polysaccharide intercellular adhesin) und/oder proteinösen Adhäsinen (Zellwand-gebunden oder sekretiert) zusammen (MACK et al., 1996; MONTANARO et al., 2011; MOORMEIER, BAYLES, 2017; SPEZIALE et al., 2014). Die Bildung von Biofilmen verläuft bei diesem Bakterium in einem fünfstufigen Prozess, der Abbildung 6 entnommen werden kann.



**Abbildung 6: Biofilmbildung von *S. aureus***

Nach Anheftung des Bakteriums an die Oberfläche (A) wird ein früher Biofilm ausgebildet und die extrazelluläre Matrix aufgebaut (B). Durch kontrollierte Zellfreisetzung (C) kommt es zu einer Reorganisation des frühen Biofilms. Diese unterstützt die Nährstoffversorgung der Zellen während der Hauptaufbauphase des Biofilms (D). Vermittelt durch das *agr*-Quorum Sensingssystem erfolgt die Freisetzung von Zellen aus dem Biofilm (E), um anderenorts neue Biofilme zu bilden.

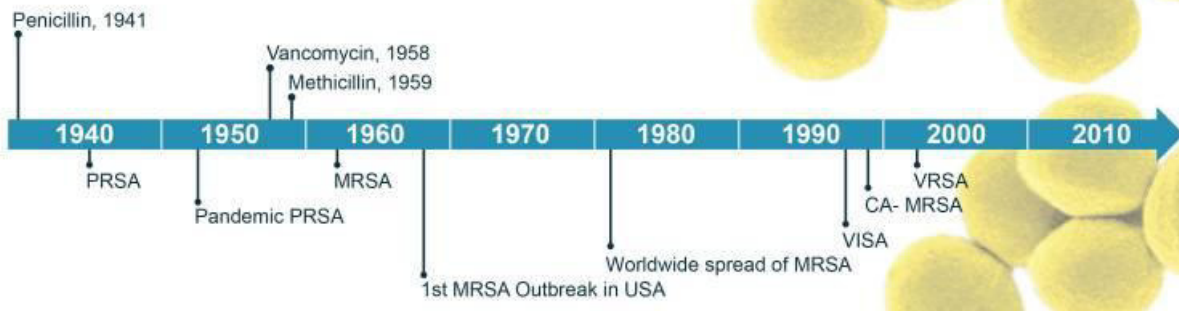
Quelle: MOORMEIER, BAYLES, 2017

Abhängig von der Beschaffenheit der Oberfläche vermitteln Zellwand-verankerte Proteine (biotische Oberflächen) oder elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen (abiotische Oberflächen) die Adhäsion des Bakteriums (Attachment, Stufe I). Nach erfolgreicher Adhäsion teilen sich die Zellen und die extrazelluläre Matrix wird aufgebaut, um die Zellen vor äußeren Einwirkungen zu schützen. Durch PIA, Adhesine und eDNA werden Zell-Zell Verbindungen stabilisiert (Multiplication, Stufe II). Während der Exodus-Phase (Stufe III) werden kontrolliert Zellen aus dem frühen Biofilm freigesetzt. Durch die Degradation der eDNA kommt es zu Rekonstruktion des Biofilms und der Ausbildung von Mikrokolonien. Diese Stufe ist unerlässlich für die nachfolgende Expansion des Biofilmes (Maturation, Stufe IV). Sie gewährleistet die Nährstoffversorgung und Schadstoffentsorgung auch in tieferen Biofilmschichten, sodass sich die Zellen ungestört teilen und der Biofilm weiter expandieren kann. Zudem fördert die Verschiedenheit der Mikrokolonien in Bezug auf Wachstum und Genexpression die Anpassung an verschiedenste Stressbedingungen. In der letzten Stufe (Dispersal, Stufe V) erfolgt schließlich die Freisetzung von Zellen aus dem Biofilm. Dieser Schritt wird vor allem durch das übergeordnete *agr*-Quorum Sensing Regulationssystem in *S. aureus* vermittelt. Die Regulation der Biofilmbildung selbst unterliegt einer Vielzahl verschiedenster Umweltbedingungen (z.B. Glukosegehalt, Temperatur und Osmolarität) und den Regulatorsystemen vermittelt durch die Gene *agrlsarA* sowie *sigB*. Das Zusammenwirken der verschiedenen Regulatorsysteme beeinflusst in PIA-abhängigen Biofilmen die Transkription des *icaADBC* Gencluster (codiert für PIA), sowie die Transkription von Oberflächenadhesinen wie Bap, SasG und den Fibronektin Bindeproteinen FnBPA und FnBPB, bedeutenden Bestandteil PIA-unabhängiger proteinöser Biofilme. (ARCHER et al., 2011; BOLES et al., 2010)

Auch die Freisetzung von extrazellulärer DNA (eDNA) wird durch die globalen Regulationssysteme gesteuert (MOORMEIER, BAYLES, 2017).

Eine weitere nicht zu vernachlässigende Erfolgsstrategie von *S. aureus* ist die effiziente Entwicklung und Akkumulation von Resistenzmechanismen. Abbildung 7 fasst die zeitliche Entwicklung der Resistenzentwicklung in *S. aureus* anschaulich zusammen.

## Staphylococcus aureus Drug Resistance and Epidemics



**Abbildung 7: Resistenzentwicklung von *S. aureus* (SA) und globale Ausbruchsgeschehen**

PRSA (Penicillin-resistente SA), MRSA (Methicillin-resistente SA), VISA (Vancomycin-intermediate SA), CA-MRSA (community acquired MRSA) und VRSA (Vancomycin-resistente SA) entwickelten sich stets wenige Jahre nach Einführung der entsprechenden neuen Antibiotika.

Quelle: MCGUINNESS et al., 2017

Bereits wenige Jahre nach der Einführung von Penicillin als Antibiotikum zur Behandlung von *S. aureus* Infektionen traten erste Fälle von Resistenzen (PRSA) auf, die in einer PRSA-Pandemie in den 1950er und 1960er Jahren gipfelte (PLOUGH, 1945). Der Resistenzmechanismus beruht hierbei auf dem Gen *blaZ*, welches für eine  $\beta$ -Laktamase codiert, die den  $\beta$ -Laktamring von Penicillin hydrolysiert und damit inaktiviert (OLSEN et al., 2006). Als Antwort auf diese Entwicklung wurde 1959 das Penicillinase-feste  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum Methicillin eingeführt. Doch nach nur zwei Jahren Einsatz wurden erste Methicillin-resistente *S. aureus*-Isolate (MRSA) nachgewiesen. Vermittelt wird die Methicillin-Resistenz in *S. aureus* durch ein mobiles genetisches Element (SCC*mec*), welches das Gen *mecA* bzw. *mecC* enthält. Beide Gene codieren für Proteine, die eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Methicillin und anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika aufweisen. Das durch *mecA/mecC* exprimierte Penicillin-Bindeprotein 2a (PBP2a) unterscheidet sich in seiner Konformation von herkömmlichen Penicillin-Bindeproteinen;  $\beta$ -Laktam-Antibiotika können nur in deutlich abgeschwächter Form an der active site des Proteins binden, sodass bei den im Patienten erreichbaren Wirkspiegeln immer noch eine ausreichende Peptidoglykan-Quervernetzung durch Transpeptidation möglich ist. (KIM et al., 2014) Mittels horizontalem Gentransfer und Aufnahme in das Chromosom wird dieses mobile genetische Element weiter verbreitet (HAVAIEI et al., 2015; XIA et al., 2013). Aufgrund der besorgniserregenden Zunahme der MRSA-Fälle in den 1980er und 1990er Jahren wurde vermehrt das Reserveantibiotikum Vancomycin eingesetzt. Doch auch gegen das Glykopeptid-Antibiotikum entwickelte *S. aureus* nach kurzer Zeit Resistenzmechanismen. So wird die Resistenz (MIC  $\geq$  16  $\mu$ g/ml) in diesem Fall durch das VanR-VanS-Zweikomponentensystem (Teil des *vanA* Operons) vermittelt, welches durch Konjugation des Plasmides pAM830 aus Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) auch in *S. aureus* vorhanden ist (HONG et al., 2008; MCGUINNESS et al., 2017).

Der membranassoziierte Vancomycin-Sensor *vanS* reguliert die Phosphorylierung von *vanR*, dem transkriptionellen Aktivator des *vanA* Operons. In Anwesenheit von Vancomycin wird über das Zweikomponentensystem die Transkription von *vanH*, *vanA* und *vanX* stimuliert, die eine Konformationsänderung des Bindemotivs für Vancomycin verursachen und so die Resistenz vermitteln (DEZFULIAN et al., 2012; MANDAL et al., 2015). Im Gegensatz dazu weisen Vancomycinempfindliche Isolate ( $MIC \leq 2 \mu\text{g/ml}$  für den Hauptteil der Zellen und  $MIC \geq 4 \mu\text{g/ml}$  für eine kleine Subpopulation) das Zweikomponentensystem nicht auf. In ihnen wird die intermediäre Resistenz beispielsweise durch eine Verdickung der Zellwand, Änderungen in den Wachstumscharakteristika, verminderte Quervernetzung von Peptidoglykan und enzymatische Veränderungen der Zellwandwiederverwertung hervorgerufen. Ursächlich für diese Veränderungen ist eine Reihe von Punktmutationen in verschiedensten Genen, die sich in den entsprechenden Isolaten akkumulieren können (MCGUINNESS et al., 2017).

### **3.2.3. Etablierte Behandlungsschemata**

Für die effiziente Behandlung von *S. aureus* Infektionen ist eine Resistenztestung heutzutage unerlässlich, um den nicht-indizierten Einsatz von Reserveantibiotika und die Entwicklung weiterer Resistenzen bestmöglich zu reduzieren. Die Sensibilitätstestung erfolgt nach streng standardisierten Verfahren (SOPs) mittels Platten-Diffusionstest nach EUCAST, die zu Rate gezogenen Vergleichswerte für potenzielle Therapie(miss)erfolge stammen aus vergangenen Behandlungen.

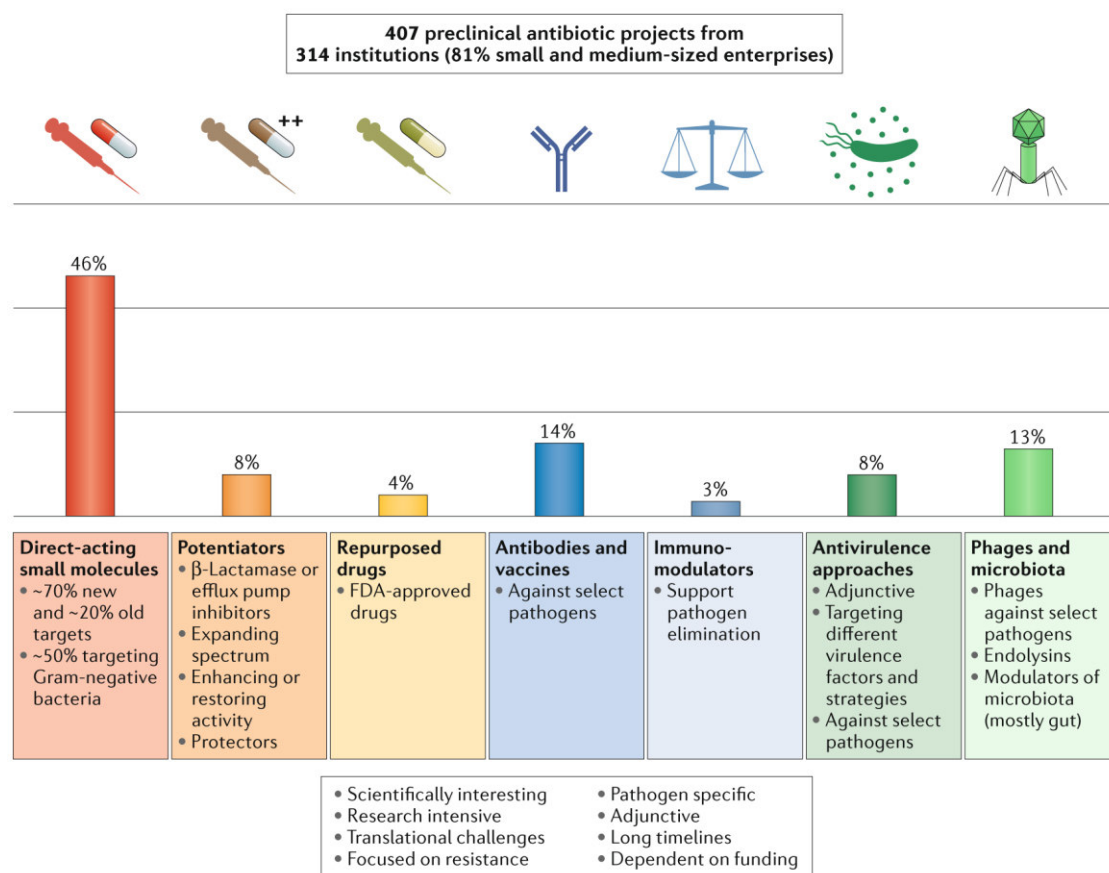
Die Behandlung Penicillinase-positiver Isolate erfolgt mit dem „Staphylokokken-Penicillin“ Flucloxacillin. Isolate, die gegen Methicillin (und damit gegen alle  $\beta$ -Laktamantibiotika) resistent sind, erfordern eine besondere Behandlung. So hat sich zur Behandlung von MRSA Infektionen das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin als äußerst effektiv erwiesen (SORRELL et al., 1982). Die Behandlung verursacht jedoch, abhängig von Dosierung, Behandlungsdauer und Begleiterkrankungen, in 5 – 35 % der Behandlungen schwere Nierenschädigungen (ELYASI et al., 2012) und auch gegen Vancomycin haben sich seit Beginn des vermehrten Einsatzes in Krankenhäusern verschiedene Resistenzmechanismen entwickelt (HIDAYAT et al., 2006; LIU et al., 2011). Als Alternativen in der MRSA-Behandlung kommen Oxazolidinone wie Linezolid oder Lipopeptide wie Daptomycin zum Einsatz, doch auch hier können schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten. Zudem existieren auch hier bereits erste Linezolid- oder Daptomycin-unempfindliche *S. aureus* Isolate im Krankenhausumfeld (AZHAR et al., 2017; SHARIATI et al., 2020). In Anbetracht der zunehmend schneller werdenden Resistenzentwicklung ist die Entwicklung neuer Therapieoptionen daher unerlässlich.

### **3.3. Neue Therapieansätze für *S. aureus*-induzierte Infektionen**

Finanzielle Anreize durch Förderprogramme und ein leichtfertiger Umgang mit Antibiotika führten zu Beginn der Antibiotikaforschung zu einem unbedachten und verschwenderischen Einsatz von Antibiotika, ohne die Sinnhaftigkeit des Einsatzes zu hinterfragen.



Dieses Verhalten zog eine rasante Entwicklung von Resistenzen gegen erst wenige Jahre zuvor entwickelte Substanzen nach sich (PODOLSKY, 2015). Da sich die Antibiotikaforschung auf Grund der schnellen Entwicklung von Resistenzmechanismen als sehr schwierig und wenig rentabel erwies, stellten große Pharmakonzerne die Forschung an neuen Wirkstoffen in den 1980er Jahren weitestgehend ein. Erschwerend hinzu kommen die langen Entwicklungs- und Forschungszeiträume im prä-klinischen Abschnitt und der geringe Austausch von Wissen (insbesondere von „negativen“ Ergebnissen) auf globaler Ebene. Dies verlangsamt die internationale Bekämpfung von resistenten Isolaten und die Entwicklung neuer Wirkstoffe enorm. Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken, veröffentlichte die WHO 2020 einen globalen Bericht zur derzeitigen prä-klinischen Antibiotikaforschung (Vergleich Abbildung 8).



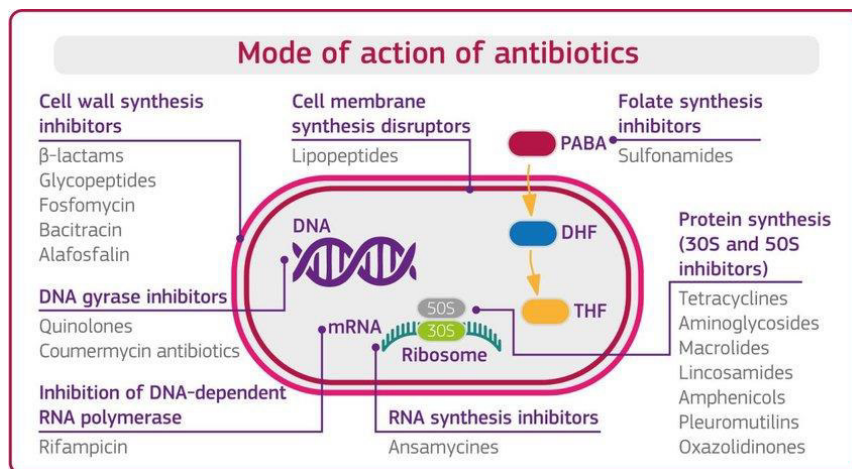
**Abbildung 8: Substanzklassen und Targets in der derzeitigen globalen Antibiotikaforschung**

Die prä-klinische Antibiotikaforschung fokussiert sich insbesondere auf kleine Moleküle, die direkt mit der bakteriellen Zielstruktur (Target) interagieren. Bei dem Großteil der Targets handelt es sich um neue Angriffspunkte.

Quelle: THEURETZBACHER et al., 2020

Derzeitige Antibiotikaklassen zielen vor allem auf Zellwand/-membran, DNA/RNA und die Proteinbiosynthese des Bakteriums ab (CARDOSO et al., 2021). Diese Zielstrukturen (Targets) stehen am Ende der metabolischen Abläufe (Anabolismus) von *S. aureus* oder greifen direkt komplexe proteinöse Strukturen wie Virulenzfaktoren oder Zellwandbestandteile an. Mögliche Targets aus dem Bereich des Katabolismus finden hingegen bislang nur wenig Beachtung, obwohl sie in einer viel früheren Stufe des Metabolismus Angriffspunkte darstellen und somit einen direkten Eingriff in die Lebensweise des Bakteriums erlauben würden (Vergleich Abbildung 9). Kompensationsreaktionen des Bakteriums beim Ausfall nur eines Virulenzfaktors könnten so vermieden werden. Bisher finden Abläufe des bakteriellen Zentralmetabolismus (Glykolyse/Glukoneogenese, Citratzyklus und Pentose-Phosphat-Weg) kaum Beachtung in der Entwicklung neuer Wirkstoffe. Ein Grund hierfür ist die möglicherweise fehlende Selektivität entsprechender neuer Substanzen, da metabolische Enzyme hoch konserviert im Menschen und Bakterium zu finden sind (MURIMA et al., 2014).

Etablierte antimikrobielle Substanzen wie Trimethoprim (hemmt die bakterielle Dihydrofolat-Reduktase, die an der Herstellung von Thymidin und Purinen beteiligt ist), Prontosil (hemmt die Biosynthese von Folsäure) und Bedaquilin (hemmt in Mykobakterien die ATP-Synthase) beweisen jedoch, dass auch im bakteriellen Metabolismus vielversprechende Targets verfügbar sind (MURIMA et al., 2014).



**Abbildung 9: Angriffspunkte handelsüblicher Antibiotika**

Antibiotika (grau) wirken vornehmlich auf Zellwand/-membran, RNA/DNA und Proteinsynthese.  
Quelle: SANSEVERINO et al., 2018

### 3.3.1. Das Pathogen – neue Angriffspunkte für Wirkstoffe

#### 3.3.1.1. Metabolismus

Während des exponentiellen Wachstums synthetisiert *S. aureus* vornehmlich Adhäsine und zellwandgebundene Virulenzfaktoren, die ein Anhaften an den Wirt ermöglichen. In der stationären Wachstumsphase werden hingegen bevorzugt Toxine, Lipasen, Proteasen und Invasine synthetisiert, um Wirtszellen aufzuschließen und somit neue Nahrungsquellen zu erschließen (FOSTER et al., 1990). Dem Bakterium *S. aureus* dienen in erster Linie Kohlenstoffe als Hauptnahrungsquelle. Diese können co-metabolisiert werden (parallele Verstoffwechslung eines Wachstumssubstrates und von Substraten, die keinen Energiegewinn oder verwertbare Stoffwechselprodukte liefern; meist durch unspezifische Enzyme verursacht (DALTON et al., 1982)), doch meist nutzt das Bakterium seine bevorzugten Kohlenstoffquellen (insbesondere Glukose, aber auch Fruktose, Saccharose, Maltose und Manitol), die leicht verwertbar sind und ein schnelles Wachstum erlauben. Abhängig von Stressbedingungen, Nährstoffsituation und Bakteriendichte können insbesondere im „Habitat Mensch“ auch Aminosäuren oder Fettsäuren verstoffwechselt werden. Abbildung 10 gibt einen Überblick über den Glukose-Metabolismus in Mikroorganismen wie *S. aureus*.

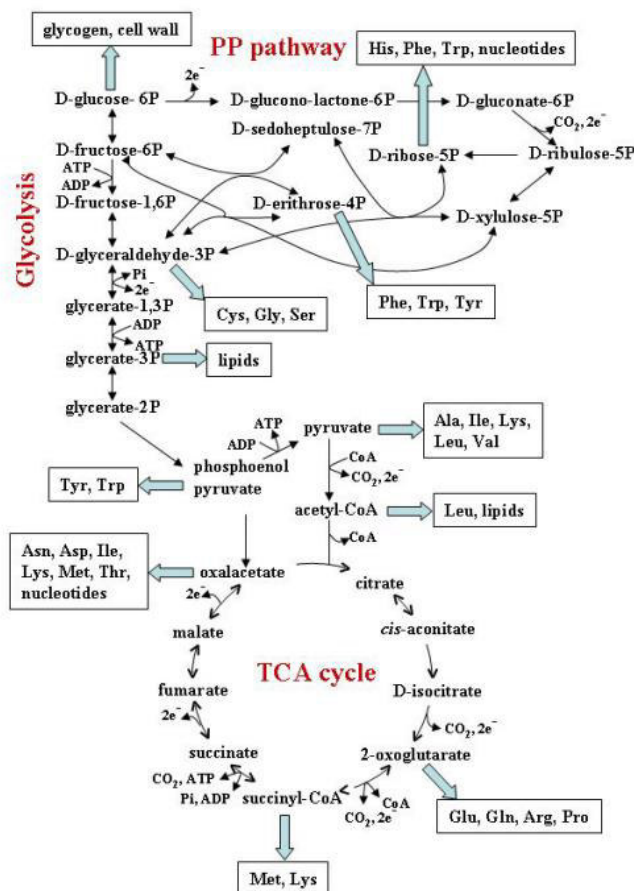
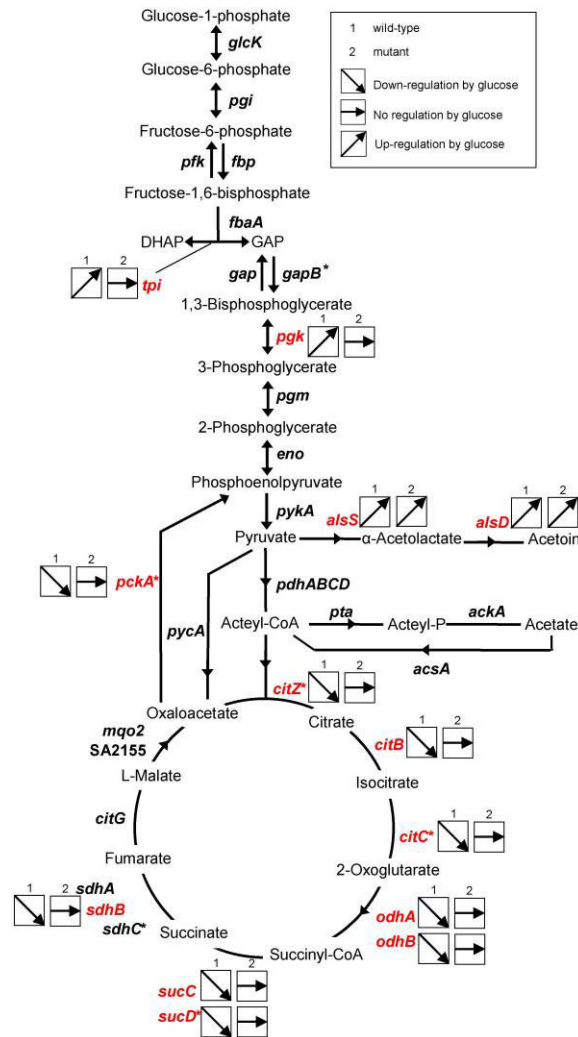


Abbildung 10: Vereinfachter Zentralstoffwechsel in Mikroorganismen

Quelle: MINIC, 2015

Beim Vorhandensein mehrerer Nährstoffquellen wird durch die Kohlenstoff-Katabolitenrepression (CCR - Carbon catabolite repression) die Verstoffwechslung der bevorzugten Kohlenstoffquelle in *S. aureus* gefördert, während andere Stoffwechselwege unterdrückt werden (DEUTSCHER, 2008). Auf diese Weise wird unter möglichst geringem Energieaufwand die bestmögliche Kohlenstoffquelle über einen aktiven Weg verstoffwechselt (GÖRKE, STÜLKE, 2008). Erreicht wird dies durch die Repression von Genen und Operons, deren Produkte in den Metabolismus alternativer Nährstoffquellen involviert sind.

Das Kataboliten-Kontrollprotein A (CcpA - Catabolite control protein A) reguliert in *S. aureus* eine Vielzahl von Genen, indem es an *cre*-Sequenzen (catabolite-responsive elements) bindet und die Transkription inhibiert oder induziert. Eines der regulierten Gene/Transkripte ist *RNAIII*, eine regulatorische RNA, welche das Effektormolekül des *agr* Locus darstellt (SEIDL et al., 2009). Zudem vermittelt CcpA die CCR in Gram-positiven Bakterien wie *S. aureus* (SOMERVILLE, PROCTOR, 2009). Bei Vorhandensein von Glukose werden einzelne Gene der Glykolyse stark hochreguliert, während Gene des Citratzyklus, die an der Metabolisierung sekundärer Nährstoffe wie Acetat beteiligt sind, reprimiert werden (LORCA et al., 2005). Seidl und Kollegen identifizierten die Gene *tpi* (codiert für die Triosephosphatisomerase, die an der Umwandlung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) beteiligt ist), *pgk* (codiert die Phosphoglyceratkinase) und *alsS/alsD* (codieren die Acetolacetat-Synthase und -Decarboxylase, die an der Acetoin-Bildung beteiligt sind) in *S. aureus* als Zielgene für eine positive Regulation durch CcpA in Anwesenheit von Glukose (SEIDL et al., 2009) (Vergleich **Abbildung 11**).



**Abbildung 11: Einfluss von CcpA und Glukose auf die Regulierung von Genen der Glykolyse, der Glukoneogenese und des Citratzyklus in *S. aureus***

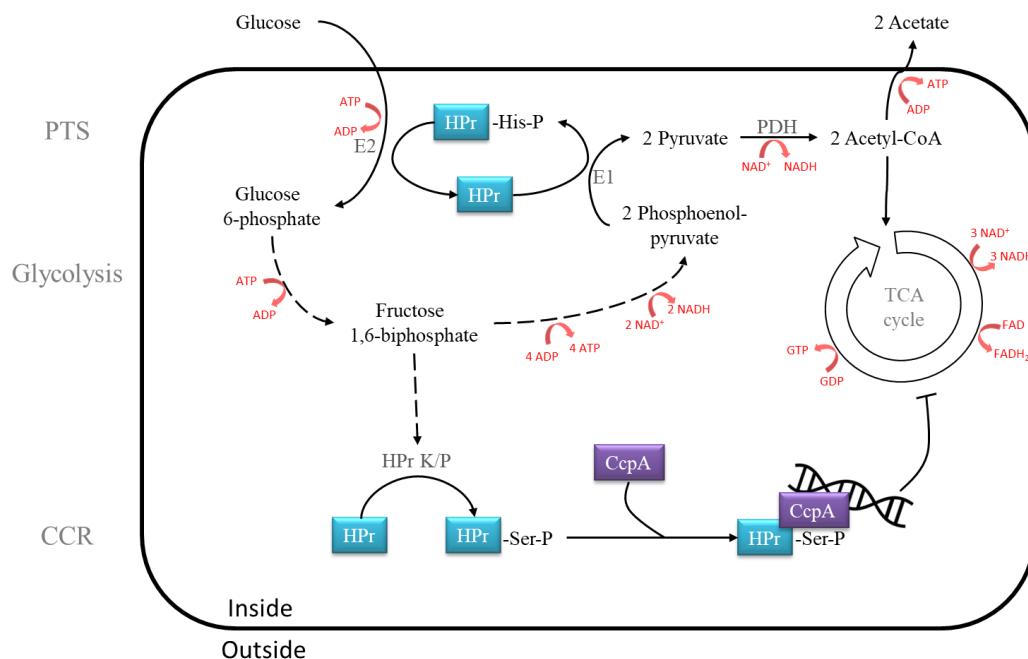
Rot markierte Gene werden Glukose-abhängig durch CcpA reguliert. Eine positive Regulation erfolgt insbesondere bei Genen, die an der Glykolyse beteiligt sind, während Gene des Citratzyklus reprimiert werden.

Quelle: SEIDL, 2009

Erst nach Verbrauch der bevorzugten Kohlenstoffquelle wird die Repression des Citratzyklus und die Verstoffwechslung anderer Nährstoffquellen aufgehoben. Da CcpA auch die Transkription des *ica*-Operons positiv reguliert (PIA-Synthese), hat es zudem Einfluss auf die Biofilmbildung von *S. aureus*. So konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass eine Deletion von *ccpA* zu einer reduzierten Biofilmlast in diabetischen Mäusen und zu einer verringerten Infektiosität in einem murinen Abszessmodell führt (BISCHOFF et al., 2017).

In den Bakterien *Streptococcus pyogenes* und *Bacillus megaterium* konnte gezeigt werden, dass die dafür nötige Bindung von CcpA an die *cre*-Sequenzen der entsprechenden Gene durch die Komplexbildung mit dem Histidine-containing Protein (HPr; codiert von *ptsH*) enorm gesteigert wird (DEUTSCHER, SAIER, 1983; SCHUMACHER et al., 2004). Die Bindungsaffinität von CcpA allein ist in *S. aureus* schwach (LEIBA et al., 2012), Untersuchungen durch Li und Kollegen aus dem Jahr 2010 lassen jedoch auch in *S. aureus* eine Steigerung der Bindungsaffinität von CcpA durch Komplexbildung mit HPr vermuten (LI et al., 2010).

Neben der Steigerung der Bindungsaffinität von CcpA an *cre*-Sequenzen ist HPr als Phosphatträger-Protein eines der Schlüsselemente des Phosphotransferase Systems (PTS). Das PTS dient der Aufnahme von Zuckeralkoholen wie Mannitol und Glucitol sowie der Aufnahme von Hexosen (z.B. Fruktose, Glukose und Mannose) in die Zelle indem es diese phosphoryliert (DEUTSCHER et al., 1995). Die importierte Menge Glukose bestimmt dabei die intrazelluläre Menge Fruktose-1,6-biphosphat. Dieses wiederum vermittelt die Phosphorylierung von HPr an Ser-46 und damit die Komplexbildung mit CcpA und die CCR (DEUTSCHER, SAIER, 1983). Auf diese Weise ist HPr vermutlich auch an der Bildung PIA-abhängiger Biofilme beteiligt, da diese nur bei Vorhandensein von Glukose und der Aktivierung des *ica*-Operons gebildet werden können (SEIDL et al., 2008b). Abbildung 12 fasst die Rolle von HPr in PTS und CCR zusammen.



**Abbildung 12: Zusammenspiel von Phosphotransferase-System (PTS), Glykolyse und Kohlenstoff-Katabolitenrepression (CCR) in *S. aureus*, vermittelt durch HPr**

Erstellt nach (DEUTSCHER et al., 2014; DEUTSCHER et al., 2006; FLEMING et al., 2015)

Obwohl HPr in zwei essenzielle Metabolismusfunktionen involviert ist, wurde in bisherigen Untersuchungen stets nur CcpA berücksichtigt (BISCHOFF et al., 2017; SEIDL et al., 2008a; SEIDL et al., 2008b). Publikation A (Anhang, (PÄTZOLD et al., 2021a)) befasst sich daher mit der Untersuchung der Rolle von HPr des Organismus *S. aureus* in Hinblick auf Metabolismus, Wachstum, Biofilmbildung und Infektiosität. Eine Verminderung der Biofilmbildung und der Infektiosität von Deletionsmutanten *in vivo* würden HPr als potenzielles Antibiotika-Zielmolekül für weiterführende Untersuchungen attraktiv machen.

### 3.3.1.2. Proteinphosphorylierung

Die (De-)Phosphorylierung von Proteinen ist ein reversibler Prozess, der von zwei entgegenwirkenden Enzymen (Kinase und Phosphatase) vermittelt wird. Sie stellt einen essenziellen Mechanismus in der Regulation molekularer Prozesse als Antwort auf intra- und extrazelluläre Reize dar (FISCHER, KREBS, 1989; SOULAT et al., 2002), wobei insbesondere Adenosintriphosphat (ATP) als Phosphatdonor fungiert (GRANGEASSE et al., 2007).

In Eukaryoten findet die Phosphorylierung vornehmlich an Tyrosin-, aber auch an Serin-, Threonin- und Argininresten statt (FUHRMANN et al., 2013; HUNTER, 1995; PEREIRA et al., 2011). In einer Vielzahl von Bakterien (Gram-positiv und -negativ) konnte ebenfalls die Proteinphosphorylierung (vor allem an Tyrosin) nachgewiesen werden (COZZONE, 1993). Insbesondere in der Kompensation von Stressbedingungen, verursacht z. B. durch oxidativen Stress oder die Wirtsimmunantwort, sowie der Vermittlung von Virulenz und Zellwandproduktion, spielt die Protein-(de-)phosphorylierung eine entscheidende Rolle (BRELLE et al., 2015; MUKHERJEE et al., 2009). So konnten Tyrosinphosphatasen in den Gram-positiven Humanpathogenen *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria* spp. und *Streptococcus pneumoniae*, aber auch in nicht-pathogenen Bakterien der Lebensmittelproduktion (*Lactococcus lactis*) identifiziert werden (BECHET et al., 2009; GRANGEASSE et al., 2007). In den Gram-positiven Humanpathogenen ist die Tyrosinphosphorylierung vor allem an der Vermittlung der Pathogenität involviert (Exopolysaccharid-Transport und Vermittlung von Adhärenz und Resistenz, Zellwandzusammensetzung, Manipulation der Wirtsimmunantwort) (BENDER, YOTHER, 2001; MORONA et al., 2000; NIR-PAZ et al., 2012). Für Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* und *Yersinia* spp. konnte ebenfalls ein Zusammenhang von Tyrosinphosphatasen und Pathogenität (Manipulation der Wirtsimmunantwort, Zellwandmodifikationen u. A.) festgestellt werden (GUAN, DIXON, 1990; PELEG et al., 2005; SELBACH et al., 2003; YUAN et al., 2005).

Im Bakterium *S. aureus* wurden neben den nur in Gram-positiven Bakterien zu findenden CapC-Phosphatasen aus der Familie der Polymerase- und Histidinolphosphatasen auf Grundlage vergleichender Aminosäuresequenz-Analysen zwei weitere Phosphatasen identifiziert. Wegen ihres geringen Molekulargewichtes wurden sie den Low Molecular Weight (LMW-) Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) zugeordnet und PtpA und PtpB benannt (SOULAT et al., 2002; VEGA et al., 2011).

Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei PtpB nicht um eine Tyrosin- sondern um eine Arginin-Phosphatase handelt (JUNKER et al., 2018). Die Protein-Phosphatasen (PP) PtpA und PtpB in *S. aureus* gehören nicht zum gleichen Operon (MUKHERJEE et al., 2009; SOULAT et al., 2002), weisen aber einen ähnlichen strukturellen Aufbau und Sequenz-Motive auf (DAVIS et al., 1994; SOULAT et al., 2002; SU et al., 1994). Die Phosphatbindestellen von PtpA und PtpB unterscheiden sich hingegen deutlich. Ausschlaggebend für die Bindung eines Substrates (bzw. dessen Phosphatgruppe) ist die P-Schleife des katalytischen Zentrums mit dem Bindemotiv CXXXX5XR. Während PtpA an Position 5 (PX5) dieses Motives ein Isoleucin (Ile) aufweist, liegt bei PtpB ein Threonin (Thr) vor (ELHAWY et al., 2021a). Dass diese unterschiedlichen Aminosäuren maßgeblich die Substratselektivität des Enzyms beeinflussen, ist bereits für die LMW-Phosphatase YwIE in *Bacillus subtilis* bekannt (FUHRMANN et al., 2013).

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der PPs in Vollmedium keinen Einfluss auf das Wachstum, den Zellwandmetabolismus oder die Permeabilität von *S. aureus* aufweisen (VEGA et al., 2011). Im Gegensatz dazu hat eine Deletion der Arginin-Phosphatase PtpB jedoch einen signifikanten Einfluss auf die Adaptation von *S. aureus* an eine Nährstofflimitation. PtpB-Deletionsmutanten zeigten im Zellkultur-Medium RPMI-1640 (enthält keine Proteine, Lipide oder Wachstumsfaktoren und verursacht dadurch eine Nährstofflimitierung) ein deutlich verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu Wildtyp Bakterien (JUNKER et al., 2019). Für PtpA konnte zudem nachgewiesen werden, dass es trotz fehlender N-terminaler Export-Signalsequenz in relevantem Maße in das Medium sekretiert wird (BRELLE et al., 2015), für PtpB konnte ein solcher Nachweis bisher nicht erbracht werden. Die genaue Funktion der beiden LMW-PPs von *S. aureus* war ungeklärt, auf Grund der Befunde aus anderen pathogenen Bakterien lag jedoch die Vermutung nahe, dass beide Phosphatasen ebenfalls für die Infektiosität von *S. aureus* von Bedeutung sein könnten. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von PtpA (Publikation B, Anhang, (GANNOUN-ZAKI et al., 2018)) und PtpB (Publikation C, Anhang, (ELHAWY et al., 2021a)) in Bezug auf Virulenz und Stressadaptation untersucht, um zu evaluieren, ob die LMW-PTP Inhibitoren, die zur Behandlung von Krankheiten wie Krebs, Diabetes und bakteriellen Infektionen bereits in der Entwicklung sind, sich ebenfalls dazu eignen könnten, als Therapeutikum gegen *S. aureus* Infektionen eingesetzt zu werden.

### **3.3.2. Neue Wirkstoffe und Wirkstoffoptimierung**

Der unüberlegte und oft unbegründete Einsatz von Antibiotika verursachte in den letzten Jahrzehnten eine rasante Zunahme von Multiresistenzen in Pathogenen wie *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter*-Spezies, die als ESKAPE Organismen zusammengefasst wurden und eine besondere Herausforderung für das Gesundheitswesen darstellen (RICE, 2008; ZHEN et al., 2019), da diese Organismen (wenn überhaupt) nur noch mit Reserveantibiotika erfolgreich therapiert werden können.



Bei multiresistenten Varianten der Spezies *S. aureus* erschweren zudem Vermeidungsmechanismen wie Biofilmbildung oder Internalisierung in Wirtszellen, starke Nebenwirkungen oder Zeit- und Personal-intensive Behandlungsschemata die Therapie von *S. aureus*-Infektionen. Hinzu kommen häufig ungünstige physiologische Eigenschaften vorhandener Wirkstoffe wie beispielsweise eine verminderte Wasserlöslichkeit, schlechte Gewebegängigkeit oder geringe metabolische Stabilität, die die Effektivität der Wirkstoffe mindern und den Grad möglicher Nebenwirkungen erhöhen.

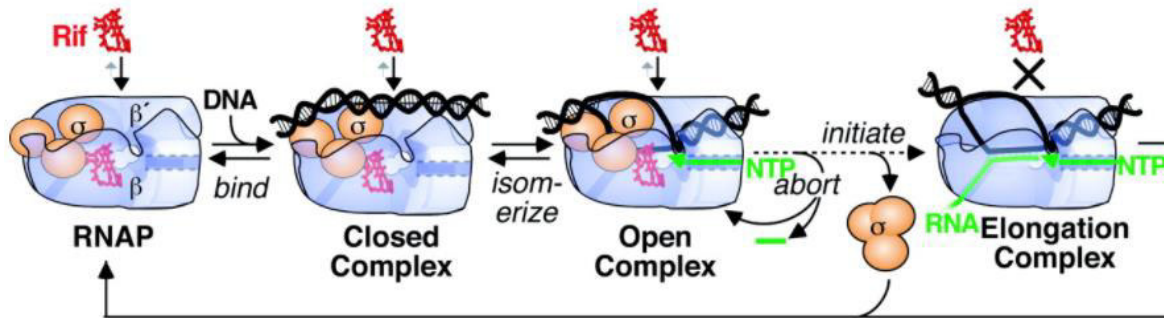
Aus diesen Gründen ist es unerlässlich, auf der einen Seite neue Angriffspunkte auf Seiten des Bakteriums aufzudecken und entsprechend neuartige Antibiotika zu entwickeln und auf der anderen Seite vorhandene Therapeutika durch Optimierung der Transportsysteme und physiologischen Eigenschaften zu verbessern. Nachfolgend sollen zwei dieser Optimierungsansätze anhand ausgewählter Substanzen vorgestellt werden.

### **3.3.2.1. RNA Polymerase-Inhibitoren als Breitbandantibiotika**

Die RNA-Polymerase (RNAP) ist ein bedeutendes Enzym in einer Vielzahl von Organismen und stellt ein vielversprechendes Target für Breitbandantibiotika dar. Zur Zeit werden jedoch lediglich Rifampicin und Fidaxomicin als RNAP Inhibitoren eingesetzt (WEHRLI, 1983).

Die prokaryotische RNAP ist ein DNA-abhängiges Enzym, das transkriptionelle Vorgänge in Bakterienzellen vermittelt indem es genomische DNA in RNA Moleküle transkribiert, die dann als Matrize für die Proteinbiosynthese durch Ribosomen dienen, aber auch regulatorisch oder katalytisch wirken können (BELOGUROV, ARTSIMOVITCH, 2019). Der Kernkomplex des Moleküls besteht in Prokaryoten aus fünf Untereinheiten, zwei kleinen  $\alpha$ -Untereinheiten, die wichtig für den generellen Aufbau des Enzyms sind, 2 großen  $\beta$  bzw.  $\beta'$ -Untereinheiten, die die Ketteninitiierung und –verlängerung bzw. die DNA-Bindung vermitteln und einer  $\omega$ -Untereinheit, die unter Anderem die  $\beta'$ -Untereinheit stabilisiert (MARIANI, MAFFIOLI, 2009; MATHEW, CHATTERJI, 2006; PARKER, 2001).

Rifampicin interagiert im Gegensatz zu anderen RNAP-Inhibitoren (z.B. Actinomycin) direkt mit der RNAP und nicht mit dem DNA Template (verursacht schwerwiegende Nebenwirkungen im Patienten) (WEHRLI, 1983). Das Inhibitormolekül bindet an die  $\beta$ -Untereinheit des RNAP Kernkomplexes im Inneren des DNA/RNA Kanals. Auf diese Weise wird die Synthese der RNA verhindert (CAMPBELL et al., 2001). Die Inhibierung der RNAP mit Rifampicin ist jedoch mit zwei schwerwiegenden Mängeln behaftet. Zum einen haben sich im Laufe der Zeit Resistenzen gegen das Antibiotikum entwickelt, zum anderen bindet es zwar mit hoher Affinität an die RNAP und inhibiert so die RNA Synthese in der initialen Phase, auf RNA-DNA Komplexe in der Elongationsphase hat der Inhibitor jedoch keinerlei Einfluss (MCCLURE, CECH, 1978). Abbildung 13 fasst diese Unzulänglichkeit anschaulich zusammen.



**Abbildung 13: Wirkmechanismus von Rifampicin auf die bakterielle RNA Polymerase**

Rifampicin (rot) kann an verschiedene Konformationen der RNA Polymerase (RNAP, blau) binden und die DNA-Transkription in der initialen Phase verhindern. Auf Elongationskomplexe hat Rifampicin jedoch keine Wirkung.

Quelle: HERRING et al., 2005

Mittels (semi-) synthetisch produzierter Rifampicin-Derivate sollten diese Unzulänglichkeiten beseitigt werden, doch stellte sich dieses Ziel als nahezu unerreichbar heraus. So konnte durch eine Modifikation der „tail“ Struktur des Inhibitors zwar die antibakterielle Wirkung stark gesteigert werden, die bakteriellen Resistenzmechanismen konnten so jedoch nicht umgangen werden (RABUSSAY, ZILLIG, 1969; RIVA, SILVESTRI, 1972). Andere Derivate mussten wiederum auf Grund schwerwiegender Nebenwirkungen in der klinischen Testung verworfen werden (HUDSON et al., 2003).

Durch die Aufklärung der 3D Struktur der Kernregion bakterieller RNAPs und den RNAP-Rifampicin Komplexen mittels Proteinkristallographie erhofft man sich nun neue Erkenntnisse, um so auf Basis der Strukturdaten neue Rifampicin-Derivate zu designen. Diese sollen neben einer gesteigerten klinischen Wirksamkeit auch den Resistenzmechanismus, verursacht durch eine Punktmutation im Gen *rpoB* (codiert für die  $\beta$ -Untereinheit (RABUSSAY, ZILLIG, 1969)), des Bakteriums umgehen können.

Eines dieser designten und *in vitro* sehr vielversprechenden Derivate wurde im Rahmen dieser Arbeit auf seine Wirksamkeit in einem murinen Wundinfektionsmodell getestet (Publikation D, Anhang, (HAUPENTHAL et al., 2020)). Gleichzeitig wurde das Wundmodell erstmals in haarlosen Crl:SKH1-Hrhr Mäusen beschrieben und etabliert.

### 3.3.2.2. PLGA-Nanokapseln als Wirkstoffapplikationssysteme

Ein großes Problem der Antibiotikatherapie ist neben der Resistenzentwicklung auf Seiten der Bakterien vielfach die Schwierigkeit, den Wirkstoff zum Ort der Infektion zu transportieren (falls keine topische Applikation möglich ist) und ihn dort in ausreichender Konzentration und über einen ausreichenden Zeitraum mit einem bestimmten Wirkspiegel wirken zu lassen. Hierbei spielt nicht nur die Applikationsroute eine wichtige Rolle, auch das Wirkstoffdesign (z. B. Zellgängigkeit) und die Bindungsaffinität an Plasmaproteinen (reduziert die Wirkungseffizienz) sind ausschlaggebend für eine erfolgreiche Therapie.

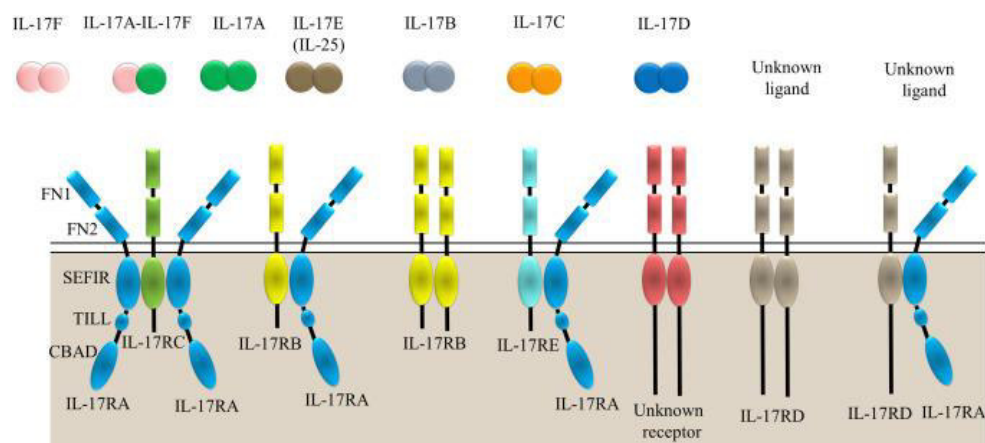
In den letzten Jahren hat sich Poly(DL-milchsäure-co-glycolsäure) (PLGA) als biologisch abbaubares, synthetisch hergestelltes Polymer verstärkt als potentiell Wirkstoffapplikationssystem etabliert (KAPOOR et al., 2015; MIR et al., 2017). Die Anforderungen an ein solches System sind dabei sehr hoch: es darf weder zytotoxische, mutagene, immunologische noch systemische Reaktionen im Patienten hervorrufen, um einen sicheren Einsatz zu gewährleisten (RATNER et al., 1975). Eine Verbindung aus PLA (Poly-(Lactic Acid)) und PGA (Poly-(Glycolic Acid)) hat sich hierbei als vielversprechend herausgestellt. Das Co-Polymer ist nicht toxisch, dafür aber biokompatibel und konnte bereits in diversen chirurgischen Verfahren, im Gewebeengineering und als Transport- und Abgabesystem erfolgreich eingesetzt werden (ASTETE, SABLIOV, 2006; CHAUBAL, 2002; CHENG et al., 2007; MIR et al., 2017).

Eine weitere mögliche Anwendung von PLGA stellt die Einkapselung schwer wasserlöslicher oder nicht in die Wirtszelle penetrierender Medikamente dar. Auf diese Weise wird die intrazelluläre Bioverfügbarkeit der Substanz deutlich gesteigert (LANGER, PEPPAS, 1981). Diese Anwendungsart wurde im Rahmen dieser Arbeit als mögliche Behandlungsoptimierung von Patienten mit zystischer Fibrose (CF) beziehungsweise chronischen Wunden untersucht (Publikation E, Anhang, (ANVERSA DIMER et al., 2020)). Patienten mit zystischer Fibrose zeigen neben einer schweren chronischen Inflammation der Lunge häufig eine Kolonisierung der Lunge mit Bakterien wie *P. aeruginosa*, *S. aureus* oder *Mycobacterium abscessus* (FILKINS, O'TOOLE, 2016; ULRICH et al., 1998). Ebenso gilt *S. aureus* als ein Verursacher chronischer, nicht heilender Wunden (SERRA et al., 2015). Die Therapie der *S. aureus*-besiedelten CF-Lunge umfasst eine Langzeitbehandlung mit dem Makrolid-Antibiotikum Clarithromycin (ZUCKERMAN et al., 2011), ungeachtet der Tatsache, dass dieses Antibiotikum schlecht wasserlöslich ist, bei oraler Applikation eine schlechte Bioverfügbarkeit zeigt, starke Nebenwirkungen aufweist und mit einer zunehmenden Resistenzentwicklung assoziiert ist (ANONYMOUS, 2008). Eine weitere Herausforderung beider Krankheitsbilder stellt zudem das intrazelluläre Überleben von *S. aureus* im Phagolysosomen der Wirtszellen dar. Das Bakterium kann für mehrere Tage in professionellen wie nicht-professionellen phagozytischen Zellen überleben, bevor es dem Phagolysosomen entkommt und den Zelltod von Wirtszellen induziert (FLANNAGAN et al., 2016; FOSTER, 2005; GARZONI, KELLEY, 2009).

Die Nutzung von PLGA-Nanokapseln, in deren Innern sich Clarithromycin befindet, soll sowohl die Bioverfügbarkeit am Infektionsort als auch die Zellgängigkeit des Antibiotikums deutlich erhöhen und damit eine deutlich effektivere intrazelluläre Beseitigung der Bakterien ermöglichen. Auf diese Weise könnte die Behandlung der zystischen Fibrose und chronisch mit *S. aureus* infizierter Wunden deutlich optimiert und die Nebenwirkungen verringert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Publikation E (Anhang, (ANVERSA DIMER et al., 2020)) dargestellt.

### 3.3.3. Der Wirt – Interleukin 17C als Target für Hautkrankheiten und Wundheilung

Interleukine zählen zu den Peptidhormonen und dienen den Zellen des Immunsystems als Botenstoffe. Im Menschen konnten die Interleukinfamilien 1 bis 33 identifiziert werden. Die Nummerierung richtet sich dabei nach der zeitlichen Entdeckung. Die Familie der Interleukine 17 (IL-17) setzt sich aus den Interleukinen 17A-F und den dazugehörigen Rezeptoren IL-17RA-E zusammen (Vergleich Abbildung 14) und wird insbesondere mit allergischen Reaktionen und Krankheitsbildern wie Psoriasis, Arthritis, Asthma und multipler Sklerose, aber auch mit der Pathogenabwehr assoziiert (GU et al., 2013).



**Abbildung 14: Vertreter der Interleukin-17 Familie und ihre Rezeptoren**

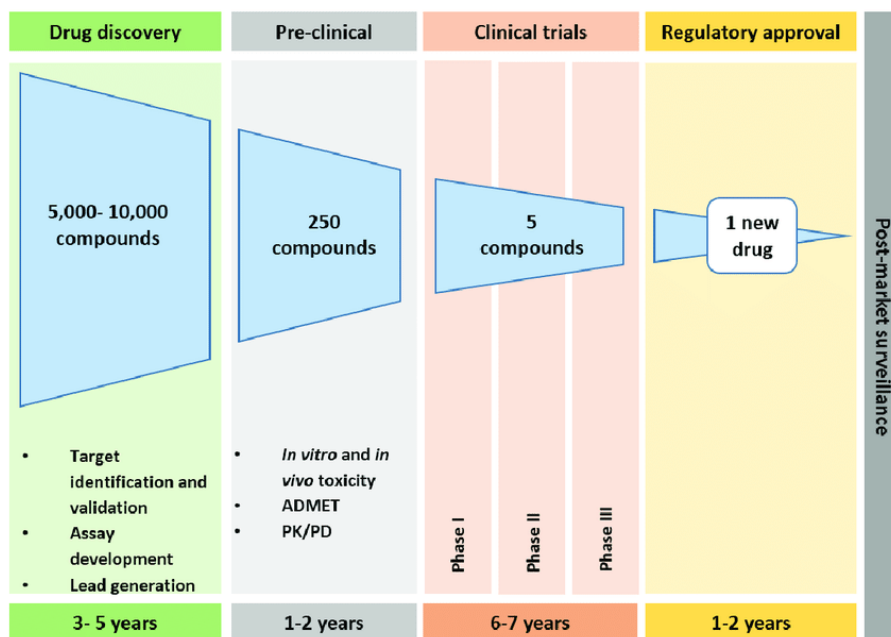
Quelle: ALINEJAD et al., 2017

Das Interleukin 17C (IL-17C) spielt durch seine Bindung an den IL-17RE/A Rezeptorkomplex (Vergleich Abbildung 14) eine wichtige Rolle in der Autoimmunantwort und der Regulation der Wirts-Immunantwort als Reaktion auf Infektionen (CHANG et al., 2011; RAMIREZ-CARROZZI et al., 2011; SONG et al., 2011). Eine Über- bzw. Dysfunktion führt jedoch zur Ausbildung von Krankheitsbildern wie z. B. Psoriasis. IL-17C wird vor allem von Zellen epithelialen Ursprungs (Keratinocyten und Kolonepithelzellen) exprimiert und auch die zugehörigen Rezeptoren werden vornehmlich auf diesen Zelltypen exprimiert. Das Peptidhormon induziert in Keratinocyten die Expression von Genen, die in die Vermittlung der angeborenen Immunität (Zytokine, Chemokine, antimikrobielle Peptide, inflammatorische Mediatoren), Keratinocytenproliferation und Inflammation involviert sind (RAMIREZ-CARROZZI et al., 2011). Nach Pathogenkontakt wird IL-17C vermehrt in Epithelzellen der Trachea, Haut und des Kolons exprimiert, um über den NF- $\kappa$ B und MAP Kinase Signalweg eine Immunantwort zu induzieren (RAMIREZ-CARROZZI et al., 2011; SONG et al., 2011). Auch in Psoriasis Hautläsionen konnte eine erhöhte IL-17C Expression nachgewiesen werden (FLANNAGAN et al., 2016). Auf Grund seiner Involvierung in die Ausbildung von Hautkrankheiten wie atopische Dermatitis und Psoriasis, wurden Anti-IL-17C Antikörper als potenzielles Therapeutikum bereits in murinen Versuchsmodellen getestet. Diese Versuche konnten einen Behandlungserfolg in Form von verringerter Inflammation verzeichnen (VANDEGHINSTE et al., 2018).

Da IL-17C jedoch auch in die Vermittlung der Immunantwort und die Induktion der Keratinozytenproliferation (wichtig für den Wundschluss) involviert ist, stellte sich die Frage, welchen Einfluss eine solche Behandlung auf die Wundheilung und die Bakterienbeseitigung in bakteriell infizierten Wunden hätte. Auch ist die Rolle der IL-17C/IL-17RE Wirkungsachse in Zusammenhang mit der Heilung infizierter Wunden bisher ungeklärt. Aus diesem Grund wurden die Funktion von IL-17C und IL-17RE in einem murinen Wundheilungsmodell (*S. aureus*-infizierte Wunden) und die Expression von IL-17C in *S. aureus* infizierten humanen Wunden untersucht (Publikation F, Anhang, (PÄTZOLD et al., 2021b)). Diese Untersuchungen sollen ein besseres Verständnis der Involvierung von IL-17C in die Heilung infizierter Wunden vermitteln und eine Risiko-Nutzen-Abwägung für die Behandlung von Hautkrankheiten wie Psoriasis mit Anti-IL-17C Antikörpern erlauben.

### 3.4. Mäuse als Modellorganismen

In der prä-klinischen Forschung ist der Einsatz von Mäusen als Modellorganismen nicht mehr wegzudenken. Die Entwicklung neuer Medikamente beansprucht in der Regel bis zu 15 Jahre Arbeit von der Identifikation neuer Targets bis hin zur Marktreife (Vergleich Abbildung 15). Von bis zu 10.000 neuen, erfolgsversprechenden Wirkstoffkandidaten schafft es meist nur eine einzige Substanz zur Marktreife (MATTHEWS et al., 2016).



**Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf der Entwicklung neuer Medikamente**

Die Entwicklung neuer Medikamente dauert bis zu 15 Jahre. Von anfänglich bis zu 10.000 potenziellen Wirkstoffen schafft es meist nur eine Substanz bis zur Marktreife.

Quelle: MATTHEWS et al., 2016

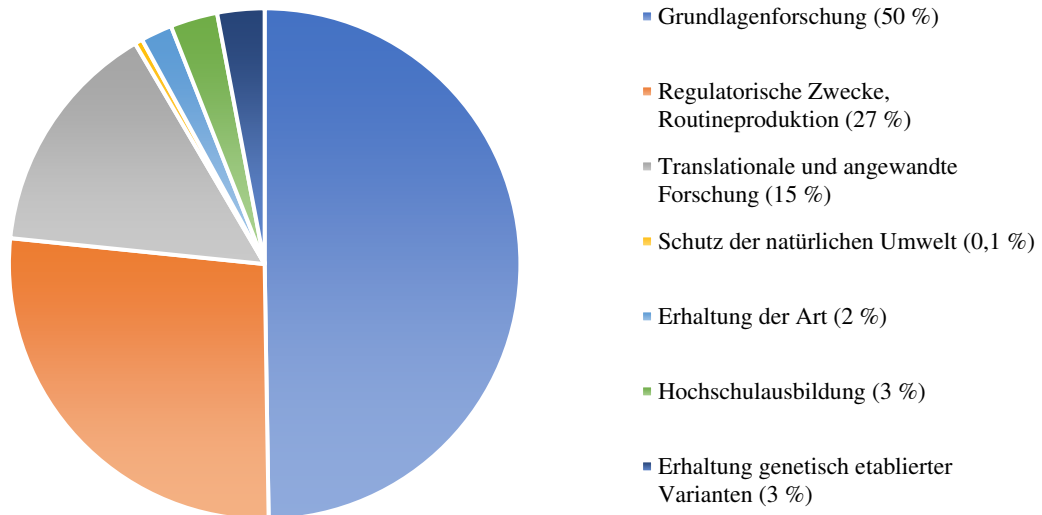
Nach der *in vitro* Testung neuer Wirkstoffkandidaten in Zellkultur-basierten Assays und der Wirkstoffoptimierung erfolgt in der Regel der Einsatz von Versuchstieren zur Untersuchung des Therapieerfolgs und der Pharmakokinetik in einem komplexen, dem Menschen ähnlichen Organismus. Auf Grund ihrer geringen Größe, der günstigen Haltung, kurzen Generationszeiten, der vergleichsweise einfachen genetischen Manipulation und der anatomischen und physiologischen Nähe zum Menschen ist die Maus nach wie vor das meistverwendete Versuchstier. Tabelle 3 zeigt die durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) für die Jahre 2018 und 2019 erfassten Versuchstierzahlen für Deutschland.

**Tabelle 3: Versuchstierzahlen in Deutschland** (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (BMEL), 2021)

<b>Tierart</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>
<b>Mäuse</b>	1.539.575	1.438.336
<b>Ratten</b>	222.811	196.973
<b>Kaninchen</b>	85.193	94.240
<b>Vögel</b>	30.393	35.718
<b>Fische</b>	192.040	347.543

Demnach wurden 2019 weniger Nager als im Vorjahr für Tierversuche eingesetzt, im Gegenzug nahm die Anzahl an Fischen, Vögeln und Kaninchen in Tierversuchen zu. Nichtsdestotrotz sind Mäuse mit etwa 1,5 Millionen Tieren mit Abstand die am häufigsten eingesetzten Tiere in Tierversuchen (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (BMEL), 2021). Dem gegenüber stehen im Vergleich jedoch ~ 750 Millionen geschlachtete Rinder, Schweine und Geflügel in der Lebensmittelindustrie (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (BMEL), 2020) sowie knapp 3 Millionen Tiere, die jährlich durch die Jagd getötet werden (DEUTSCHER JAGDVERBAND E.V. (DJV), 2021). Der Anteil der Tiere, die jährlich in Deutschland in Zusammenhang mit Experimenten getötet werden, beläuft sich auf die Gesamtzahl der getöteten Tiere also auf weniger als 1 %.

Ein Großteil der verwendeten Tiere wird laut BMEL in Deutschland für die Grundlagenforschung eingesetzt (ca. 50 %) und etwa ein Drittel der Tiere findet Einsatz in der Routineproduktion und für regulatorische Prozesse (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (BMEL), 2021) (Vergleich Abbildung 16).



**Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Tierversuchs-Forschungsschwerpunkte in Deutschland**

Quelle: Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (BMEL), 2021).

Innerhalb der Grundlagenforschung liegen laut BMEL die Forschungsschwerpunkte in den Bereichen Onkologie, kardiovaskuläres System, Nervensystem und Immunsystem.

### 3.4.1. Wie wurde die Maus zum Modellorganismus?

Die Labormaus stammt von der Hausmaus *Mus musculus* ab, deren Hauptverbreitungsgebiet Nordamerika und Europa sind. Erste Versuche mit Mäusen und anderen kleinen Vertebraten wurden bereits im 16. Jahrhundert durchgeführt (MORSE, 1981). Die ersten Versuche mit „Labormäusen“ wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Lucien Cuénot und dem Pionier der *Drosophila*-Forschung William E. Castle durchgeführt (CASTLE, ALLEN, 1903; HICKMAN, CAIRNS, 2003).

Ab dem 19. Jahrhundert wurden zunehmend gezielt Mäuse nach morphologischen Merkmalen oder bestimmten Verhaltensweisen gezüchtet, wobei vor allem auf das Wissen aus den Mendel'schen Vererbungsregeln zurückgegriffen wurde. Die erste Inzucht-Linie DBA wurde 1909 offiziell eingeführt (RUSSELL, 1978), nur zehn Jahre später wurde die heute noch häufig eingesetzte Inzuchtlinie C57BL/6 etabliert (STRONG, 1978).

Im Laufe des 20. Jahrhunderts konnten mit Hilfe von Mausversuchen eine Vielzahl wegweisender Fragestellungen beantwortet und Meilensteine in der Forschung erreicht werden: 1940er Jahre: Erfolg oder Misserfolg bei Gewebetransplantationen auf Grundlage der genetischen Determination (GORER, 1948); 1975: Entwicklung von monoklonalen Antikörpern (LINDER, DAVISSON, 2012); 1980er Jahre: genomische Prägung bestimmter chromosomaler Regionen bei Embryonen (MCGRATH, SOLTER, 1984); 1981: erste transgene Mauslinie (GORDON, RUDDLE, 1981); 1986: erste Knock-out Mäuse (LINDER, DAVISSON, 2012).

Zu Beginn des 21. Jahrhunderts wurde schließlich ein vollständiges Mapping des Genoms von Mensch und Maus durch das International Mouse Genome Sequencing Consortium vorgenommen. Dabei zeigte sich eine relativ hohe genetische Ähnlichkeit von 85 % Übereinstimmung zwischen Menschen und der Mauslinie C57BL/6J (WATERSTON et al., 2002).

### **3.4.2. Einsatzmöglichkeiten**

Auf Grund der Inzucht-Zuchtsysteme ist es möglich, hochstandardisierte Mauslinien zu züchten, deren Charakteristika exakt bekannt und gut dokumentiert sind. Diese Tiere eignen sich vor allem zur Untersuchung von immunologischen, onkologischen und genetischen Fragestellungen, die ein Mindestmaß an genetischer Konformität voraussetzen (GUÉNET et al., 2012). Auf Grund dieser genetischen Ähnlichkeit untereinander und einer langen Lebensspanne (im Vergleich zu den Modellorganismen *C. elegans* oder *D. melanogaster*), eignen sich Mäuse auch für die Untersuchung komplexer Krankheitsbilder wie neurodegenerativen Erkrankungen, dem Alterungsprozess und Herzerkrankungen in Zusammenhang mit Stress und erhöhtem Blutdruck. Die Lebensspanne von etwa zwei Jahren ist dabei dennoch ein akzeptabler Zeitrahmen für die Untersuchung dieser Krankheitsbilder.

Insbesondere im Bereich der Implantationsforschung waren und sind Mäuse als Versuchstier unersetzlich. Ohne sie wären Erkenntnisse zur Abstoßung von Allotransplantaten und die Testung von Medikamenten zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen undenkbar gewesen (CHONG et al., 2013).

Trotz einiger Unterschiede z. B. des Immunsystems konnten mit Mäusen wegweisende Ergebnisse für Krankheitsbilder wie Krebs und neurologische Erkrankungen gewonnen werden (VERDIJK et al., 2007; WANG et al., 2018). Da Mäuse sich natürlich omnivor ernähren (Gräser, Insekten, Samen) und somit sehr flexibel auf Ernährungsumstellungen reagieren (SINGLETON, KREBS, 2007), eignen sie sich zudem für Untersuchungen zu Diabetes und Fettleibigkeit (CARROLL et al., 2004; TOYE et al., 2004). Auch für spezifische Verletzungsmuster wie beispielsweise Brandwunden konnten bereits Mausversuche etabliert werden, um die komplexe zu Grunde liegende Pathophysiologie zu verstehen und die Testung neuer Medikamente (insbesondere in der Infektionsforschung) zu ermöglichen (ABDULLAHI et al., 2014).

### **3.4.3. Limitationen**

Trotz vieler wegweisender Meilensteine durch die Nutzung von Mäusen als Versuchstieren müssen einige Einschränkungen und Nachteile in Kauf genommen werden. So unterscheiden sich die Entwicklung, die Aktivierung und die Antwort des angeborenen und erworbenen Immunsystems von Mensch und Maus in einigen Punkten markant voneinander (MESTAS, HUGHES, 2004). Bislang konnten mehr als 80 Unterschiede im Immunsystem von Mensch und Maus identifiziert werden. Eine Auswahl dieser Unterschiede ist in Tabelle 4 aufgeführt.

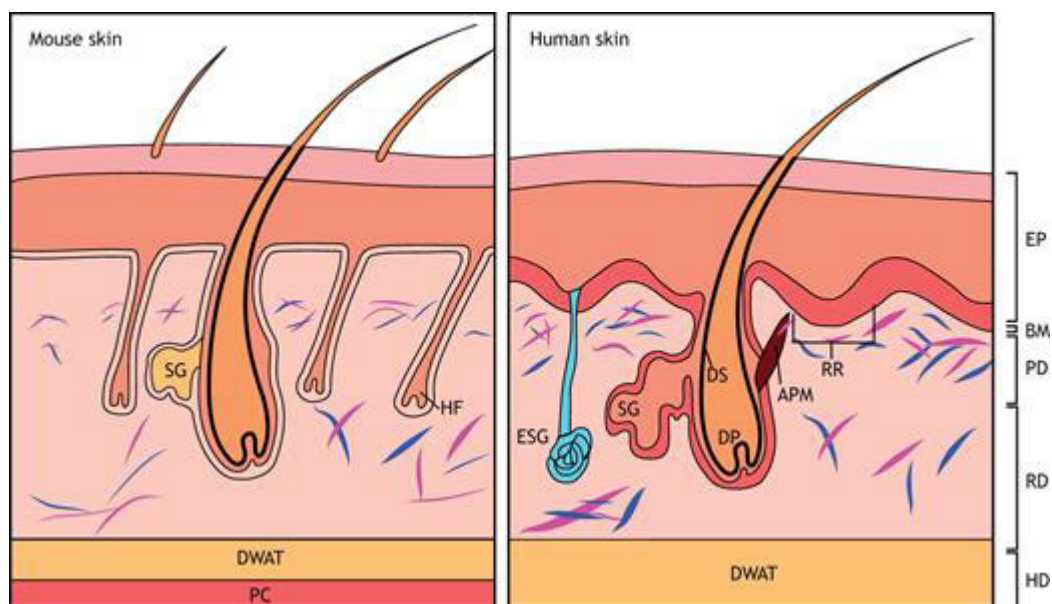


**Tabelle 4: Ausgewählte Unterschiede im Immunsystem von Mensch und Maus**

(DOEING et al., 2003; MESTAS, HUGHES, 2004; RISSO, 2000)

Kriterium	Mensch	Maus
<b>Blutbild</b>	Leukozytäres Blutbild	Lymphozytäres Blutbild
- Anteil neutrophiler Granulozyten	- 30 – 70 %	- 10 – 25 %
- Anteil Lymphozyten	- 30 – 50 %	- 75 – 90 %
<b>Bildung von Defensinen</b>	In neutrophilen Granulozyten	In Paneth-Zellen des Dünndarms
<b>Toll-like Rezeptoren (TLRs)</b>	10 Stück: TLR-1 bis 10	12 Stück: TLR-1 bis 9, 11 und 13
<b>Interleukin 8 (IL-8)</b>	Bedeutend für die Entzündungsantwort	Nicht vorhanden

Auch der Aufbau der Haut muss in Hinblick auf die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wundinfektionsmodelle genauer betrachtet werden (Vergleich Abbildung 17).



**Abbildung 17: Schichtaufbau der Haut von Mäusen und Menschen**

Der Grundlegende Schichtaufbau der Haut mit Epidermis (EP), Basalmembran (BM), Papillenschicht (Stratum papillare, PD), Netzschicht (Stratum reticulare, RD) und Hypodermis (HD) mit weißem Fettgewebe (DWAT) und dem Panniculus carnosus (PC) ähnelt sich bei Maus und Mensch. Die Dichte der Haarfollikel (HF) mit Pilomotor (APM), Haarpapille (DP), Bindegewebescheibe (DS) und Talgdrüse (SG) ist beim Menschen geringer als bei der Maus. Mäuse besitzen im Gegensatz zu Menschen keine ekkrinen Schweißdrüsen (ESG).

Quelle: GRIFFIN et al., 2020

Der grundlegende Schichtaufbau der Haut unterscheidet sich bei Menschen und Mäusen nicht. Epidermis und Dermis der Maus sind jedoch dünner als beim Menschen und Mäuse besitzen keine ekkrinen Schweißdrüsen, sie können also nicht schwitzen.

Dafür besitzen Mäuse mit dem Panniculus carnosus eine dünne Muskelschicht, die nach einer Verletzung stark kontrahiert und so zu einem schnellen Wundschluss führt. Beim Menschen hingegen wird der Wundschluss vornehmlich durch Reepithelialisierung und Ausbildung eines Granulationsgewebes hervorgerufen (GRIFFIN et al., 2020; WONG et al., 2011b). Beim Menschen ist diese spezielle Muskelschicht lediglich als Platysma im Halsbereich vorhanden. Nichtsdestotrotz konnten mit murinen Wundheilungsmodellen ein besseres Verständnis der Wundheilung in verschiedenen Krankheitsstadien gewonnen werden (AARABI et al., 2007; JACOBI et al., 2002; PARK et al., 2009).

Deutlich schwieriger gestaltet sich die Krebsforschung mit Mäusen. Viele Krebsarten, die sich spontan im Menschen entwickeln, entwickeln sich in Nagern nicht spontan (Vergleich Tabelle 5).

**Tabelle 5: Spontane Entstehung verschiedener Krebsarten in Maus und Mensch**

+ häufig spontane Krebsentstehung, - spontane Krebsentstehung eher ungewöhnlich  
verändert nach (ANISIMOV et al., 2005)

<b>Krebsart</b>	<b>Maus</b>	<b>Mensch</b>
<b>Brust</b>	+	+
<b>Lunge</b>	-	+
<b>Prostata</b>	-	+
<b>Kolon</b>	-	+
<b>Haut</b>	-	+
<b>Magen</b>	-	+
<b>Leber</b>	-	+
<b>Endometriumkarzinom</b>	-	+
<b>Leukämie</b>	+	+
<b>Schilddrüse</b>	-	+
<b>Blase</b>	-	+

Auch wirken viele für den Menschen karzinogenen Substanzen in Mäusen nicht karzinogen und andersherum (ANISIMOV et al., 2005). Als Folge dieser Unterschiede musste beispielsweise das Krebsmedikament Endostatin, das in Mäusen Krebs heilt, im Rahmen der klinischen Testphase wieder verworfen werden, da es im Menschen keinerlei Wirkung zeigte (KERBEL, 1998). Viele der prä-klinisch erfolgreich getesteten Krebsmedikamente schaffen es nach der klinischen Studie nicht bis zur Marktreife.

Trotz der beschriebenen physiologischen Unterschiede stellen Mäuse als Modellorganismen ein unverzichtbares Mittel in der Infektionsforschung dar, solange die Ergebnisse kritisch hinterfragt und geprüft werden.

#### 4. Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und eingesetzten Methoden sind den Publikationen A bis F zu entnehmen (Anhang).

Alle im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Tierversuche wurden vom Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt und entsprechend den nationalen und europäischen Richtlinien ausgeführt. Tabelle 6 zeigt die Genehmigungsnummern (TVV Nummer) der entsprechenden Tierversuchsvorhaben in den jeweiligen Publikationen.

**Tabelle 6: Genehmigungsnummern der durchgeführten Tierversuchsvorhaben (TVV)**

<b>Publikation</b>	<b>TVV Nummer</b>	<b>Genehmigungsdatum</b>
A	60/2015	21.12.2015
	34/2017	09.11.2017
B	60/2015	21.12.2015
C	60/2015	21.12.2015
D	43/2016	15.12.2016
E	43/2016	15.12.2016
F	41/2017	19.01.2018
	30/2018	02.08.2018

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der in diese Arbeit eingebundenen Publikationen kurz zusammengefasst und diskutiert. Weiterführende Details und Ergebnisse sind den Publikationen A bis F im Anhang zu entnehmen. Verweise auf Abbildungen und Tabellen werden in folgender Form angegeben: (Publikation X, Abbildung/Tabelle X).

### 5.1. Das Histidin-haltige Phosphatträger Protein HPr in *S. aureus* als neues Antibiotika-Target

Die effiziente Nutzung der vorhandenen Kohlenstoffquellen (insbesondere Glukose) stellt im Gram-positiven Bakterium *S. aureus* einen wichtigen metabolischen Regulationsprozess dar und wird durch die Kohlenstoff-Katabolitenrepression (CCR) gesteuert. Vermittelt wird die CCR unter anderem durch das Protein CcpA (Carbon catabolite protein A) (DEUTSCHER, 2008; SOMERVILLE, PROCTOR, 2009) wobei nicht nur eine metabolisch effiziente Nutzung der vorhandenen Nährstoffe sichergestellt wird, sondern auch die Transkription verschiedenster Virulenzfaktoren des Bakteriums reguliert wird (GÖRKE, STÜLKE, 2008). Die Bindungsaffinität von CcpA an seine Zielsequenzen wird durch Komplexbildung mit dem Histidin-haltigen Phosphoträgerprotein HPr (codiert durch *ptsH*), enorm gesteigert (DEUTSCHER et al., 1995). Gleichzeitig ist HPr als integrales Element des Phosphotransferase-Systems (PTS) maßgeblich in den Glukoseimport in die Bakterienzelle involviert, welches ebenfalls auf physiologische Prozesse wie Biofilmbildung und die Regulation von Virulenzfaktoren Einfluss nimmt (SAIER, 2015). Um die Entwicklung neuer potenzieller Therapeutika anzustoßen, ist die Identifikation neuer Targets außerhalb der bereits adressierten Antibiotikaangriffspunkte (Zellwand, RNA/DNA, Proteinbiosynthese, etc.) von hoher Bedeutung. Das bisher in *S. aureus* wenig beachtete Protein HPr stellt in seiner dualen Rolle ein solch potenzielles Target im bakteriellen Metabolismus dar und wurde in Publikation A genauer untersucht.

Für die Untersuchungen wurden HPr ( $\Delta ptsH$ ) und CcpA ( $\Delta ccpA$ ) Deletionsmutanten, sowie eine Doppeldeletionsmutante ( $\Delta ccpA\_ptsH$ ) und ein komplementiertes Derivat der *ptsH* Deletionsmutante ( $\Delta ptsH::ptsH$ ) in den Laborstämmen *S. aureus* Newman bzw. SA113 (einem starken Biofilmbilder) verwendet. Zusätzlich kam eine Mutante mit einer Punktmutation im *ptsH* Gen (T136G) zum Einsatz ( $\Delta ptsH^*$ ). In diesem Isolat ist die Komplexbildung mit CcpA auf Grund der Basensubstitution von Serin zu Alanin (Position 46 in HPr) nicht mehr möglich, die Funktion von HPr im PTS wird jedoch nicht beeinflusst.

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens und des Metabolismus der Isolate zeigten, dass eine Deletion von *ptsH* das exponentielle Wachstum signifikant verlangsamt, während eine Deletion von *ccpA* die Generationszeit im Vergleich zum Wildtyp nur geringfügig erhöht (Publikation A, Tabelle 2 und Abbildung 1). Entsprechend wichen auch die metabolischen Profile der *ptsH* Mutanten deutlich von denen des Wildtyps und der *ccpA* Deletionsmutante (nur leichte Veränderungen verglichen zum Wildtyp) ab (Publikation A, Abbildung 2). Ein Langzeiteffekt auf die Biomasseausbeute konnte jedoch für keine der Mutanten festgestellt werden.

Die verlangsamte Wachstumsrate der *ptsH* Mutanten lässt sich mit der verminderten Aufnahme von Glukose aus dem Medium erklären. Alternative Importmechanismen wie Glukosetransporter (VITKO et al., 2016) ermöglichen dennoch eine (wenn auch verlangsamte) Aufnahme des Zuckers in die Bakterienzelle.

Für die Bildung eines PIA (Polysaccharide intercellular adhesin)-abhängigen Biofilms benötigt das Bakterium unter *in vitro* Bedingungen die Transkription des *icaADCB* Genclusters zur Synthese des extrazellulären Matrixbestandteils PIA (Polysaccharide intercellular adhesin) (MOORMEIER, BAYLES, 2017) und ausreichend Glukose als Nährstoff. Die Transkription des *ica* Operons wird in *S. aureus* in der frühen Wachstumsphase vermutlich über die Repression des TCA Zyklus durch CcpA vermittelt. Somit ist HPr in zweierlei Weise in die Biofilmbildung involviert. Dieser Zusammenhang konnte in den durchgeführten Experimenten bestätigt werden. *In vitro* zeigen die *ptsH* und *ccpA* Deletionsmutanten sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Bedingungen eine signifikant reduzierte Biofilmbildung (Publikation A, Abbildungen 4 und 5). Zum ersten Mal wurde hierfür auch ein *in vitro* Biofilm Modell unter dynamischen Bedingungen eingesetzt, bei dem Biofilme direkt auf medizinischen Materialien (z.B. Katheterfragmente) gebildet werden. Vergleichbare Versuche wurden bisher stets unter statischen Bedingungen, für kurze Zeiträume (20 - 24 Stunden) oder mit prä-Inkubation des Materials durchgeführt (COLOMER-WINTER et al., 2019; FERREIRA et al., 2012; MANDAKHALIKAR et al., 2018; OUFRID et al., 2015). Im Einklang zur reduzierten Biofilmbildungskapazität der *ptsH* Deletionsmutante konnte für dieses Isolat eine signifikant verringerte *icaA* Transkriptmengen festgestellt werden (Publikation A, Abbildung 4), welches als Teil des *icaADBC* Operons an der PIA Synthese beteiligt ist (CRAMTON et al., 1999).

Die reduzierte Biofilmbildung *in vitro* konnte durch den Einsatz eines murinen Infektionsmodells *in vivo* bestätigt werden. In einem Fremdkörper-assoziierten Wundmodell wurden den Tieren subkutan Katheterfragmente implantiert und das Katheterlumen mit *S. aureus*, der *ptsH* Deletionsmutante oder dem komplementierten *ptsH* Derivat inokuliert. Das Modell wurde von Rupp und Kollogon 1999 erstmals in Zusammenhang mit Biofilmuntersuchungen in *S. epidermidis* publiziert und auf die Anwendung mit *S. aureus* adaptiert (RUPP et al., 1999). Während in normoglykämischen Mäusen mit diesem Modell kein Unterschied zwischen Wildtyp und CcpA-defizienten Tieren feststellbar war (BISCHOFF et al., 2017), zeigten Tiere, die mit der *ptsH* Deletionsmutante infiziert wurden, eine signifikant verringerte Bakterienlast und eine reduzierte Ödemgröße im Bereich um das Implantat (Publikation A, Abbildung 6). Während CcpA unter *in vivo* Bedingungen offenbar nur in glukosereicher Umgebung (diabetische Tiere) einen klaren Einfluss auf die Biofilmbildung an medizinischen Fremdkörpern zu haben scheint (BISCHOFF et al., 2017), führte die Doppelrolle von HPr zu signifikanten Einschränkungen auch unter normoglykämischen Bedingungen. Diese Beobachtung wurde durch den Einsatz eines murinen Abszessmodelles untermauert.

Erstmals im Jahr 2010 beschrieben, simuliert das Modell systemische Bakterieninfektionen mit Abszessbildungen an den Organen (LI et al., 2010). Für alle Deletionsmutanten konnte im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Bakterienlast und damit eine verringerte Infektiosität in der Leber festgestellt werden (Publikation A, Abbildung 7). Die *ptsH* Deletionsmutanten wiesen dabei eine tendenziell stärkere Reduktion der Bakterienlast als die *ccpA* Deletionsmutante auf. Auch hier zeigt sich erneut der additive Effekt der beiden zentralen Funktionen von HPr.

Mit der Hilfe zweier sehr verschiedener *S. aureus* Infektionsmodell in der Maus konnten die *in vitro* generierten Daten auch *in vivo* bestätigt werden. Die im Rahmen dieser Studie generierten Befunde weisen HPr zudem als äußerst vielversprechendes Target für neue Antibiotika aus. Da HPr auch in einer Vielzahl anderer Bakterien wie *Bacillus* spp., *E. coli* oder *Enterobacter* spp. zu finden ist (CONLAN et al., 2014; KHAN et al., 2001; MEADOW et al., 2005), könnte ein entsprechender Wirkstoff potenziell gegen eine Vielzahl von Humanpathogenen wirken. Im Menschen selbst sind das entsprechende Gen und Protein hingegen nicht zu finden, sodass für potenzielle auf HPr abzielende Wirkstoffe eine gute therapeutische Selektivität gemutmaßt werden darf.

## **5.2. Die niedermolekularen Protein Phosphatasen PtpA und PtpB in *S. aureus* als neue Antibiotika-Targets**

Die (De-) Phosphorylierung von Proteinen stellt einen wichtigen Mechanismus in der Regulation vieler zellulärer Prozesse dar (FISCHER, KREBS, 1989; SOULAT et al., 2002). In diversen Gram-positiven und -negativen Bakterien sind Proteinphosphatasen bekannt, die häufig in Zusammenhang mit der Infektiosität der pathogenen Organismen stehen (BENDER, YOTHER, 2001; MORONA et al., 2000). In *S. aureus* wurden bereits zwei Phosphatasen mit niedrigem Molekulargewicht beschrieben: die Protein-Tyrosin-Phosphatase PtpA und die Protein-Arginin-Phosphatase PtpB, die zuvor auch als Tyrosin-Phosphatase charakterisiert wurde (JUNKER et al., 2018; SOULAT et al., 2002). Für beide Enzyme konnte gezeigt werden, dass sie unter *in vitro* Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum und den Zellwandmetabolismus des Bakteriums in Vollmedium haben, ihre genauen Funktionen, insbesondere in Hinblick auf die Pathogenität von *S. aureus*, waren bis dato hingegen unklar (VEGA et al., 2011). Auf Grund des Zusammenhangs von Protein-Phosphatasen und Pathogenität in anderen Organismen (SAJID et al., 2015) lag ein ähnlicher Zusammenhang für *S. aureus* nah und wurde in den Publikationen B und C näher untersucht.

Für PtpA war aus Untersuchungen in *Mycobacterium tuberculosis* bereits bekannt, dass das Enzym Einfluss auf das intrazelluläre Überleben des Bakteriums in Wirts-Makrophagen hat, indem es die Bildung eines Phagolysosomes verhindert (WONG et al., 2011a). Auf diese Weise kann das Bakterium intrazellulär in dieser ansonsten für das Bakterium hochtoxischen Umgebung überleben. Auch für PtpA in *S. aureus* wurden vergleichbare Beobachtungen gemacht (Publikation B, Abbildung 1). PtpA-defiziente Bakterien zeigen im Vergleich zum Wildtyp ein signifikant reduziertes intrazelluläres Überleben in Makrophagen.

Dieser Effekt wird durch die fehlende Sekretion des Proteins in die Wirtszellen bedingt (Publikation B, Abbildung 3). PtpA wird also nicht nur in das extrazelluläre Milieu abgegeben (BRELLE et al., 2015), sondern auch in das Innere von Wirtszellen sekretiert, um so vermutlich Veränderung in der Zelle hervorzurufen. Im Gegensatz dazu wird PtpB nicht in das umgebende Medium sekretiert, sondern ist lediglich im Bakterienpellet nachweisbar (Publikation C, Abbildung 3). Dennoch zeigen auch PtpB-defiziente Bakterienisolate ein signifikant reduziertes Überleben in humanen Makrophagen (Publikation C, Abbildung 1). Als mögliche Ursache konnte hierfür die reduzierte Adaptationsfähigkeit der *ptpB* Deletionsmutante gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies und niedrigem pH, wie sie im Phagolysosomen von Makrophagen zu finden sind, identifiziert werden (Publikation C, Abbildungen 5 und 8).

Um die Bedeutung der beiden niedermolekularen Phosphatasen für die Virulenz von *S. aureus* auch *in vivo* zu untersuchen, wurde erneut das murine Abszessmodell eingesetzt. Beide Phosphatasen erwiesen sich als wichtig für die Infektiosität des Bakteriums. Die Deletion je einer Phosphatase resultierte in einer signifikant reduzierten Bakterienlast in den Organen der Tiere (Publikation B, Abbildung 2 und Publikation C, Abbildung 2). Hervorgerufen wird dieser Effekt möglicherweise durch die reduzierte Überlebensfähigkeit der Deletionsmutanten innerhalb der Makrophagen.

Neuste Untersuchungen zu PtpB konnten zudem zeigen, dass diese Phosphatase einen positiven Einfluss auf die Vermeidung von Phagozytose durch polymorphonukleare Leukozyten hat und die Transkription einer Vielzahl an Genen und Operons, die in Zusammenhang mit Stressadaptation und Infektiosität stehen, beeinflusst (ELHAWY et al., 2021b). Zusammen mit den *in vivo* Befunden aus Publikation B und C, die eine Relevanz im lebenden Organismus bestätigen konnten, zeigt sich, dass beide Proteinphosphatasen vielversprechende Targets für die Entwicklung neuer Substanzen zur Therapie von *S. aureus* Infektionen sind, zumal eine Reihe an LMW-PTP Inhibitoren bereits zur Behandlung anderer Krankheitsbilder wie Krebs, Diabetis und Autoimmunkrankheiten in der Erprobung sind (DESOUZA et al., 2020; FORGHIERI et al., 2009; LORI et al., 2018; LORI et al., 2019).

### **5.3. Optimierung von Rifampicin zur Behandlung *S. aureus*-infizierter Wunden**

Inhibitoren bakterieller RNA-Polymerasen (RNAP) stellen bisher eine nur kleine Gruppe innerhalb der Breitbandantibiotikum dar, lediglich Rifampicin und Fidaxomicin finden als Vertreter dieser Gruppe Einsatz (WEHRLI, 1983). RNA-Polymerasen steuern in der Bakterienzelle nahezu alle transkriptionellen Vorgänge indem sie genomische DNA in RNA transkribieren, die dann wiederum als Matritze für die Proteinbiosynthese dienen bzw. regulatorische oder katalytische Vorgänge vermitteln (BELOGUROV, ARTSIMOVITCH, 2019). Zwar bindet Rifampicin mit hoher Affinität an die RNAP und ist in der Lage die RNA-Synthese in der initialen Phase zu inhibieren, auf RNA-DNA Komplexe in der Elongationsphase hat das Antibiotikum jedoch keinen Einfluss (MCCLURE, CECH, 1978).

Da Bakterien wie *S. aureus* zudem Resistenzmechanismen gegen Rifampicin entwickelt haben, wurden in Publikation D neue Derivate der Substanz auf ihre antibakterielle Wirkung in einem neu etablierten Wundheilungsmodell in haarlose SKH1 Mäusen untersucht.

Das Wundheilungsmodell basiert prinzipiell auf Modellen, die in anderen Mauslinien wie C57BL/6J oder BALB/c etabliert wurden (HURDLE JULIAN et al., 2009; KUGELBERG et al., 2005; SCHIERLE et al., 2009). Die Verwendung haarloser Mäuse verkürzt die Wundpräparationszeit jedoch erheblich, da die Tiere nicht geschoren und enthaart werden müssen. Zudem wird so die Gefahr von Hautverletzungen während der Enthaarung eliminiert und die, die Wunde schützenden, Tegaderm-Pflaster halten deutlich besser auf haarloser Haut, sodass ein Austrocknen der Wunde unwahrscheinlicher wird (HAUPENTHAL et al., 2020). Im Rahmen der Etablierung konnte eine geeignete Bakteriendosis (Inokulum) identifiziert werden, die eine stabile Infektion der Wunde hervorruft ohne systemische Infektionen oder eine zu schwere Belastung im Tier zu induzieren. Als ideale Dosis erwies sich ein Inokulum mit einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,1 was etwa  $10^7$  Koloniebildenden-Einheiten (CFU - colony forming units)/ml entspricht (Publikation D, Abbildung 1). Als Read-out dienten in diesem Versuch neben dem Gewichtsverlust (als Maß für die Belastung der Tiere), die Wundheilungskinetik (Wundgröße) und die Bakterienlast in der Wunde zu Versuchsende. Mit Hilfe des hier etablierten Modelles konnte im Anschluss ein *in vitro* vielversprechender RNAP-Wirkstoffkandidat *in vivo* auf seine Wirksamkeit im Vergleich zu Rifampicin untersucht werden. Bei dem Wirkstoffkandidaten handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes kleines Molekül, das die RNAP inhibiert. *In vitro* wurde der Wirkstoff (zusammen mit einer Vielzahl weiterer Kandidaten) zuvor auf seine antibakterielle Wirkung, die Zytotoxizität, die metabolische Stabilität und die Löslichkeit in wässrigen Lösungen getestet und zeigte auf allen Ebenen vielversprechende Eigenschaften. Die *in vivo* Testung offenbarte jedoch, dass die Substanz keinerlei Effekt auf die Bakterienlast in der Wunde und die Wundheilung infizierter Wunden zeigte (Publikation D, Abbildungen 5 und 6). Während eine Behandlung mit Rifampicin die Bakterienlast in der Wunde im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant reduzierte und Wunden dieser Behandlungsgruppen signifikant schneller heilten, entsprachen die Read-outs der Infektionsgruppe, die mit der neuen Substanz behandelt wurden, nahezu exakt denen der infizierten, aber unbehandelten Tiere.

Dieser Befund zeigt, wie wichtig eine *in vivo* Testung neuer Substanzen ist, seien sie *in vitro* auch noch so vielversprechend. Aus einer Vielzahl vorheriger Versuche, neue Rifampicin-Derivate zu synthetisieren, war bereits bekannt, dass dieses Ziel aus verschiedensten Gründen nur schwer zu verwirklichen ist. So zeigten Derivate, die eine verbesserte antimikrobielle Wirkung aufwiesen, beispielsweise keine Wirkung gegen Rifampicin-resistente Isolate oder es traten schwerwiegende Nebenwirkungen während der klinischen Testung auf (HUDSON et al., 2003; RABUSSAY, ZILLIG, 1969; RIVA, SILVESTRI, 1972). Als mögliche Ursache für die schlechte Wirksamkeit der Testsubstanz wurde die hohe Bindungsaffinität an Plasmaproteine identifiziert (Publikation D, Abbildung S4).



Durch diesen Befund konnte eine systemische Applikation des Wirkstoffes bereits als ineffektiv ausgeschlossen werden, die topische Applikation zeigte ebenfalls keinen Behandlungserfolg.

Diese Publikation verdeutlicht, wie wichtig eine vollständige Charakterisierung neuer Substanzen *in vitro* und anschließend *in vivo* ist. Durch Befunde, wie beispielsweise eine hohe Bindungsaffinität an Plasmaproteine können einzelnen Versuchsansätze im Tiermodell direkt ausgeschlossen werden. Auf diese Weise wird dem 3R-Prinzip (Reduction, Replacement, Refinement), dem in der Europäischen Union alle Tierversuche zu Grunde liegen, Rechnung getragen. Zwar konnte die getestete Substanz keinen Behandlungserfolg vorweisen, doch durch die Aufklärung der Kristallstruktur (Publikation D, Abbildung 3) und die Identifikation der möglichen Ursache für den Behandlungsmisserfolg wird es zukünftig möglich sein, wirkungsvollere Derivate zu designen. RNAP-Inhibitoren sind nach wie vor eine vielversprechende Substanzklasse in der Behandlung bakterieller Infektionen und fortwährend werden neue Derivate auf ihre Wirksamkeit hin untersucht (HUDSON et al., 2003; MARIANI, MAFFIOLI, 2009). Da die Sequenzen der RNAP-Untereinheiten in Gram-positiven und -negativen Bakterien, jedoch nicht in den eukaryotischen RNAP I, RNAP II und RNAP III hoch konserviert sind, ist die Basis für eine therapeutische Selektivität und eine Breitbandantibiotika-Wirkung gegen eine Vielzahl Bakterien gegeben. Mit Hilfe des etablierten Wundheilungsmodells in haarlosen Mäusen wird die *in vivo* Testung neuer Substanzen zukünftig zudem einfacher und schneller sein.

#### **5.4. Einsatz von Polymer Nanokapseln zur Optimierung von Clarithromycin-Behandlungen**

Eine große Herausforderung bei der Antibiotikatherapie ist die Bereitstellung des Wirkstoffes in einer ausreichenden Konzentration und über einen ausreichend langen Zeitraum am Ort der Infektion. Als besonders schwierig gestaltet sich dabei die Behandlung intrazellulär überlebender Bakterien wie *S. aureus* mit schwer zellgängigen bzw. nicht-zellpenetrierenden Antibiotika. Während ein Großteil der internalisierten Bakterienzellen innerhalb der ersten Tage durch die Wirtszellen abgetötet wird, ist ein kleiner Teil der Bakterien in der Lage, mehrere Tage ohne Viabilitätsverlust im sauren Phagosom von Wirtszellen zu überleben und sich anschließend weiter im Wirt zu vermehren (FLANNAGAN et al., 2016; GARZONI, KELLEY, 2009). Dieser Überlebensvorteil erschwert die Behandlung von Patienten mit chronischer Wundinfektion oder zystischer Fibrose (CF) enorm. Die schwere chronische Lungenerkrankung geht oft mit der Kolonisierung der unteren Atemwege mit *S. aureus* oder *M. abscessus* einher (FILKINS, O'TOOLE, 2016; ULRICH et al., 1998). Das Antibiotikum der Wahl bei CF Patienten ist Clarythromycin in einer Langzeitbehandlung, es ist jedoch schwer wasserlöslich und hat bei oraler Applikation eine schlechte Bioverfügbarkeit (ANONYMOUS, 2008). Aus diesem Grund wurde in Publikation E die Optimierung der Behandlung durch Einschluss des Antibiotikums in Polyacetic-co-glycolic acid (PLGA) Nanokapseln untersucht. PLGA kommt bereits bei einer Vielzahl chirurgischer Verfahren aber auch bei der Wirkstofflieferung zum Einsatz und ist ein gut charakterisiertes Transportsystem (ASTETE, SABLIOV, 2006; MIR et al., 2017).

Mit dieser verbesserten Wirkstoffbereitstellung sollen nicht nur extrazelluläre, sondern auch intrazelluläre Bakterien in Makrophagen oder Gewebezellen beseitigt werden können, da die Nanokapseln direkt vor Ort ihre Wirkstoffe über einen längeren Zeitraum freisetzen können.

Zu diesem Zwecke wurden neuartige Nanokapseln entwickelt und deren therapeutisches Potential im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines murinen *in vivo* Modells evaluiert. Die Oberflächeneigenschaften der Nanokapseln vermitteln eine verbesserte Anhaftung an die negativ geladenen Bakterienzellwand oder die Wirtszellmembran und somit eine bessere Penetration der Zellen, einhergehend mit einer gesteigerten pharmazeutischen Wirksamkeit. Sowohl Nanokapseln mit neutraler als auch solche mit kationischer Oberflächenladung wurden auf ihre Stabilität und die Wirkstofffreisetzung hin untersucht. Die positive Ladung der kationischen Nanokapseln wurde durch eine Chitosan-Zugabe erreicht. Diese Art der verbesserten Anbindung an negativ geladene Zellen mittels Chitosan wurde in der Vergangenheit bereits evaluiert (RADOVIC-MORENO et al., 2012; XIE et al., 2014). Für beide Nanokapsel-Ansätze konnte eine gleiche Stabilität, Partikelgröße und Freisetzungsgeschwindigkeit ermittelt werden (Publikation E, Tabelle 1). Durch Tetsung der beladenen Nanopartikel in Zellkulturmodellen konnte zudem gezeigt werden, dass Clarythromycin, freigesetzt aus den Nanopartikeln, in klinisch wirksamen Konzentrationen keinen zytotoxischen Effekt auf humane Zellen hat und die Nanopartikel von Makrophagen aufgenommen werden. Dabei lokalisieren sie sich insbesondere im Lysosom der humanen Zellen, ebenso wie Bakterienzellen auch. Kationische Nanokapseln wurden hierbei signifikant mehr aufgenommen als neutral geladene Nanokapseln (Publikation E, Abbildung 1). Eine Behandlung von *S. aureus in vitro* (Publikation F, Abbildung 2) und *in vivo* im murinen Wundinfektionsmodell (Publikation E, Abbildung 5) zeigten eine signifikante Reduktion der Bakterienlast.

Für die *in vivo* Untersuchungen wurde neben dem Mausmodell auch ein Zebrafisch-Modell für die Testung der beladenen Nanopartikel eingesetzt. Dieser Modellorganismus erfreut sich großer Beliebtheit, da die Embryonen und Larven sehr klein sind (geringer Platzaufwand in der Haltung), auf Grund ihrer hohen Reproduktionszahl ein großformatiges Screening erlauben und durchscheinend sind, sodass ein live imaging des Organismus möglich ist (LIESCHKE, CURRIE, 2007; SHIN, FISHMAN, 2002). Die Testung neuer Medikamente gestaltet sich mit diesem Modell jedoch schwierig. Testsubstanzen werden in der Regel im Wasser gelöst und können nur eingeschränkt auf verschiedenen Routen appliziert werden. Zudem unterscheiden sich die Standards der unterschiedlichen Forschungszentren sehr stark, sodass die Interpretation der Befunde stark variiert und sehr kritisch betrachtet wird (JYOTSHNA et al., 2014). Ein weiteres Problem ist, dass derzeit nur eine Bioanalyse der Wirkstoffaufnahme im Gesamtorganismus möglich ist, Konzentrationen in bestimmten Geweben können nicht bestimmt und somit auch nicht auf Säugetiere übertragen werden.

Das Zebrafischmodell ist somit gut dazu geeignet, ein erstes Toxizitätsscreening potenzieller Wirkstoffe oder Transportsysteme mit einer hohen Durchsatzrate durchzuführen. Der Einsatz von Mausmodellen für weiterführende Untersuchungen bleibt jedoch weiterhin unerlässlich, um eine dem Menschen realitätsnahe Einschätzung der Wirkung zu ermöglichen.

### **5.5. Der Einfluss des human Interleukins 17C auf die Heilung von *S. aureus*-infizierten Wunden**

Interleukine spielen als körpereigene Botenstoffe eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung der Immunantwort. Die Interleukin-17 Familie steht in Zusammenhang mit immunregulatorischen Prozessen und der Vermittlung proinflammatorischer Prozesse. Ein Vertreter dieser Familie, Interleukin-17C (IL-17C) spielt hierbei eine wichtige Rolle bei der Regulation der Wirtsimmunantwort und ist in die Vermittlung der epithelialen Entzündungsreaktion involviert (CHANG et al., 2011; SONG et al., 2011). Eine Über- bzw. Dysfunktion in der IL-17C Expression führt jedoch zur Ausbildung von Hautkrankheiten wie Psoriasis, da es ebenfalls die Proliferation von Keratinozyten stimuliert (RAMIREZ-CARROZZI et al., 2011). Ein Einsatz von monoklonalen Anti-IL-17C Antikörpern wurde daher als potenzielle Behandlung dieser Krankheitsbilder in Betracht gezogen und konnte in Tierversuchen bereits erfolgreich die Krankheitsbilder von Psoriasis und atopischer Dermatitis mindern (VANDEGHINSTE et al., 2018). Für andere Interleukine der Familie wie beispielsweise IL-17A sind bereits Wirkstoffe wie Secukinumab und Ixekizumab zur Behandlung von Psoriasis zugelassen (LAUFFER et al., 2020). Auf Grund der Involvierung von IL-17C in die Vermittlung proinflammatorischer Prozesse in Epithelzellen stellt sich jedoch die Frage, ob eine solche Behandlung in einer verminderten Wundheilung resultieren könnte.

Um diese Frage zu beantworten, wurde die Wundheilungskinetik *S. aureus*-infizierter und nicht-infizierter Wunden sowie die Bakterienlast in den infizierten Wunden in Wildtyp und IL-17C- bzw. IL-17RE-defizienten (zugehöriger Rezeptor) Mäusen untersucht (Publikation F). In nicht-infizierten Wunden konnten keinerlei Unterschiede in der Wundheilung der drei Versuchsgruppen festgestellt werden, sodass ein Einsatz von Anti-IL-17C Antikörpern im Zusammenspiel mit nicht-infizierten Wunden als unbedenklich erscheint. Die Wundheilung mit *S. aureus* infizierter Wunden verlief in Tieren mit defekter IL-17C Wirkachse jedoch deutlich verlangsamt (Publikation F, Abbildung 1). Die Bakterienlast in den Wunden wurde hingegen nicht beeinflusst (Publikation F, Abbildung 2) obwohl ein Zusammenhang von Bakterienlast und verzögerter Wundheilung in der Vergangenheit bereits gezeigt werden konnte (EDWARDS, HARDING, 2004). Immunologische Untersuchungen der Wundhomogenisate zeigten eine signifikante größere Menge des Tumornekrosefaktors alpha (TNF- $\alpha$ ) in *IL-17re*<sup>-/-</sup> Tieren und eine signifikant erhöhte Menge des Interleukin 17A (IL-17A) in *IL-17c*<sup>-/-</sup> Tieren verglichen mit Wildtyptieren während für andere typische Vertreter inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und G-CSF keine Unterschiede zwischen den Infektionsgruppen feststellbar waren (Publikation F, Abbildungen 2 und 3).

Durch histologische Untersuchungen der infizierten Wunden von Wildtyp und *IL-17c<sup>-/-</sup>* Tieren konnte eine Veränderung in der Rekrutierung von polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten (PMN), sowie ein veränderter Einstrom von mononukleären Phagozyten als Ursachen für die veränderte Wundheilungskinetik ausgeschlossen werden (Publikation F, Abbildung 2). Eine signifikant reduzierte Menge Keratin 5 (K5) -positiver Zellen konnte im Bereich der Wundränder von *IL-17c<sup>-/-</sup>* Tieren festgestellt werden (Publikation F, Abbildung 3).

Bei der Analyse der relativen IL-17C Konzentration in infizierten und nicht-infizierten humanen Hautproben konnte eine signifikant erhöhte Expression in infiziertem Epidermisgewebe festgestellt werden (Publikation F, Abbildung 4). Dies bestätigt die Involvierung von IL-17C in die Reaktion auf eine Infektion in Hautgewebe, insbesondere in Keratinozyten, in denen das Peptidhormon vornehmlich gebildet wird (RAMIREZ-CARROZZI et al., 2011). Im Einklang mit der Literatur wird IL-17C bei Bakterienkontakt vermehrt exprimiert (HOLLAND et al., 2009; RAMIREZ-CARROZZI et al., 2011), der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist jedoch weiter unklar. Eine mögliche Erklärung könnte in einer verminderten Keratinozyten-Proliferation und Einwanderung in den Wundbereich in IL-17C defizienten Tieren liegen, da der Einfluss von IL-17C auf die Keratinozyten-Proliferation bereits nachgewiesen werden konnte (RAMIREZ-CARROZZI et al., 2011). Da die Wundheilung jedoch ein höchst komplizierter Ablauf ist, in den diverse Zelltypen, Signalmoleküle und Signalkaskaden involviert sind, ist die Aufdeckung der molekularen Prozesse der IL-17C/IL-17RE Wirkachse anhand der in dieser Publikation vorgestellten Befunde noch nicht möglich.

Nichtsdestotrotz konnte durch den Einsatz des murinen Wundheilungsmodells aufgedeckt werden, dass IL-17C und sein Rezeptor IL-17RE für die Wundheilung infizierter Wunden relevant sind, auch wenn die Bakterienbeseitigung selbst nicht beeinflusst wird. Da die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Wunden und einer Kontamination der Wunden mit Bakterien im Falle von entzündlichen Hautinfektionen wie Psoriasis (ausgelöst vor allem durch den Juckreiz) recht wahrscheinlich ist, sollte der Einsatz von monoklonalen Anti-IL-17C Antikörpern zur Behandlung der Hauterkrankung äußerst gründlich abgewogen werden, um die Entstehung von infizierten chronischen Wunden nicht zu begünstigen.

## 5.6. Ausblick

In der Vergangenheit stand zu Beginn der Entwicklung neuer antimikrobieller Wirkstoffe oftmals eine neue Substanz (z.B. ein Naturstoff), die sich als wirksam erwies, obwohl der zugrundeliegende Mechanismus der Bindung der Substanz an bestimmte bakteriell Proteine nicht bekannt war. Die, durch die Substanz modifizierten, Angriffspunkte und der Wirkmechanismus wurden oft erst im Nachhinein aufgeklärt (SINGH et al., 2006). Auf Grund der enormen Fortschritte in der Aufklärung von Proteinstrukturen können heute jedoch gezielt (semi-) synthetische Derivate von beispielsweise Naturstoffen oder bereits etablierten Substanzen erzeugt und dank umfassender Verzeichnisse der synthetischen Verbindungen mit einer hohen Durchsatzrate gescreent werden (JACKSON et al., 2018). Dabei werden potentielle Substanzkandidaten nach der Aufklärung der Zielstruktur (z. B. mittels Röntgenkristallographie oder NMR (Nuclear magnetic resonance spectroscopy)) und der biologischen Targetvalidierung mittels sich wiederholender Zyklen aus Synthese, Testung und Optimierung der chemischen Charakteristika so verbessert, dass sie schließlich eine hohe Bindungsaffinität und Spezifität aufweisen und sich für die (pre-) klinische Testung eignen (ALLSOP, ILLINGWORTH, 2002; HUGHES et al., 2011; SINGH et al., 2006). In dieser Arbeit wurden verschiedene neue bakterielle Angriffspunkte identifiziert und auf ihre Eignung als Zielstrukturen untersucht. Da sich die Strukturen durch eine hohe Spezifität auszeichnen ist der Grundstein für die Entwicklung neuer Substanzen gegen das Bakterium *S. aureus* gelegt.

## 6. Bibliografie

1. Aarabi S, Bhatt KA, Shi Y, Paterno J, Chang EI, Loh SA, Holmes JW, Longaker MT, Yee H, Gurtner GC (2007) Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *Faseb j* 21:3250-3261
2. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG (2014) Animal models in burn research. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71:3241-3255
3. Aldujaily A, Al-Alo K, Mhs M (2019) Hematology, bacteriology and antibiotic resistance in milk of water buffalo with subclinical mastitis.
4. Alibayov B, Baba-Moussa L, Sina H, Zdeňková K, Demnerová K (2014) Staphylococcus aureus mobile genetic elements. *Molecular Biology Reports* 41:5005-5018
5. Alinejad V, Dolati S, Motalebnezhad M, Yousefi M (2017) The role of IL17B-IL17RB signaling pathway in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 88:795-803
6. Allsop A, Illingworth R (2002) The impact of genomics and related technologies on the search for new antibiotics. *Journal of Applied Microbiology* 92:7-12
7. Anisimov VN, Ukraintseva SV, Yashin AI (2005) Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? *Nature Reviews Cancer* 5:807-819
8. Anonymous (2008) Clarithromycin. *Tuberculosis* 88:92-95
9. Anversa Dimer F, de Souza Carvalho-Wodarz C, Goes A, Cirnski K, Herrmann J, Schmitt V, Pätzold L, Abed N, De Rossi C, Bischoff M, Couvreur P, Müller R, Lehr CM (2020) PLGA nanocapsules improve the delivery of clarithromycin to kill intracellular Staphylococcus aureus and Mycobacterium abscessus. *Nanomedicine* 24:102125
10. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME (2011) Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2:445-459
11. Armstrong-Esther CA, Smith JE (1976) Carriage Patterns of Staphylococcus Aureus in a Healthy Non-Hospital Population of Adults and Children. *Annals of Human Biology* 3:221-227
12. Astete CE, Sabliov CM (2006) Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 17:247-289

13. Azhar A, Rasool S, Haque A, Shan S, Saeed M, Ehsan B, Haque A (2017) Detection of high levels of resistance to linezolid and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 66:1328-1331
14. Bastos Mdo C, Coelho ML, Santos OC (2015) Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology (Reading)* 161:683-700
15. Bechet E, Guiral S, Torres S, Mijakovic I, Cozzone AJ, Grangeasse C (2009) Tyrosine-kinases in bacteria: from a matter of controversy to the status of key regulatory enzymes. *Amino Acids* 37:499-507
16. Belogurov GA, Artsimovitch I (2019) The Mechanisms of Substrate Selection, Catalysis, and Translocation by the Elongating RNA Polymerase. *Journal of molecular biology* 431:3975-4006
17. Bender MH, Yother J (2001) CpsB is a modulator of capsule-associated tyrosine kinase activity in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 276:47966-47974
18. Bien J, Sokolova O, Bozko P (2011) Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J Pathog* 2011:601905
19. Bischoff M, Wonnenberg 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* 7:172
20. Boles BR, Thoendel M, Roth AJ, Horswill AR (2010) Identification of genes involved in polysaccharide-independent *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS One* 5:e10146
21. Brelle S, Baronian G, Huc-Brandt S, Zaki LG, Cohen-Gonsaud M, Bischoff M, Molle V (2015) Phosphorylation-mediated regulation of the *Staphylococcus aureus* secreted tyrosine phosphatase PtpA. *Biochem Biophys Res Commun*
22. Broughton G, II, Janis JE, Attinger CE (2006) Wound Healing: An Overview. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117
23. Brown AF, Leech JM, Rogers TR, McLoughlin RM (2014) *Staphylococcus aureus* Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design. *Front Immunol* 4:507
24. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) (2020). Versuchstierzahlen 2019. In Pressemitteilung Nr. 246/2020 (BMEL - Pressemitteilungen - Versuchstierzahlen 2019)
25. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) (2021). Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2019 (BMEL - Tierschutz - Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2019)
26. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA (2001) Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* 104:901-912
27. Cardoso P, Glossop H, Meikle TG, Aburto-Medina A, Conn CE, Sarojini V, Valery C (2021) Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities. *Biophysical reviews*:1-35
28. Carroll L, Voisey J, van Daal A (2004) Mouse models of obesity. *Clin Dermatol* 22:345-349
29. Castle WE, Allen GM (1903). The heredity of albinism (JSTOR).
30. Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ, Dong C (2011) Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity* 35:611-621
31. Chaubal M (2002) Polylactides/glycolides-excipients for injectable drug delivery and beyond. *Drug Deliv Technol* 2:34-36
32. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* 94:278-285
33. Cheng AG, Kim HK, Burts ML, Krausz T, Schneewind O, Missiakas DM (2009) Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. *Faseb j* 23:3393-3404

34. 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
35. Cheng AG, DeDent AC, Schneewind O, Missiakas D (2011) A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends Microbiol* 19:225-232
36. Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC (2007) Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* 28:869-876
37. Chifiriuc MC, Lixandru M, Iordache C, Bleotu C, Larion C, Olguta D, Lazar V, Antohe F, Israil AM (2008) Internalization of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacterial cells by non-phagocytic, epithelial human cells. *ROMANIAN BIOTECHNOLOGICAL LETTERS* 13:3651
38. Chong AS, Alegre M-L, Miller ML, Fairchild RL (2013) Lessons and Limits of Mouse Models. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3
39. CLSI (2011) Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard—Second Edition. CLSI document M24-A2 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
40. Colomer-Winter C, Lemos JA, Flores-Mireles AL (2019) Biofilm Assays on Fibrinogen-coated Silicone Catheters and 96-well Polystyrene Plates. *Bio-protocol* 9:e3196
41. Conlan S, Thomas PJ, Deming C, Park M, Lau AF, Dekker JP, Snitkin ES, Clark TA, Luong K, Song Y, Tsai YC, Boitano M, Dayal J, Brooks SY, Schmidt B, Young AC, Thomas JW, Bouffard GG, Blakesley RW, Mullikin JC, Korlach J, Henderson DK, Frank KM, Palmore TN, Segre JA (2014) Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Sci Transl Med* 6:254ra126
42. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y (2003) Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 36:53-59
43. Cozzone AJ (1993) ATP-dependent protein kinases in bacteria. *J Cell Biochem* 51:7-13
44. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 67:5427-5433
45. Dalton H, Stirling DI, Quayle JR (1982) Co-Metabolism [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 297:481-496
46. Daum RS (2007) Skin and Soft-Tissue Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *New England Journal of Medicine* 357:380-390
47. Davis JP, Zhou MM, Van Etten RL (1994) Kinetic and site-directed mutagenesis studies of the cysteine residues of bovine low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase. *J Biol Chem* 269:8734-8740
48. DeSouza SR, Olson MC, Tinucci SL, Sinner EK, Flynn RS, Marshall QF, Jakubowski HV, McIntee EJ (2020) SAR of non-hydrolysable analogs of pyridoxal 5'-phosphate against low molecular weight protein tyrosine phosphatase isoforms. *Bioorg Med Chem Lett* 30:127342
49. Deutscher J, Saier MH (1983) ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80:6790
50. 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. *Molecular Microbiology* 15:1049-1053
51. Deutscher J, Francke C, Postma PW (2006) How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70:939
52. Deutscher J (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 11:87-93
53. Deutscher J, Aké FMD, Derkaoui M, Zébré AC, Cao TN, Bouraoui H, Kentache T, Mokhtari A, Milohanic E, Joyet P (2014) The Bacterial Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System: Regulation by Protein Phosphorylation and Phosphorylation-Dependent Protein-Protein Interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78:231

54. Deutscher Jagdverband e.V. (DJV) (2021) DJV-Handbuch Jagd 2021, Deutscher Jagdverband e.V.).
55. Dezfulian A, Aslani MM, Oskoui M, Farrokh P, Azimirad M, Dabiri H, Salehian MT, Zali MR (2012) Identification and Characterization of a High Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring VanA Gene Cluster Isolated from Diabetic Foot Ulcer. *Iran J Basic Med Sci* 15:803-806
56. Dimer F, de Souza Carvalho-Wodarz C, Hauptenthal J, Hartmann R, Lehr C-M (2015) Inhalable Clarithromycin Microparticles for Treatment of Respiratory Infections. *Pharmaceutical Research*:1-12
57. Dissemmond J, Bültemann A, Gerber V, Jäger B, Kröger K, Münter C (2017) Diagnosis and treatment of chronic wounds: current standards of Germany's Initiative for Chronic Wounds e. V. *J Wound Care* 26:727-732
58. Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET (2003) Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin Pathol* 3:3
59. Donlan RM (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerging infectious diseases* 7:277-281
60. Dziewanowska K, Carson AR, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Bohach GA (2000) Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect Immun* 68:6321-6328
61. Edwards R, Harding KG (2004) Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17
62. Eickhoff TC (1994) Airborne nosocomial infection: a contemporary perspective. *Infect Control Hosp Epidemiol* 15:663-672
63. El Haj C, Murillo O, Ribera A, Garcia-Somoza D, Tubau F, Cabellos C, Cabo J, Ariza J (2017) The anti-biofilm effect of macrolides in a rat model of *S. aureus* foreign-body infection: Might it be of clinical relevance? *Medical Microbiology and Immunology* 206:31-39
64. Elhaway MI, Huc-Brandt S, Pätzold L, Gannoun-Zaki L, Abdrabou AMM, Bischoff M, Molle V (2021a) The Phosphoarginine Phosphatase PtpB from *Staphylococcus aureus* Is Involved in Bacterial Stress Adaptation during Infection. *Cells* 10
65. Elhaway MI, Molle V, Becker SL, Bischoff M (2021b) The Low-Molecular Weight Protein Arginine Phosphatase PtpB Affects Nuclease Production, Cell Wall Integrity, and Uptake Rates of *Staphylococcus aureus* by Polymorphonuclear Leukocytes. *International Journal of Molecular Sciences* 22
66. Elyasi S, Khalili H, Dashti-Khavidaki S, Mohammadpour A (2012) Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review. *Eur J Clin Pharmacol* 68:1243-1255
67. Euzeby J (2010) List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1009-1010
68. Ferreira FA, Souza RR, Bonelli RR, Américo MA, Fracalanza SEL, Figueiredo AMS (2012) Comparison of in vitro and in vivo systems to study ica-independent *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 88:393-398
69. Filkins LM, O'Toole GA (2016) Cystic Fibrosis Lung Infections: Polymicrobial, Complex, and Hard to Treat. *PLOS Pathogens* 11:e1005258
70. Fischer EH, Krebs EG (1989) Commentary on "The Phosphorylase b to a Converting Enzyme of Rabbit Skeletal Muscle". *Biochim Biophys Acta* 1000:297-301
71. Flannagan RS, Heit B, Heinrichs DE (2016) Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination. *Cell Microbiol* 18:514-535
72. Fleming E, Lazinski DW, Camilli A (2015) Carbon catabolite repression by seryl phosphorylated HPr is essential to *Streptococcus pneumoniae* in carbohydrate-rich environments. *Molecular Microbiology* 97:360-380
73. Forghieri M, Laggner C, Paoli P, Langer T, Manao G, Camici G, Bondioli L, Prati F, Costantino L (2009). Synthesis, activity and molecular modeling of a new series of chromones as low molecular weight protein tyrosine phosphatase inhibitors. In *Bioorg Med Chem (England)*, pp. 2658-2672.



74. Foster TJ, O'Reilly M, Bramley AJ (1990) Genetic studies of *Staphylococcus aureus* virulence factors. *Pathogenesis of wound and biomaterial-associated infections*:35-46
75. Foster TJ, Höök M (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* 6:484-488
76. Foster TJ (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 3:948-958
77. Frykberg RG, Banks J (2015) Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in wound care* 4:560-582
78. Fuhrmann J, Mierzwa B, Trentini DB, Spiess S, Lehner A, Charpentier E, Clausen T (2013) Structural basis for recognizing phosphoarginine and evolving residue-specific protein phosphatases in gram-positive bacteria. *Cell Rep* 3:1832-1839
79. Gannoun-Zaki L, Pätzold L, Huc-Brandt S, Baronian G, Elhaway MI, Gaupp R, Martin M, Blanc-Potard AB, Letourneur F, Bischoff M, Molle V (2018) PtpA, a secreted tyrosine phosphatase from *Staphylococcus aureus*, contributes to virulence and interacts with coronin-1A during infection. *J Biol Chem* 293:15569-15580
80. Garzoni C, Kelley WL (2009) *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol* 17:59-65
81. Gordon JW, Ruddle FH (1981) Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214:1244-1246
82. Gordon RJ, Lowy FD (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 5:S350-359
83. Gorer PA (1948) The significance of studies with transplanted tumours. *British journal of cancer* 2:103
84. Görke B, Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology* 6:613-624
85. Grangeasse C, Cozzone AJ, Deutscher J, Mijakovic I (2007) Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci* 32:86-94
86. Griffin MF, desJardins-Park HE, Mascharak S, Borrelli MR, Longaker MT (2020) Understanding the impact of fibroblast heterogeneity on skin fibrosis. *Disease Models & Mechanisms* 13
87. Gristina AG (1987) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237:1588-1595
88. Grumann D, Nübel U, Bröker BM (2014) *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution* 21:583-592
89. Gu C, Wu L, Li X (2013) IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 64:477-485
90. Guan KL, Dixon JE (1990) Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 249:553-556
91. Guénet J-L, Orth A, Bonhomme F (2012). Origins and Phylogenetic Relationships of the Laboratory Mouse. In, pp. 3-20.
92. Guest JF, Ayoub N, McIlwraith T, Uchehgbu I, Gerrish A, Weidlich D, Vowden K, Vowden P (2015) Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK. *BMJ Open* 5:e009283
93. Guinan ME, Dan BB, Guidotti RJ, Reingold AL, Schmid GP, Bettoli EJ, Lossick JG, Shands KN, Kramer MA, Hargrett NT, Anderson RL, Broome CV (1982) Vaginal colonization with *Staphylococcus aureus* in healthy women: a review of four studies. *Ann Intern Med* 96:944-947
94. Haghi M, Young PM, Traini D, Jaiswal R, Gong J, Bebawy M (2010) Time- and passage-dependent characteristics of a Calu-3 respiratory epithelial cell model. *Drug Dev Ind Pharm* 36:1207-1214
95. Hauptenthal J, Kautz Y, Elgaher WAM, Pätzold L, Röhrig T, Laschke MW, Tschernig T, Hirsch AKH, Molodtsov V, Murakami KS, Hartmann RW, Bischoff M (2020) Evaluation of Bacterial RNA Polymerase Inhibitors in a *Staphylococcus aureus*-Based Wound Infection Model in SKH1 Mice. *ACS Infect Dis* 6:2573-2581
96. Havaei SA, Assadbeigi B, Esfahani BN, Hoseini NS, Rezaei N, Havaei SR (2015) Detection of *mecA* and enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis and characterization of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in MRSA strains. *Iran J Microbiol* 7:161-167

97. Herring CD, Raffaele M, Allen TE, Kanin EI, Landick R, Ansari AZ, Palsson BØ (2005) Immobilization of *Escherichia coli* RNA Polymerase and Location of Binding Sites by Use of Chromatin Immunoprecipitation and Microarrays. *Journal of Bacteriology* 187:6166
98. Hickman M, Cairns J (2003) The centenary of the one-gene one-enzyme hypothesis. *Genetics* 163:839-841
99. Hidayat LK, Hsu DI, Quist R, Shriner KA, Wong-Beringer A (2006) High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity. *Arch Intern Med* 166:2138-2144
100. Hogan S, Kasotakis E, Maher S, Cavanagh B, O'Gara JP, Pandit A, Keyes TE, Devocelle M, O'Neill E (2019) A novel medical device coating prevents *Staphylococcus aureus* biofilm formation on medical device surfaces. *FEMS Microbiology Letters* 366
101. Holland DB, Bojar RA, Farrar MD, Holland KT (2009) Differential innate immune responses of a living skin equivalent model colonized by *Staphylococcus epidermidis* or *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 290:149-155
102. Hong HJ, Hutchings MI, Buttner MJ (2008) Vancomycin resistance VanS/VanR two-component systems. *Adv Exp Med Biol* 631:200-213
103. Horisawa E, Kubota K, Tuboi I, Sato K, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y (2002) Size-Dependency of DL-Lactide/Glycolide Copolymer Particulates for Intra-Articular Delivery System on Phagocytosis in Rat Synovium. *Pharmaceutical Research* 19:132-139
104. Hudson A, Imamura T, Gutteridge W, Kanyok T, Nunn P (2003). The current anti-TB drug research and development pipeline (World Health Organization)
105. Huggan PJ, Wells JE, Browne M, Richardson A, Murdoch DR, Chambers ST (2010) Population-based epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection in Canterbury, New Zealand. *Internal Medicine Journal* 40:117-125
106. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL (2011) Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology* 162:1239-1249
107. Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-236
108. Hurdle Julian G, Yendapally R, Sun D, Lee Richard E (2009) Evaluation of Analogs of Reutericyclin as Prospective Candidates for Treatment of Staphylococcal Skin Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53:4028-4031
109. Jackson N, Czaplowski L, Piddock LJV (2018) Discovery and development of new antibacterial drugs: learning from experience? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73:1452-1459
110. Jacobi J, Jang JJ, Sundram U, Dayoub H, Fajardo LF, Cooke JP (2002) Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. *The American journal of pathology* 161:97-104
111. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini Ed, Secor P, Sestrich J, Costerton JW, Stewart PS (2008) Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration* 16:37-44
112. Johnson KE, Wilgus TA (2014). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. In *Adv Wound Care* (New Rochelle), pp. 647-661.
113. Junker S, Maaß S, Otto A, Michalik S, Morgenroth F, Gerth U, Hecker M, Becher D (2018) Spectral Library Based Analysis of Arginine Phosphorylations in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Proteomics* 17:335-348
114. Junker S, Maaß S, Otto A, Hecker M, Becher D (2019) Toward the Quantitative Characterization of Arginine Phosphorylations in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Proteome Research* 18:265-279
115. Jyotshna K, Elvis C, Syed FAaMGP (2014) Zebrafish Model in Drug Safety Assessment. *Current Pharmaceutical Design* 20:5416-5429
116. Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S (2015) PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Ther Deliv* 6:41-58
117. Kerbel RS (1998) What is the optimal rodent model for anti-tumor drug testing? *Cancer Metastasis Rev* 17:301-304
118. Kerwat K, Graf J, Wulf H (2010) Krankenhaushygiene – Nosokomiale Infektionen. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 45:30-31

119. Khan SR, Deutscher J, Vishwakarma RA, Monedero V, Bhatnagar NB (2001) The ptsH gene from *Bacillus thuringiensis israelensis*. Characterization of a new phosphorylation site on the protein HPr. *Eur J Biochem* 268:521-530
120. Kim C, Mwangi M, Chung M, Milheiriço C, Lencastre H, Tomasz A (2014) The Mechanism of Heterogeneous Beta-Lactam Resistance in MRSA: Key Role of the Stringent Stress Response. *PLoS one* 9
121. Kramer A, Schwebke I, Kampf G (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases* 6:1-8
122. Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, Maciag-Gudowska A, Brix K, Shaw L, Foster T, Potempa J (2008) A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 3:e1409
123. Kugelberg E, Norström T, Petersen TK, Duvold T, Andersson DI, Hughes D (2005) Establishment of a Superficial Skin Infection Model in Mice by Using *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:3435
124. Landwirtschaft BfEu (2021). Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2019 (BMEL - Tierschutz - Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2019)
125. Langer RS, Peppas NA (1981) Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials* 2:201-214
126. Lauffer F, Eyerich K, Boehncke W-H, Asadullah K, Beissert S, Ghoreschi K, Schön MP (2020) Zytokine der IL-17-Familie bei der Psoriasis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 18:675-681
127. Laupland KB, Lyytikäinen O, Søgaaard M, Kennedy KJ, Knudsen JD, Ostergaard C, Galbraith JC, Valiquette L, Jacobsson G, Collignon P, Schønheyder HC (2013) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clin Microbiol Infect* 19:465-471
128. Leiba J, Hartmann T, Cluzel ME, Cohen-Gonsaud M, Delolme F, Bischoff M, Molle V (2012) A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation. *J Biol Chem* 287:43607-43619
129. Lenz A, Karg E, Lentner B, Dittrich V, Brandenberger C, Rothen-Rutishauser B, Schulz H, Ferron G, Schmid O (2009) A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology* 6:32
130. 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
131. Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8:353-367
132. Linder C, Davisson M (2012). Historical Foundations. In, pp. 21-35.
133. Lindholm C, Searle R (2016) Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *Int Wound J* 13 Suppl 2:5-15
134. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, Kaplan SL, Karchmer AW, Levine DP, Murray BE, M JR, Talan DA, Chambers HF (2011) Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis* 52:e18-55
135. 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. *Journal of Bacteriology* 187:7826
136. Lori G, Paoli P, Caselli A, Cirri P, Marzocchini R, Mangoni M, Talamonti C, Livi L, Raugei G (2018) Targeting LMW-PTP to sensitize melanoma cancer cells toward chemo- and radiotherapy. *Cancer medicine* 7:1933-1943
137. Lori G, Paoli P, Femia AP, Pranzini E, Caselli A, Tortora K, Romagnoli A, Raugei G, Caderni G (2019) Morin-dependent inhibition of low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) restores sensitivity to apoptosis during colon carcinogenesis: Studies in vitro and in vivo, in an Apc-driven model of colon cancer. *Molecular Carcinogenesis* 58:686-698
138. Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-532

139. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 178:175-183
140. Mak S, Xu Y, Nodwell JR (2014) The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria. *Molecular Microbiology* 93:391-402
141. Mandakhalikar KD, Rahmat JN, Chiong E, Neoh KG, Shen L, Tambyah PA (2018) Extraction and quantification of biofilm bacteria: Method optimized for urinary catheters. *Scientific Reports* 8:8069
142. Mandal SM, Ghosh AK, Pati BR (2015) Dissemination of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S aureus* strains isolated from hospital effluents. *Am J Infect Control* 43:e87-88
143. Mariani R, Maffioli SI (2009) Bacterial RNA polymerase inhibitors: an organized overview of their structure, derivatives, biological activity and current clinical development status. *Curr Med Chem* 16:430-454
144. Mathew R, Chatterji D (2006) The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends in Microbiology* 14:450-455
145. Matthews H, Hanison J, Nirmalan N (2016) "Omics"-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives. *Proteomes* 4:28
146. Mayon-White RT, Duce G, Kereselidze T, Tikomirov E (1988) An international survey of the prevalence of hospital-acquired infection. *Journal of Hospital Infection* 11:43-48
147. McCaig LF, McDonald LC, Mandal S, Jernigan DB (2006) *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. *Emerging infectious diseases* 12:1715-1723
148. McClure WR, Cech CL (1978) On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 253:8949-8956
149. McGrath J, Solter D (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37:179-183
150. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR (2017) Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale journal of biology and medicine* 90:269-281
151. Meadow ND, Mattoo RL, Savtchenko RS, Roseman S (2005) Transient state kinetics of Enzyme I of the phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system of *Escherichia coli*: equilibrium and second-order rate constants for the phosphotransfer reactions with phosphoenolpyruvate and HPr. *Biochemistry* 44:12790-12796
152. Mehta Y, Jaggi N, Rosenthal VD, Kavathekar M, Sakle A, Munshi N, Chakravarthy M, Todi SK, Saini N, Rodrigues C, Varma K, Dubey R, Kazi MM, Udewadia FE, Myatra SN, Shah S, Dwivedy A, Karlekar A, Singh S, Sen N, Limaye-Joshi K, Ramachandran B, Sahu S, Pandya N, Mathur P, Sahu S, Singh SP, Bilolikar AK, Kumar S, Mehta P, Padbidri V, Gita N, Patnaik SK, Francis T, Warriar AR, Muralidharan S, Nair PK, Subhedar VR, Gopinath R, Azim A, Sood S (2016) Device-Associated Infection Rates in 20 Cities of India, Data Summary for 2004–2013: Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 37:172-181
153. Mestas J, Hughes CC (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172:2731-2738
154. Minic Z (2015) Proteomic studies of the effects of different stress conditions on central carbon metabolism in microorganisms. *J Proteomics Bioinform* 8:80-90
155. Mir M, Ahmed N, Rehman AU (2017) Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces* 159:217-231
156. Montanaro L, Poggi A, Visai L, Ravaioli S, Campoccia D, Speziale P, Arciola CR (2011) Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs* 34:824-831
157. Moormeier DE, Bayles KW (2017) *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular microbiology* 104:365-376
158. Morona JK, Paton JC, Miller DC, Morona R (2000) Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 35:1431-1442
159. Morris AK, Russell CD (2016) Enhanced surveillance of *Staphylococcus aureus* bacteraemia to identify targets for infection prevention. *Journal of Hospital Infection* 93:169-174

160. Morse HC (1981) The laboratory mouse-a historical perspective. *The mouse in biomedical research*:1-16
161. Mukherjee S, Dhar R, Das AK (2009) Analyzing the catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatase PtpB from *Staphylococcus aureus* through site-directed mutagenesis. *Int J Biol Macromol* 45:463-469
162. Murima P, McKinney John D, Pethe K (2014) Targeting Bacterial Central Metabolism for Drug Development. *Chemistry & Biology* 21:1423-1432
163. Nelson CL (1979) Environmental bacteriology in the unidirectional (horizontal) operating room. *Arch Surg* 114:778-782
164. Nir-Paz R, Eugster MR, Zeiman E, Loessner MJ, Calendar R (2012) *Listeria monocytogenes* tyrosine phosphatases affect wall teichoic acid composition and phage resistance. *FEMS Microbiol Lett* 326:151-160
165. NNIS (1999) National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. A report from the NNIS System. *Am J Infect Control* 27:520-532
166. Novick RP (1990). The staphylococcus as a molecular genetic system. In *Molecular biology of the staphylococci*, Novick RP, ed. (New York, VHC), pp. 1-37.
167. Oakes JA, Wood AJJ (1986) Infections in surgery. *N Engl J Med* 315:1129-1138
168. Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM (2006) Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 57:450-460
169. Oufrid S, Ghazlane Z, Jamali L, El Otmani F, Talmi M, Elmdaghri N, Zerouali K, Timinouni M (2015) Correlation between staphylococcal biofilm formation in vitro and potential for catheter-related infections. *J Infect Dev Ctries* 9:368-372
170. Paharik AE, Horswill AR (2016) The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiology spectrum* 4:10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015
171. Park SO, Wankhede M, Lee YJ, Choi EJ, Fliess N, Choe SW, Oh SH, Walter G, Raizada MK, Sorg BS, Oh SP (2009) Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 119:3487-3496
172. Parker J (2001). RNA Polymerase. In *Encyclopedia of Genetics*, Brenner S, JH Miller, eds. (New York, Academic Press), pp. 1746-1747.
173. Pätzold L, Brausch AC, Bielefeld EL, Zimmer L, Somerville GA, Bischoff M, Gaupp R (2021a) Impact of the Histidine-Containing Phosphocarrier Protein HPr on Carbon Metabolism and Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms* 9
174. Pätzold L, Stark A, Ritzmann F, Meier C, Tschernig T, Reichrath J, Bals R, Bischoff M, Beisswenger C (2021b) IL-17C and IL-17RE Promote Wound Closure in a *Staphylococcus aureus*-Based Murine Wound Infection Model. *Microorganisms* 9
175. Peleg A, Shifrin Y, Ilan O, Nadler-Yona C, Nov S, Koby S, Baruch K, Altuvia S, Elgrably-Weiss M, Abe CM, Knutton S, Saper MA, Rosenshine I (2005) Identification of an *Escherichia coli* operon required for formation of the O-antigen capsule. *J Bacteriol* 187:5259-5266
176. Pereira SF, Goss L, Dworkin J (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 75:192-212
177. Pérez-Pérez GI, Shepherd VL, Morrow JD, Blaser MJ (1995) Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infection and Immunity* 63:1183-1187
178. Piroth L, Que YA, Widmer E, Panchaud A, Piu S, Entenza JM, Moreillon P (2008) The fibrinogen- and fibronectin-binding domains of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A synergistically promote endothelial invasion and experimental endocarditis. *Infect Immun* 76:3824-3831
179. Pittet D, Allegranzi B, Sax H, Dharan S, Pessoa-Silva CL, Donaldson L, Boyce JM (2006) Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *The Lancet Infectious Diseases* 6:641-652
180. Plough HH (1945) Penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and its clinical implications. *Am J Clin Pathol* 15:446-451
181. Podolsky SH (2015) *The antibiotic era: reform, resistance, and the pursuit of a rational therapeutics*, JHU Press).

182. Pollitt EJG, Szkuta PT, Burns N, Foster SJ (2018) Staphylococcus aureus infection dynamics. *PLOS Pathogens* 14:e1007112
183. Que YA, Haefliger JA, Piroth L, François P, Widmer E, Entenza JM, Sinha B, Herrmann M, Francioli P, Vaudaux P, Moreillon P (2005) Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in Staphylococcus aureus experimental endocarditis. *J Exp Med* 201:1627-1635
184. Rabussay D, Zillig W (1969) A rifampicin resistant rna-polymerase from E. coli altered in the beta-subunit. *FEBS Lett* 5:104-106
185. Radovic-Moreno AF, Lu TK, Puscasu VA, Yoon CJ, Langer R, Farokhzad OC (2012) Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. *ACS nano* 6:4279-4287
186. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J, Hackney J, Kim J, Zhou M, Lai J, Modrusan Z, Sai T, Lee W, Xu M, Caplazi P, Diehl L, de Voss J, Balazs M, Gonzalez L, Jr., Singh H, Ouyang W, Pappu R (2011) IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat Immunol* 12:1159-1166
187. Ratner BD, Horbett T, Hoffman AS, Hauschka SD (1975) Cell adhesion to polymeric materials: implications with respect to biocompatibility. *J Biomed Mater Res* 9:407-422
188. Ribeiro GM, Matsumoto CK, Real F, Teixeira D, Duarte RS, Mortara RA, Leao SC, de Souza Carvalho-Wodarz C (2017) Increased survival and proliferation of the epidemic strain Mycobacterium abscessus subsp. massiliense CRM0019 in alveolar epithelial cells. *BMC Microbiol* 17:195
189. Rice LB (2008) Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases* 197:1079-1081
190. Risso A (2000) Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *Journal of leukocyte biology* 68:785-792
191. Riva S, Silvestri LG (1972) Rifamycins: a general view. *Annu Rev Microbiol* 26:199-224
192. Robert K-I (2016). Regionale Verteilung des Anteils von MRSA und VRE bei nosokomialen Infektionen mit S. aureus und Enterokokken (Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung)
193. Robert K-I (2020). Infektionsepidemiologische Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019 (Robert Koch-Institut)
194. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC (2018) Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews* 99:665-706
195. Römling U, Balsalobre C (2012) Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine* 272:541-561
196. Rosenthal VD, Maki DG, Graves N (2008) The International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC): Goals and objectives, description of surveillance methods, and operational activities. *American Journal of Infection Control* 36:e1-e12
197. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D (1999) Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of Staphylococcus epidermidis in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun* 67:2627-2632
198. Russell ES (1978) Origins and history of mouse inbred strains: contributions of Clarence Cook Little. *Origins of Inbred Mice*, Morse, HC, eds(Academic Press, NY):33-43
199. Safdar N, Maki DG (2002) The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant Staphylococcus aureus, enterococcus, gram-negative bacilli, Clostridium difficile, and Candida. *Ann Intern Med* 136:834-844
200. Saier MH, Jr. (2015) The Bacterial Phosphotransferase System: New Frontiers 50 Years after Its Discovery. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 25:73-78
201. Sajid A, Arora G, Singhal A, Kalia VC, Singh Y (2015) Protein Phosphatases of Pathogenic Bacteria: Role in Physiology and Virulence. *Annu Rev Microbiol* 69:527-547
202. Salgado-Pabon W, Schlievert PM (2014) Models matter: the search for an effective Staphylococcus aureus vaccine. *Nat Rev Micro* 12:585-591
203. Sanseverino I, Navarro A, Loos R, Marinov D, Lettieri T (2018) State of the Art on the Contribution of Water to Antimicrobial Resistance).

204. Schaal KP (1991) Medical and microbiological problems arising from airborne infection in hospitals. *Journal of Hospital Infection* 18:451-459
205. Schierholz JM, Beuth J (2001) Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *Journal of Hospital Infection* 49:87-93
206. Schierle CF, De la Garza M, Mustoe TA, Galiano RD (2009) Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair and Regeneration* 17:354-359
207. 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
208. Seidl K, Bischoff M, Berger-Bächi B (2008a) CcpA mediates the catabolite repression of *tst* in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 76:5093-5099
209. Seidl K, Goerke C, Wolz C, Mack D, Berger-Bächi B, Bischoff M (2008b) *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect Immun* 76:2044-2050
210. Seidl K, Müller S, François P, Kriebitzsch C, Schrenzel J, Engelmann S, Bischoff M, Berger-Bächi B (2009). Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus*. In *BMC microbiology*, pp. 95
211. Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF, Backert S (2003) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo j* 22:515-528
212. Serra R, Grande R, Butrico L, Rossi A, Settimio UF, Caroleo B, Amato B, Gallelli L, de Francis S (2015) Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13:605-613
213. Serra R, Grande R, Buffone G, Molinari V, Perri P, Perri A, Amato B, Colosimo M, de Francis S (2016) Extracellular matrix assessment of infected chronic venous leg ulcers: role of metalloproteinases and inflammatory cytokines. *Int Wound J* 13:53-58
214. Shariati A, Dadashi M, Chegini Z, van Belkum A, Mirzaii M, Khoramrooz SS, Darban-Sarokhalil D (2020) The global prevalence of Daptomycin, Tigecycline, Quinupristin/Dalfopristin, and Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci strains: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial resistance and infection control* 9:56-56
215. Shin JT, Fishman MC (2002) From Zebrafish to human: modular medical models. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:311-340
216. Singh S, Malik BK, Sharma DK (2006) Molecular drug targets and structure based drug design: A holistic approach. *Bioinformation* 1:314-320
217. Singleton GR, Krebs CJ (2007). The secret world of wild mice. *The Mouse in Biomedical Research*, 1, 25-51 (Elsevier, New York)
218. Somerville GA, Proctor RA (2009) At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 73:233-248
219. Song X, Zhu S, Shi P, Liu Y, Shi Y, Levin SD, Qian Y (2011) IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nat Immunol* 12:1151-1158
220. Sorrell TC, Packham DR, Shanker S, Foldes M, Munro R (1982) Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 97:344-350
221. Soulat D, Vaganay E, Duclos B, Genestier AL, Etienne J, Cozzone AJ (2002) *Staphylococcus aureus* contains two low-molecular-mass phosphotyrosine protein phosphatases. *J Bacteriol* 184:5194-5199
222. Speziale P, Pietrocola G, Foster TJ, Geoghegan JA (2014) Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4:171-171
223. Strong LC (1978) Inbred mice in science. *Origins of Inbred Mice*, Morse, HC, eds(Academic Press, New York):45-67
224. Su XD, Taddei N, Stefani M, Ramponi G, Nordlund P (1994) The crystal structure of a low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase. *Nature* 370:575-578
225. Takeo M, Lee W, Ito M (2015) Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5:a023267

226. Tam K, Torres VJ (2019) Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiology spectrum* 7:10.1128/microbiolspec.GPP1123-0039-2018
227. Theuretzbacher U, Outterson K, Engel A, Karlén A (2020) The global preclinical antibacterial pipeline. *Nature Reviews Microbiology* 18:275-285
228. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. (2015) Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 28:603-661
229. Toye AA, Moir L, Hugill A, Bentley L, Quarterman J, Mijat V, Hough T, Goldsworthy M, Haynes A, Hunter AJ, Browne M, Spurr N, Cox RD (2004) A new mouse model of type 2 diabetes, produced by N-ethyl-nitrosourea mutagenesis, is the result of a missense mutation in the glucokinase gene. *Diabetes* 53:1577-1583
230. Ulrich M, Herbert S, Berger J, Bellon G, Louis D, Munker G, Döring G (1998) Localization of Staphylococcus aureus in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of S. aureus adherence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:83-91
231. van Belkum A, Verkaik Nelianne J, de Vogel Corné P, Boelens Hélène A, Verveer J, Nouwen Jan L, Verbrugh Henri A, Wertheim Heiman FL (2009) Reclassification of Staphylococcus aureus Nasal Carriage Types. *The Journal of Infectious Diseases* 199:1820-1826
232. Vandeghinste N, Klattig J, Jagerschmidt C, Lavazais S, Marsais F, Haas JD, Auberval M, Lauffer F, Moran T, Ongenaert M, Van Balen M, Dupont S, Lepescheux L, Garcia T, Härtle S, Eyerich K, Fallon PG, Brys R, Steidl S (2018) Neutralization of IL-17C Reduces Skin Inflammation in Mouse Models of Psoriasis and Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 138:1555-1563
233. Vega C, Chou S, Engel K, Harrell ME, Rajagopal L, Grundner C (2011) Structure and substrate recognition of the Staphylococcus aureus protein tyrosine phosphatase PtpA. *J Mol Biol* 413:24-31
234. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V (2009) The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 37:1528-1542
235. Verdijk P, Scheenen TWJ, Lesterhuis WJ, Gambarota G, Veltien AA, Walczak P, Scharenborg NM, Bulte JWM, Punt CJA, Heerschap A, Figdor CG, M. de Vries IJ (2007) Sensitivity of magnetic resonance imaging of dendritic cells for in vivo tracking of cellular cancer vaccines. *International Journal of Cancer* 120:978-984
236. Vitko NP, Grosser MR, Khatri D, Lance TR, Richardson AR (2016) Expanded Glucose Import Capability Affords Staphylococcus aureus Optimized Glycolytic Flux during Infection. *mBio* 7
237. Vrijens F, Hulstaert F, Van de Sande S, Devriese S, Morales I, Parmentier Y (2010) Hospital-acquired, laboratory-confirmed bloodstream infections: linking national surveillance data to clinical and financial hospital data to estimate increased length of stay and healthcare costs. *Journal of Hospital Infection* 75:158-162
238. Wang T, Feng Y, Sun H, Zhang L, Hao L, Shi C, Wang J, Li R, Ran X, Su Y, Zou Z (2012) miR-21 Regulates Skin Wound Healing by Targeting Multiple Aspects of the Healing Process. *The American Journal of Pathology* 181:1911-1920
239. Wang T, Ouzounov DG, Wu C, Horton NG, Zhang B, Wu C-H, Zhang Y, Schnitzer MJ, Xu C (2018) Three-photon imaging of mouse brain structure and function through the intact skull. *Nature Methods* 15:789-792
240. 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, Eyraas 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, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, 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
241. Wehrli W (1983) Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. *Reviews of Infectious Diseases* 5:S407-S411
242. 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. In *Lancet Infect Dis (United States)*, pp. 751-762.
243. Wilkinson BJ (1997). Biology. In *The staphylococci in human diseases*, Crossley KB, GL Archer, eds. (New York, Churchill Livingstone), pp. 1-38.
244. Wilkinson HN, Hardman MJ Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology* 10:200223
245. Wilkinson HN, Hardman MJ (2020) Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology* 10:200223
246. Wong D, Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y (2011a) Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:19371-19376
247. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC (2011b) Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011:969618-969618
248. World Health Organization (WHO) (2011) Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide (Geneva, World Health Organization).
249. Xia J, Gao J, Kokudo N, Hasegawa K, Tang W (2013) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* antibiotic resistance and virulence. *BioScience Trends* 7:113-121
250. Xie S, Tao Y, Pan Y, Qu W, Cheng G, Huang L, Chen D, Wang X, Liu Z, Yuan Z (2014) Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents. *J Control Release* 187:101-117
251. Yuan M, Deleuil F, Fallman M (2005) Interaction between the *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH and its macrophage substrate, Fyn-binding protein, Fyb. *J Mol Microbiol Biotechnol* 9:214-223
252. Zecconi A, Scali F (2013) *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology Letters* 150:12-22
253. Zhen X, Lundborg CS, Sun X, Hu X, Dong H (2019) Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: a systematic review. *Antimicrob Resist Infect Control* 8:137
254. Zingg W, Holmes A, Dettenkofer M, Goetting T, Secci F, Clack L, Allegranzi B, Magiorakos A-P, Pittet D (2015) Hospital organisation, management, and structure for prevention of health-care-associated infection: a systematic review and expert consensus. *The Lancet Infectious Diseases* 15:212-224
255. Zuckerman JM, Qamar F, Bono BR (2011) Review of Macrolides (Azithromycin, Clarithromycin), Ketolids (Telithromycin) and Glycylcyclines (Tigecycline). *Medical Clinics of North America* 95:761-791

# Anhang – Publikationen

## Publikation A - Impact of the Histidine-Containing Phosphocarrier Protein HPr on Carbon Metabolism and Virulence in *Staphylococcus aureus*

**Authors:** Linda Pätzold <sup>1</sup>, Anne-Christine Brausch <sup>1</sup>, Evelyn-Laura Bielefeld <sup>1</sup>, Lisa Zimmer <sup>1</sup>, Greg A. Somerville <sup>2</sup>, Markus Bischoff <sup>1,\*</sup> and Rosmarie Gaupp <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Saarland University, D-66421 Homburg, Germany

<sup>2</sup> School of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, University of Nebraska, Lincoln, NE 68588, USA

\* Correspondence: markus.bischoff@uks.eu; Tel.: +49-6841-162-39-63

**Abstract:** Carbon catabolite repression (CCR) is a common mechanism pathogenic bacteria use to link central metabolism with virulence factor synthesis. In gram-positive bacteria, catabolite control protein A (CcpA) and the histidine-containing phosphocarrier protein HPr (encoded by *ptsH*) are the predominant mediators of CCR. In addition to modulating CcpA activity, HPr is essential for glucose import via the phosphotransferase system. While the regulatory functions of CcpA in *Staphylococcus aureus* are largely known, little is known about the function of HPr in CCR and infectivity. To address this knowledge gap, *ptsH* mutants were created in *S. aureus* that either lack the open reading frame or harbor a *ptsH* variant carrying a thymidine to guanosine mutation at position 136, and the effects of these mutations on growth and metabolism were assessed. Inactivation of *ptsH* altered bacterial physiology and decreased the ability of *S. aureus* to form a biofilm and cause infections in mice. These data demonstrate that HPr affects central metabolism and virulence in *S. aureus* independent of its influence on CcpA regulation.

Reprint with kind permission of Microorganisms (MDPI).

*Microorganisms*. 2021 Feb 24;9(3):466.

DOI: 10.3390/microorganisms9030466



## Article

# Impact of the Histidine-Containing Phosphocarrier Protein HPr on Carbon Metabolism and Virulence in *Staphylococcus aureus*

Linda Pätzold <sup>1</sup>, Anne-Christine Brausch <sup>1</sup>, Evelyn-Laura Bielefeld <sup>1</sup>, Lisa Zimmer <sup>1</sup>, Greg A. Somerville <sup>2</sup>, Markus Bischoff <sup>1,\*</sup> and Rosmarie Gaupp <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Saarland University, D-66421 Homburg, Germany; Linda.Paetzold@uks.eu (L.P.); anne-christine.brausch@web.de (A.-C.B.); evelyn\_kirch@yahoo.de (E.-L.B.); zimmer.lisa@yahoo.de (L.Z.); rosmariegaupp@gmail.com (R.G.)

<sup>2</sup> School of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, University of Nebraska, Lincoln, NE 68588, USA; gsomerville3@unl.edu

\* Correspondence: markus.bischoff@uks.eu; Tel.: +49-6841-162-39-63

**Abstract:** Carbon catabolite repression (CCR) is a common mechanism pathogenic bacteria use to link central metabolism with virulence factor synthesis. In gram-positive bacteria, catabolite control protein A (CcpA) and the histidine-containing phosphocarrier protein HPr (encoded by *ptsH*) are the predominant mediators of CCR. In addition to modulating CcpA activity, HPr is essential for glucose import via the phosphotransferase system. While the regulatory functions of CcpA in *Staphylococcus aureus* are largely known, little is known about the function of HPr in CCR and infectivity. To address this knowledge gap, *ptsH* mutants were created in *S. aureus* that either lack the open reading frame or harbor a *ptsH* variant carrying a thymidine to guanosine mutation at position 136, and the effects of these mutations on growth and metabolism were assessed. Inactivation of *ptsH* altered bacterial physiology and decreased the ability of *S. aureus* to form a biofilm and cause infections in mice. These data demonstrate that HPr affects central metabolism and virulence in *S. aureus* independent of its influence on CcpA regulation.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; physiology; metabolism; carbon catabolite repression; CcpA; HPr



**Citation:** Pätzold, L.; Brausch, A.-C.; Bielefeld, E.-L.; Zimmer, L.; Somerville, G.A.; Bischoff, M.; Gaupp, R. Impact of the Histidine-Containing Phosphocarrier Protein HPr on Carbon Metabolism and Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms* **2021**, *9*, 466. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030466>

Academic Editor: Rajan P. Adhikari

Received: 7 February 2021

Accepted: 19 February 2021

Published: 24 February 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Carbon catabolite repression (CCR) is a common regulatory mechanism of bacteria to coordinate central metabolism with available carbon source(s) [1]. By modulating transcription of genes encoding proteins involved in the import and catabolism of carbon metabolites, bacterial CCR facilitates the efficient use of available carbon sources [1]. In pathogenic bacteria, regulators of CCR often affect transcription of virulence factors that are important for the exploitation of host-derived nutrient sources [2].

*Staphylococcus aureus* is a gram-positive opportunistic pathogen and a frequent cause of nosocomial infections in which central metabolism and infectivity are linked by numerous regulatory factors, including the catabolite control proteins A (CcpA) and E (CcpE), CodY, Rex, RpiRc, and SrrAB [3]. CcpA, a member of the GalR-LacI repressor family [4], is thought to be the major factor regulating CCR in *S. aureus* by binding catabolite-responsive element (*cre*) sequences of target genes [5]. Depending on the *cre* sequence location in the promoter region, the binding of CcpA results in either activation or repression of transcription [6]. Studies using *Bacillus megaterium* and *Streptococcus pyogenes* demonstrated that the binding affinity of CcpA for *cre* sites is low, but can be increased drastically by complex formation with the histidine-containing phosphocarrier protein (HPr), encoded by *ptsH* [7,8]. Electrophoretic mobility shift assays suggest this is also true in *S. aureus* [6], although CcpA can also bind to *cre* sites in the absence of HPr [9]. Activity of HPr is dependent on at least two phosphorylation sites, namely amino acids histidine 15 (His-15) and serine 46 (Ser-46) [1]. For complex formation with CcpA, HPr must be phosphorylated

on Ser-46 [7]. This ATP-requiring process is catalyzed by the HPr-kinase/phosphorylase (HPrK/P), which is regulated in a dose-dependent manner by the glycolytic intermediate fructose-1,6-bisphosphate (FBP) [10]. For this reason, the amount of Ser-46 phosphorylated HPr (P-Ser-HPr) is closely connected with glycolytic activity of the cell and the uptake of sugars. Sugar uptake in bacteria is predominantly mediated by the phosphotransferase system (PTS), consisting of three main components: HPr, enzyme I (EI), and enzyme II (EII) [11]. In a first step, HPr is phosphorylated at His-15 (P-His-HPr) by E1, using the glycolytic intermediate phosphoenolpyruvate as the phosphate donor. The phosphate group is transferred to the substrate by EII, which translocates and phosphorylates the sugar into the cell at the same time. Activated glucose, namely glucose 6-phosphate, then enters glycolysis [12]; hence, HPr connects glycolytic activity with CCR via its dual role in sugar uptake through the PTS and as an activator of CcpA [13,14].

Numerous genes have been identified to be regulated on the transcriptional level by CcpA in *S. aureus* [15–17]. In addition to genes/operons involved in carbon catabolism, the synthesis of factors associated with biofilm formation and virulence of *S. aureus* are also influenced by CcpA [6,15–21]. Specifically, CcpA promotes transcription of the *ica*-operon and *cidA* [19], encoding proteins needed for polysaccharide intercellular adhesion (PIA) synthesis and extracellular DNA release, respectively [22,23]. These observations are consistent with the fact that deletion of *ccpA* abrogates biofilm formation under glucose-rich conditions. [19]. Furthermore, inactivation of *ccpA* in *S. aureus* reduces the formation of liver and skin abscesses in mouse models of infection [6,24,25]. Taken together, these observations demonstrate the linkage between CcpA, glucose catabolism, and virulence in *S. aureus*; however, the function of HPr remains largely unknown. Here, we characterize the function of HPr of *S. aureus* in the context of carbon metabolism, growth kinetics, biofilm formation, and in vivo infectivity in different murine infection models.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bacterial Strains and Plasmids

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. All mutant strains generated for this study were confirmed by sequencing of the affected region, and by assessing gene transcription by quantitative real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR).

**Table 1.** Strains and plasmids used in this study.

Strain	Description <sup>1</sup>	Reference or Source
<b><i>S. aureus</i></b>		
Newman	Mouse pathogenic laboratory strain (ATCC 25904)	[30]
RN4220	NCTC8325-4 derivative, acceptor of foreign DNA	[31]
SA113	PIA-dependent biofilm producer (ATCC 35556), <i>agr rsbU</i>	[32]
Nm <i>ccpA</i>	MST14; Newman $\Delta$ <i>ccpA::tet(L)</i> ; Tc <sup>R</sup>	[15]
Nm <i>ptsH</i>	Newman $\Delta$ <i>ptsH::lox72</i>	This study
Nm <i>ptsH-aph</i>	Newman $\Delta$ <i>ptsH::lox66-aphIII-lox71</i> ; Kan <sup>R</sup>	This study
Nm <i>ptsH::ptsH</i>	Newman $\Delta$ <i>ptsH::pBT ptsH</i> ; Tc <sup>R</sup>	This study
Nm <i>ptsH*</i>	Newman $\Delta$ <i>ptsH::lox72 pBTptsH*</i> ; Tc <sup>R</sup>	This study
Nm <i>ccpA_ptsH</i>	Newman $\Delta$ <i>ccpA::tet(L) \Delta<i>ptsH::lox72</i>; Tc<sup>R</sup></i>	This study
RN4220 <i>ptsH</i>	RN4220 $\Delta$ <i>ptsH::lox72</i>	This study
SA113 <i>ccpA</i>	KS66; SA113 $\Delta$ <i>ccpA::tet(L)</i> ; Tc <sup>R</sup>	[19]
SA113 <i>ptsH</i>	SA113 $\Delta$ <i>ptsH::lox72</i>	This study
SA113 <i>ptsH::ptsH</i>	SA113 $\Delta$ <i>ptsH::pBT ptsH</i> ; Tc <sup>R</sup>	This study
SA113 <i>ptsH*</i>	SA113 $\Delta$ <i>ptsH::lox72 pBTptsH*</i> ; Tc <sup>R</sup>	This study
SA113 <i>ccpA_ptsH</i>	SA113 $\Delta$ <i>ccpA::tet(L) \Delta<i>ptsH::lox72</i>; Tc<sup>R</sup></i>	This study
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	Cloning strain	Invitrogen
DC10B	$\Delta$ <i>dcm</i> in the DH10B background; Dam methylation only	[28]

Table 1. Cont.

Strain	Description <sup>1</sup>	Reference or Source
<b>Plasmids</b>		
pBT	<i>S. aureus</i> suicide plasmid; <i>tet(L)</i>	[27]
pBT <i>lox-aph</i>	pBT derivative harboring <i>lox66-aphAIII-lox71</i> ; <i>tet(L)</i> , <i>aphIII</i>	[26]
pRAB1	Temperature sensitive <i>E. coli-S. aureus</i> shuttle plasmid, expression of <i>cre</i> in staphylococci; <i>cat</i> , <i>bla</i>	[29]
pBT ' <i>ptsI</i>	pBT derivative harboring a C-terminal <i>ptsI</i> fragment; <i>tet(L)</i>	This study
pBT <i>ptsH1</i>	pBT derivative harboring a T136G <i>ptsH</i> variant; <i>tet(L)</i>	This study
pBT <i>ptsH</i> KO	pBT derivative harboring the genomic regions flanking <i>ptsH</i> and <i>lox66-aphAIII-lox71</i> of pBT <i>lox-aph</i> ; <i>aphIII</i> , <i>tet(L)</i>	This study

<sup>1</sup> Kan<sup>R</sup>, kanamycin-resistant; PIA, polyintercellular adhesin; Tc<sup>R</sup>, tetracycline-resistant.

## 2.2. Bacterial Growth Conditions

*S. aureus* strains were grown in tryptic soy broth (TSB) containing 0.25% (*w/v*) glucose (BD, Heidelberg, Germany) or on TSB plates containing 1.5% agar (TSA). Antibiotics were only used for strain construction and phenotypic selection at the following concentrations: tetracycline, 2.5 µg/mL; erythromycin, 2.5 µg/mL; kanamycin, 15 µg/mL; and chloramphenicol, 10 µg/mL. Bacteria from overnight cultures were diluted in pre-warmed TSB to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.05. All bacterial cultures were incubated at 37 °C and 225 rpm with a flask-to-medium ratio of 10:1. Samples for determination of the OD<sub>600</sub>, pH, and metabolites were taken every hour. The growth rate ( $\mu$ ) of *S. aureus* strains was calculated by the formula  $(\ln OD_2 - \ln OD_1) / (t_2 - t_1)$ , with OD<sub>1</sub> and OD<sub>2</sub> being the OD calculated from the exponential growth phase at time *t*<sub>1</sub> and *t*<sub>2</sub>, respectively. The generation time of each strain was determined using the formula  $\ln 2 / \mu$ .

## 2.3. Mutant Construction

For the *S. aureus ptsH* deletion mutants, 1.4- and 1.1-kb fragments (nucleotides 1053472-1054838 and 1055049-1056169 of GenBank accession no. AP009351.1, respectively), containing the flanking regions of the *ptsH* open reading frame (ORF), were amplified by PCR from chromosomal DNA of *S. aureus* strain Newman using primer pairs MBH-94/MBH-112 and MBH-113/MBH-114, respectively (Supplementary Table S1). The PCR products were digested with KpnI/EcoRI and BamHI/XbaI, respectively, and cloned together with the EcoRI/BamHI-digested *lox66-aphAIII-lox71* resistance cassette obtained from pBT *lox-aph* [26] into KpnI/XbaI-digested suicide vector pBT [27] to generate plasmid pBT *ptsH* KO. Plasmid pBT *ptsH* KO was propagated in *E. coli* strain DC10B [28] and subsequently electroporated directly into *S. aureus* strain Newman to obtain strain Newman  $\Delta ptsH$ -*aph*, in which nucleotides 8 to 225 of the 267-bp spanning *ptsH* ORF were replaced by the *lox66-aphAIII-lox71* cassette by allelic replacement. The deletion of *ptsH* in Newman  $\Delta ptsH$ -*aph* was confirmed by PCR, and the strain was then used as a donor for transducing the *lox66-aphAIII-lox71* tagged *ptsH* deletion into *S. aureus* strains SA113 and RN4220. Resistance marker-free  $\Delta ptsH::lox72$  derivatives were constructed by treatment with a Cre recombinase expressed from the temperature-sensitive vector pRAB1 [29], which was subsequently removed from the *aphIII*-cured derivatives by culturing the strains at 42 °C.

For the *cis*-complementation of the  $\Delta ptsH::lox72$  mutants, a 1-kb fragment (nucleotides 1055996-1056973 of GenBank accession no. AP009351.1) of the C-terminal region of the *ptsI* ORF and the annotated terminator region of the *ptsHI* operon was amplified by primers MBH-427/MBH-428 (Supplementary Table S1), digested with EcoRI/KpnI and cloned into EcoRI/KpnI-digested suicide vector pBT [27] to generate plasmid pBT '*ptsI*'. The plasmid was electroporated into *S. aureus* strain RN4220, and a tetracycline-resistant RN4220 derivative that integrated pBT '*ptsI*' in its chromosome at the *ptsI* locus was used as donor to phage-transduce the *tet(L)*-tagged *ptsI* allele into Nm  $\Delta ptsH$  and SA113  $\Delta ptsH$ ,

respectively, thereby replacing the *ptsH*::lox72 deletion with the *ptsI*::pBT '*ptsI* genomic region containing a functional *ptsHI* operon.

For the construction of *S. aureus ptsH* variants harboring a T to G exchange of nucleotide 136 of the *ptsH* ORF (termed *ptsH\**), 0.6-kb and 1.1-kb fragments, containing either the promoter region of *ptsH* and the N-terminal part of the *ptsH* ORF (nucleotides 1054446-1054998 of GenBank accession no. AP009351.1) or the C-terminal part of the *ptsH* ORF and an N-terminal fragment of the *ptsI* ORF (nucleotides 1054976-1056121 of GenBank accession no. AP009351.1) were amplified by PCR from chromosomal DNA of *S. aureus* strain Newman using primer pairs MBH-484/MBH-485 and MBH-86/MBH-20, respectively (Supplementary Table S1). Primer MBH-484 contains a non-complementary base that introduces a point mutation in the PCR fragment leading to the T136G exchange of the *ptsH* ORF. Both PCR products were digested with StyI and subsequently ligated with T4 DNA-ligase. The ~1.7-kb ligation product was gel-purified, digested with KpnI/PstI, and cloned into KpnI/PstI-digested pBT to generate plasmid pBT *ptsH1* (Table 1). Presence of the T136G exchange in *ptsH\** harbored by plasmid pBT *ptsH1* was confirmed by sequencing, the plasmid propagated in *E. coli* strain DH5 $\alpha$ , electroporated into RN4220  $\Delta$ *ptsH*, and selected for tetracycline-resistance. A tetracycline-resistant RN4220 derivative that integrated pBT *ptsH1* at the *ptsHI* locus was used as donor to transduce the *tet*(L)-tagged *ptsH\** allele into the  $\Delta$ *ptsH* mutants.

*S. aureus* double mutants lacking *ptsH* and *ccpA* were created by transducing the *tet*(L)-tagged *ccpA* deletion of MST14 into  $\Delta$ *ptsH* derivatives.

#### 2.4. RNA Isolation and Purification, cDNA Synthesis and qRT-PCR

*S. aureus* strains were cultivated in TSB as described above. Bacterial pellets were collected after 2 h and 8 h of incubation by centrifugation at 5000 rpm at 4 °C for 5 min, and immediately suspended in 100  $\mu$ L ice-cold TE-buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). Bacteria were disrupted, total RNA isolated, transcribed into cDNA, and qRT-PCRs carried out as described previously [33] using the primers listed in Supplementary Table S1. Transcriptional levels of target genes were normalized against the mRNA concentration of housekeeping gene *gyrB* according to the  $2^{-\Delta\text{CT}}$  method.

#### 2.5. Measurement of pH, Glucose, Acetate, and Ammonium in Culture Supernatants

Aliquots (1.5 mL) of bacterial cultures were centrifuged for 2 min at 10,000 $\times$  *g*, and supernatants were removed, pH measured, and stored at  $-20$  °C until further use. Glucose, acetate, and ammonia concentrations were determined with kits purchased from R-Biopharm (Pfungstadt, Germany) and used according to the manufacturer's directions. The metabolite concentrations were measured from at least three independent experiments.

#### 2.6. Biofilm Assays

Biofilm formation under static conditions was assessed as described [19]. Briefly, overnight cultures were diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.05 in fresh TSB medium supplemented with glucose to a final concentration of 0.75 % (*w/v*), and 200  $\mu$ L of the cell suspension was used per well to inoculate sterile, flat-bottom 96-well polystyrene microtiter plates (BD). After incubation for 24 h at 37 °C without shaking, the plate wells were washed twice with phosphate-buffered saline (pH 7.2) and dried in an inverted position. Adherent cells were safranin-stained (30 sec with 0.1% safranin; Merck, Darmstadt, Germany) and the absorbance of stained biofilms was measured at 490 nm after resolving the stain with 100  $\mu$ L 30 % (*v/v*) acetic acid, using a microtiter plate reader (Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Rodgau, Germany).

Biofilm formation under flow conditions was performed as described [34], with minor modifications: Bacteria from overnight cultures were diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.05 in fresh TSB medium supplemented with glucose to a total concentration of 0.75% (*w/v*) and cultivated for 2 h at 37 °C with shaking at 150 rpm. Flow cells (Stovall Life Science) were filled with pre-warmed TSB medium supplemented with glucose to a total concentration of

0.75% (*w/v*), attached to a peristaltic pump (Ismatec REGLO Digital; Postnova, Landsberg am Lech, Germany) and inoculated with 0.5 mL of the bacterial cultures. Thirty minutes after inoculation, the flowrate was set to 0.5 mL/min and chamber. Biofilm formation was visually documented at different times.

For the assessment of biofilm formation on medical devices under dynamic conditions, peripheral venous catheter (PVC, Venflon Pro Safety 18 G; BD) fragments of 1 cm length were placed into reaction tubes filled with 1 mL of TSB and inoculated with  $5 \times 10^5$  CFU of TSB-washed bacterial cells obtained from exponential growth phase (inoculation of TSB from overnight cultures to an  $OD_{600}$  of 0.05 and incubation for 2.5 h at 37 °C and 225 rpm). The PVC fragments were incubated under non-nutrient limited conditions for five days at 37 °C and 150 rpm, and the media were replaced with fresh media every 24 h. PVC fragments were placed five days post inoculation into fresh reaction tubes filled with 1 mL of TSB, biofilms were detached from the catheter surface and resolved by sonification (50 watt for 5 min) followed by 1 min of vortexing. CFU rates and biomasses of resolved biofilms and culture supernatants at day five post inoculation were determined by plate counting and  $OD_{600}$  measurements, respectively.

### 2.7. Primary Attachment Assay on Polystyrene

The primary attachment of bacterial cells to polystyrene surfaces was performed as described [35], with minor modifications. Briefly, bacteria from the exponential growth phase (inoculation of TSB from overnight cultures to an  $OD_{600}$  of 0.05 and incubation for 2.5 h at 37 °C and 225 rpm) were diluted in TSB to 3000 CFU/mL. 100 µL of the bacterial inoculum was poured onto polystyrene petri dishes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and incubated under static conditions at 37 °C for 30 min. After incubation, petri dishes were rinsed gently three times with 5 mL of sterile PBS (pH 7.5), and subsequently covered with 15 mL of TSB containing 0.8% agar maintained at 48 °C. Plates were incubated at 37 °C for 24 h. Bacterial attachment to polystyrene was defined as the number of CFU remaining on the petri dish bottom after washing compared to the number of CFU remaining on the petri dish bottom without washing.

### 2.8. Animal Models

All animal experiments were performed with approval of the local State Review Board of Saarland, Germany (project identification codes 60/2015 [approved 21.12.2015], and 34/2017 [approved 09.11.2017]), and conducted following the national and European guidelines for the ethical and human treatment of animals. PBS-washed bacterial cells obtained from exponential growth phase cultures were used as inoculum.

For the murine abscess model, infection of animals was carried out as described [33], with minor modifications; specifically, 8- to 12- week-old female C57BL/6N mice (Charles River, Sulzfeld, Germany) were anesthetized by isoflurane inhalation (3.5%; Baxter, Unterschleißheim, Germany) and 100 µL bacterial suspension containing  $5 \times 10^7$  CFU were administered intravenously by retro bulbar injection. Immediately after infection, animals were treated with a single dose of carprofen (5 mg/kg; Zoetis, Berlin, Germany). Behavior and weight of mice was monitored daily, and four days post-infection, mice were sacrificed, and livers and kidneys were removed. The bacterial loads in liver and kidney tissues were determined by homogenization of weight-adjusted organs in PBS (pH 7.4), followed by serial dilutions on sheep blood agar plates and plate counting after 24 h incubation at 37 °C.

For the *S. aureus* based murine foreign body infection model, implantation of catheter fragments and infection of animals was carried out as described [36], with minor modifications: 8- to 12- week-old female C57BL/6N mice (Charles River) were anesthetized by intraperitoneal injection of 0.05 mg/kg body weight fentanyl (Hexal, Holzkirchen, Germany), 5 mg/kg midazolam (Hameln Pharma Plus, Hameln, Germany) and 0.5 mg/kg medetomidine (Orion Pharma, Hamburg, Germany). After treatment with a dose of carprofen (5 mg/kg, Zoetis), the animals were shaved with an animal trimmer (BBraun, Melsungen, Germany) and depilated with asid-med hair removal cream (Asid Bonz, Her-



renberg, Germany) on both flanks. The depilated skin was disinfected with ethanol (70%) and 1 cm catheter fragments (PVC, 14G, Sarstedt) were implanted subcutaneously and inoculated with  $1 \times 10^4$  CFU of the respective *S. aureus* strains. Wounds were closed with staples (Fine Science Tools, Heidelberg, Germany) and anesthesia was antagonized with 1.2 mg/kg body weight naloxone (Inresa, Freiburg im Breisgau, Germany), 0.5 mg/kg flumazenil (Inresa) and 2.5 mg/kg atipamezole (Orion Pharma). Behavior and weight of the animals was monitored daily. Ten days post infection, animals were sacrificed, edema sizes were measured and photo documented, and catheter fragments with surrounding tissue were harvested for microbial analyses. Excised tissues were homogenized in 1 mL TSB with a hand disperser (POLYTRON PT 1200 E; Kinematica, Eschbach, Germany), and biofilms were detached from the PVC fragments and resolved by sonification (50 watt for 5 min) followed by vortexing (1 min). CFU rates in tissue and of biofilm formed on the catheter were determined by plating serial dilutions on sheep blood agar plates and plate counting after 24 h of incubation at 37 °C.

### 2.9. Statistical Analyses

The statistical significance of changes between groups was assessed by one-way ANOVA followed by Holm-Sidak's post-hoc tests for experiments containing  $\geq 5$  biological replicates using the GraphPad software package Prism 6.01 (San Diego, CA 92108, USA). *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results and Discussion

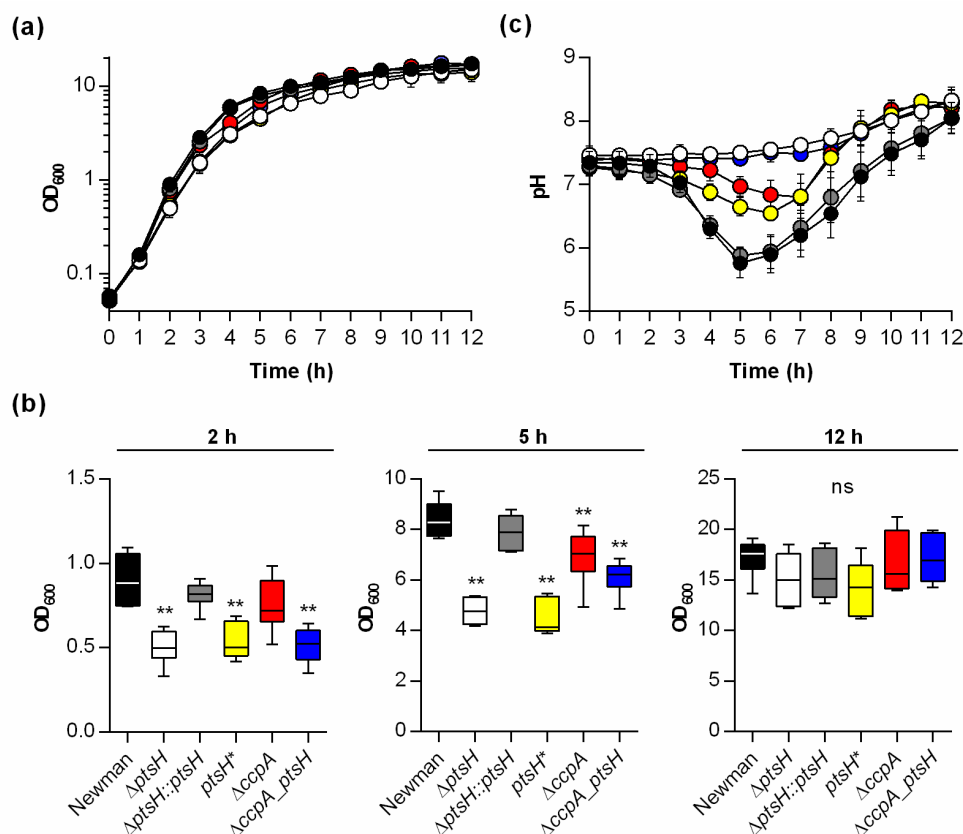
### 3.1. Growth, pH Characteristics, and Metabolite Profiles Differ between *ptsH* and *ccpA* Mutants

To determine if inactivation of *ptsH* in *S. aureus* leads to changes in growth and carbon catabolism, mutants were constructed in the *S. aureus* laboratory strain Newman (Table 1) and growth and physiology were assessed (Figure 1). In detail, a mutant lacking *ptsH* ( $\Delta ptsH$ ) was constructed and cis-complemented (*ptsH::ptsH*), and a  $\Delta ccpA$  *ptsH* double mutant was created (*ccpA\_ptsH*). In addition, a *ptsH* mutant harboring a point mutation in the *ptsH* gene (T136G) leading to the substitution of serine to alanine at position 46 of HPr (HPr-S46A) was constructed (*ptsH\**). The phosphorylation at this amino acid represents a known prerequisite for HPr to activate CcpA in other gram-positive bacteria (14), while its activity in the phosphotransferase uptake system (PTS) should be unaffected. The parental strain Newman and the cis-complemented *ptsH* derivative displayed similar growth characteristics and comparable generation times, respectively. In contrast, all *ptsH* mutants (*ptsH*, *ccpA\_ptsH*, and *ptsH\**) had reduced growth rates in the exponential (1–3 h) and the transition phase (4–6 h) relative to the wild type (Figure 1 and Table 2). Interestingly, the growth rate of the isogenic *ccpA* deletion mutant was only slightly diminished relative to that of strain Newman (Figure 1 and Table 2), and differed significantly from the wild type only during the transition phase. After 12 h of cultivation, growth yields were comparable for all strains (Figure 1b), suggesting that neither the lack of CcpA nor HPr has a clear long-term effect on biomass production of *S. aureus* cultured in rich medium. This is in line with earlier findings regarding CcpA [15].

**Table 2.** Generation time of *S. aureus* strains cultivated in TSB under aerobic conditions.

Strain	Generation Time (min) <sup>1</sup>	<i>p</i> Value <sup>2</sup>
Newman	28.6 ± 1.9	
Nm <i>ptsH</i>	34.8 ± 1.6	<0.01
Nm <i>ptsH::ptsH</i>	27.8 ± 1.3	0.34
Nm <i>ptsH*</i>	33.3 ± 1.4	<0.01
Nm <i>ccpA</i>	30.0 ± 1.3	0.19
Nm <i>ccpA_ptsH</i>	34.3 ± 1.0	<0.01

<sup>1</sup> Data are presented as mean ± SD (*n* = 6). <sup>2</sup> *p* values were determined by one-way ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparison test.

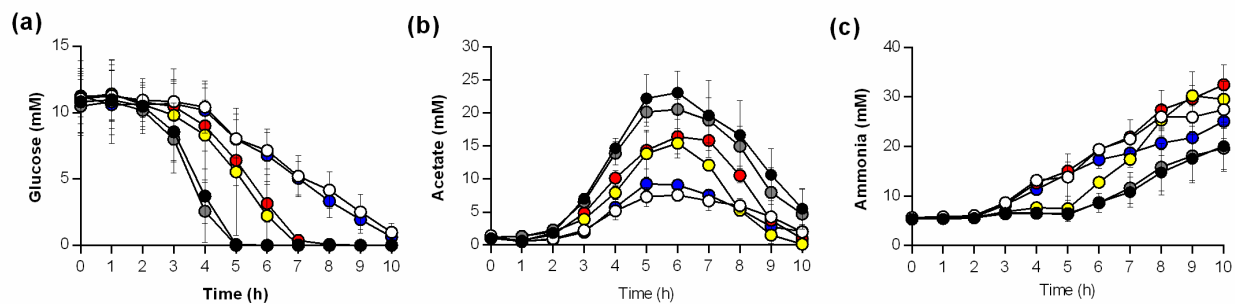


**Figure 1.** Impact of *ptsH* and/or *ccpA* on growth and pH profiles of *S. aureus* TSB cultures. Bacteria were inoculated to an OD<sub>600</sub> of 0.05 in TSB and cultured aerobically at 37 °C and 225 rpm. OD<sub>600</sub> (a,b) and pH measurements (c) of the culture media were determined hourly. Symbols represent: strains Newman (black symbols), Nm *ptsH* (white symbols), Nm *ptsH::ptsH* (grey symbols), Nm *ptsH\** (yellow symbols), Nm *ccpA* (red symbols), and Nm *ccpA\_ptsH* (blue symbols). The results are the mean ± SD of at least five independent experiments. (b) OD<sub>600</sub> readings of the cell cultures at 2, 5, and 12 h of growth, respectively. The data are presented as box and whisker plot showing the interquartile range (25–75%, box), the median (horizontal line), and the standard deviation (bars) of 5–6 independent experiments. \*\*,  $p < 0.01$  (one-way ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparison test. Only differences between Newman and mutants are shown).

To assess the bacterial acid production during growth, the pH of culture supernatants was measured over time (Figure 1c). The pH of culture supernatants from wild type and cis-complemented *ptsH* mutant cultures were similar. In contrast, pH values of culture supernatants from the *ptsH* and *ccpA\_ptsH* deletion mutants indicated that little acid was produced during growth. The pH profiles of the *ptsH\** and *ccpA* mutant cultures were between these two extremes but indicated that acidic end-products were produced and consumed during growth. Taken together, these data indicate that inactivation of *ptsH*, or interference with HPr phosphorylation, delays growth and medium acidification to a greater extent than does deletion of *ccpA*. In addition, the small differences in physiological parameters (i.e., growth and pH kinetics) between the *ptsH* and the *ccpA\_ptsH* mutants and between the *ccpA* and *ptsH\** mutants indicate additional, CcpA-independent functions of HPr.

To get an idea about the metabolic processes that are active in Newman wild type and mutant cells cultured in TSB, the concentrations of glucose, acetate, and ammonia were determined in culture supernatants over time (Figure 2). Strain Newman and the cis-complemented *ptsH* mutant (*ptsH::ptsH*) depleted all available glucose in the medium within the first 5 h of cultivation (Figure 2a). In contrast, glucose depletion in Δ*ptsH* and Δ*ccpA\_ptsH* mutant cultures was severely delayed, and low concentrations of glucose were still detectable in culture supernatants even after 10 h of growth. In Δ*ccpA* and *ptsH\**

mutant cultures, glucose levels decreased slower than in wild type cultures, and no glucose was detectable after 7 h of growth (Figure 2a).



**Figure 2.** Impact of *ptsH* and/or *ccpA* on glucose consumption, acetate and ammonia production of *S. aureus* Newman during in vitro growth. *S. aureus* strains Newman (black symbols),  $\Delta ptsH$  (white symbols),  $\Delta ptsH::ptsH$  (grey symbols),  $\Delta ptsH^*$  (yellow symbols),  $\Delta ccpA$  (red symbols), and  $\Delta ccpA\_ptsH$  (blue symbols) were cultivated in TSB, and glucose (a), acetate (b), and ammonia (c) concentrations in culture supernatants were determined hourly. Results are presented as the average and standard deviation of at least three independent experiments.

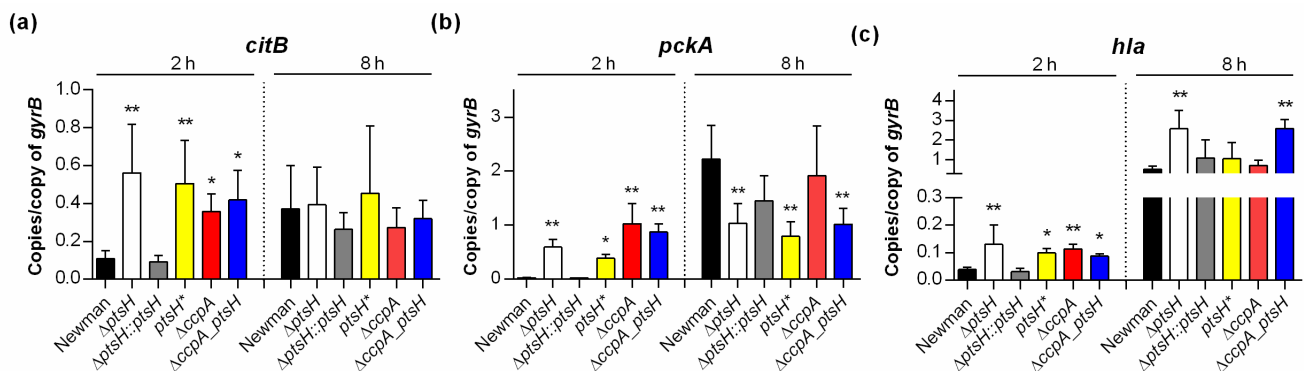
When *S. aureus* is cultured aerobically in a glucose-containing medium, cells produce and secrete acetate as long as glucose is available [37]. Consistent with this fact, increasing acetate concentrations in the culture supernatants were observed during the first 5–6 h of growth for all strains (Figure 2b). However, while all strains accumulated acetate in the medium, the maximum concentrations differed; specifically, the wild type and the cis-complemented *ptsH* derivative accumulated up to 22 mM of acetate. In contrast, supernatants from  $\Delta ptsH$  and  $\Delta ccpA\_ptsH$  mutant strain cultures had approximately one-third of the concentration of that from the wild type strain. Similar to that seen in the pH profiles (Figure 1c), the acetate profiles of *ptsH*<sup>\*</sup> and  $\Delta ccpA$  mutant cultures centered in between those two extremes (Figure 2b). At 7–8 h post inoculation, acetate levels decreased in the supernatants of all cultures, irrespective of the fact that glucose was present in  $\Delta ptsH$  and  $\Delta ccpA\_ptsH$  mutant cultures (Figure 2a).

*S. aureus* also utilizes amino acids as carbon sources for growth, a process that requires deamination of the amino acids, resulting in the secretion of ammonia into the culture supernatant [20]. The uptake and catabolism of amino acids in *S. aureus* is subject to CCR [20]. While glucose was present in the medium, ammonia levels remained low in the wild type and *ptsH::ptsH* culture supernatants, followed by a steady increase in the ammonia concentrations (Figure 2c). In contrast, cultures of strains  $\Delta ptsH$  and  $\Delta ccpA\_ptsH$  began to accumulate ammonia beginning at 3 h of cultivation. Interestingly, the ammonia concentration in the supernatant of the  $\Delta ccpA$  mutant closely resembled that of the *ptsH* deletion mutants, while the *ptsH*<sup>\*</sup> mutant resembled the late induction of the wild type strain (Figure 2c).

Taken together, these data show that the inactivation of *ptsH* or *ccpA* results in distinct differences in glucose consumption, acetate accumulation and reutilization, and ammonia secretion in *S. aureus*. Furthermore, the exchange of an amino acid critical for the interaction of HPr with CcpA in the *ptsH*<sup>\*</sup> mutant resulted in metabolite profiles (i.e., glucose and acetate) comparable to the  $\Delta ccpA$  mutant, while some alterations in the growth profile, generation time, and ammonia secretion were observed. Importantly, after 12 h of growth, the biomass of *S. aureus* Newman was independent of *ccpA* and *ptsH*, suggesting that *S. aureus* has other means to utilize carbon sources in the growth medium. Specifically, *ptsH* mutants were able to utilize glucose from the growth medium—although much slower than the wild type—demonstrating that *S. aureus* can transport glucose independent of the group translocation PTS [38]. A likely compensatory transporter would be one of the many ATP binding cassette transporters identified in *S. aureus* [39].

### 3.2. Inactivation of *ptsH* and/or *ccpA* Alters Transcription of TCA Cycle and Virulence Factor Genes

CcpA is known to affect transcription of a large number of central carbon metabolism and virulence genes [15–17]. For this reason, the effect of *ptsH* deletion on transcription of genes regulated by CcpA such as *citB* (encoding the TCA cycle key enzyme aconitase), *pckA* (encoding the gluconeogenesis key enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase), and *hla* (encoding  $\alpha$ -hemolysin) was assessed. Specifically, mRNA levels were determined in cells from the exponential (i.e., 2 h) and post-exponential growth phases (i.e., 8 h) by qRT-PCR (Figure 3).



**Figure 3.** Effect of *ptsH* and/or *ccpA* mutations on the transcription of *S. aureus*. Newman wild type and mutant cells were cultured aerobically in TSB, as outlined in Materials and Methods. Cells were harvested at the time points indicated, total RNAs isolated, and qRT-PCRs performed for *citB* (a), *pckA* (b), and *hla* (c). Transcripts were quantified in reference to the transcription of gyrase B. Data are presented as mean + SD of five biological replicates. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (one-way ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparison test; only differences between Newman and mutants are shown).

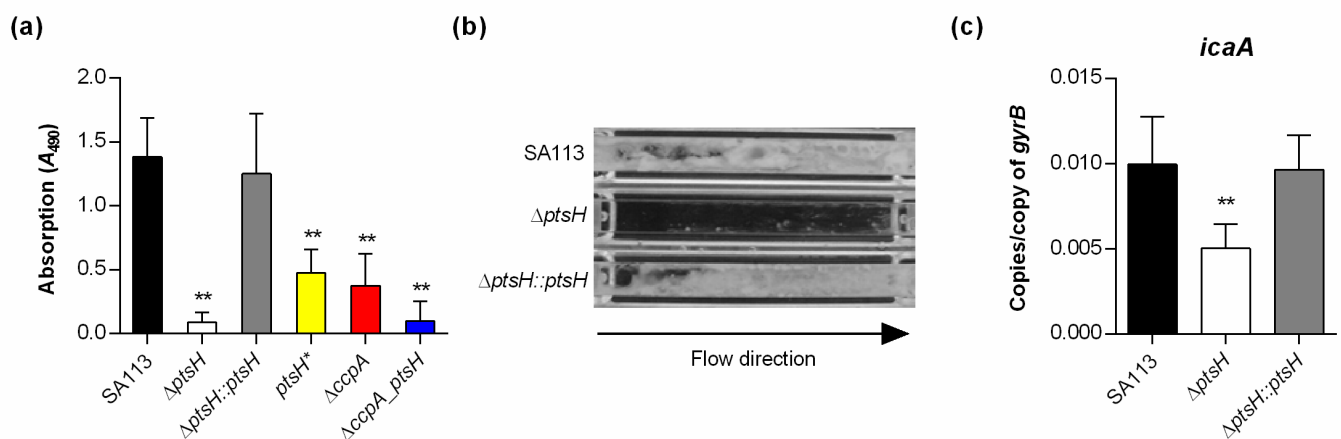
Consistent with our previous observation that *S. aureus* transcription of *citB* and *pckA* is repressed by CcpA when cultivated with glucose [16], deletion of *ccpA* significantly increased the level of *citB* and *pckA* mRNA in exponential growth phase cells relative to wild type cells (Figure 3a,b). As expected, in the post-exponential growth phase, comparable *citB* and *pckA* transcript levels were observed in the  $\Delta ccpA$  mutant and the wild type. Similar to the  $\Delta ccpA$  mutant, exponential growth phase cells of the *ptsH* mutants ( $\Delta ptsH$ , *ptsH*<sup>\*</sup>, and  $\Delta ccpA\_ptsH$ ) had comparable *citB* and *pckA* mRNA levels, while the cis-complemented *ptsH* derivative (*ptsH::ptsH*) had *citB* and *pckA* transcript levels comparable to the wild type strain. In contrast to exponential growth phase cultures, all three *ptsH* mutants produced significantly lower levels of *pckA* mRNA than the wild type at 8 h, suggesting that *pckA* transcription is affected by HPr at later growth stages in a way that is independent of CcpA. This differed from the results for *citB* in which all *ptsH* mutants ( $\Delta ptsH$ , *ptsH*<sup>\*</sup>, and  $\Delta ccpA\_ptsH$ ) had comparable transcript levels to that of the  $\Delta ccpA$  mutant and the wild type after 8 h of growth. The fact that the *ptsH*<sup>\*</sup> mutant produced *pckA* transcript levels similar to the *ptsH* mutant, but not similar to the *ccpA* mutant suggests that HPr phosphorylated at serine 46 acts in part independent of CcpA. This observation is consistent with that found in other gram-positive bacteria, where the serine 46-phosphorylated HPr exerted effects on CCR via CcpA and inducer exclusion [40]. However, it cannot be excluded that differences in *pckA* transcription between the *ptsH*<sup>\*</sup> and  $\Delta ccpA$  mutants are due to differences in protein stability. The reason why protein stability cannot be excluded is because phosphorylation of the *B. subtilis* HPr homolog at Ser-46 stabilized the protein [41], while a serine to alanine exchange of Ser-46 in the *E. coli* HPr homolog was found to decrease the stability of the protein [42].

CcpA represses transcription of *hla* during the exponential growth phase when bacteria are cultured in presence of glucose [15,16]. Similarly, levels of *hla* mRNA from the exponentially growing  $\Delta ccpA$  mutant and all *ptsH* mutants (Figure 3c) were de-repressed,

while the cis-complemented *ptsH* deletion mutant produced *hla* transcript levels that were comparable to the wild type. During the post-exponential growth phase, only the *hla* transcript levels of the  $\Delta ptsH$  and the  $\Delta ccpA\_ptsH$  double mutant were significantly increased (Figure 3c), suggesting that HPr affects expression of  $\alpha$ -hemolysin in a CcpA-dependent and -independent manner. Taken together, these data suggest that exponential growth phase *S. aureus* was cultured in the presence of glucose, HPr affects the transcription primarily via activation of CcpA, while in the post-exponential growth phase cells of *S. aureus*, HPr is likely to affect gene transcription by CcpA-independent mechanism(s).

### 3.3. Impact of *ptsH* Deletion on Biofilm Formation of *S. aureus* SA113

CcpA is important for polysaccharide intercellular adhesin (PIA)-dependent biofilm formation by staphylococci under glucose-rich in vitro conditions [19,24,43]. The importance of HPr on sugar import and gene regulation suggests that HPr might influence biofilm formation of *S. aureus*. Strain Newman is a weak biofilm producer in glucose-rich medium under in vitro conditions [34], hence we transduced the *ptsH* mutations into *S. aureus* strain SA113, which forms a strong biofilm under these conditions [19,22]. The ability of SA113 mutant strains were analyzed using a semi-quantitative static biofilm assay (Figure 4a) and in biofilm flow cells (Figure 4b).

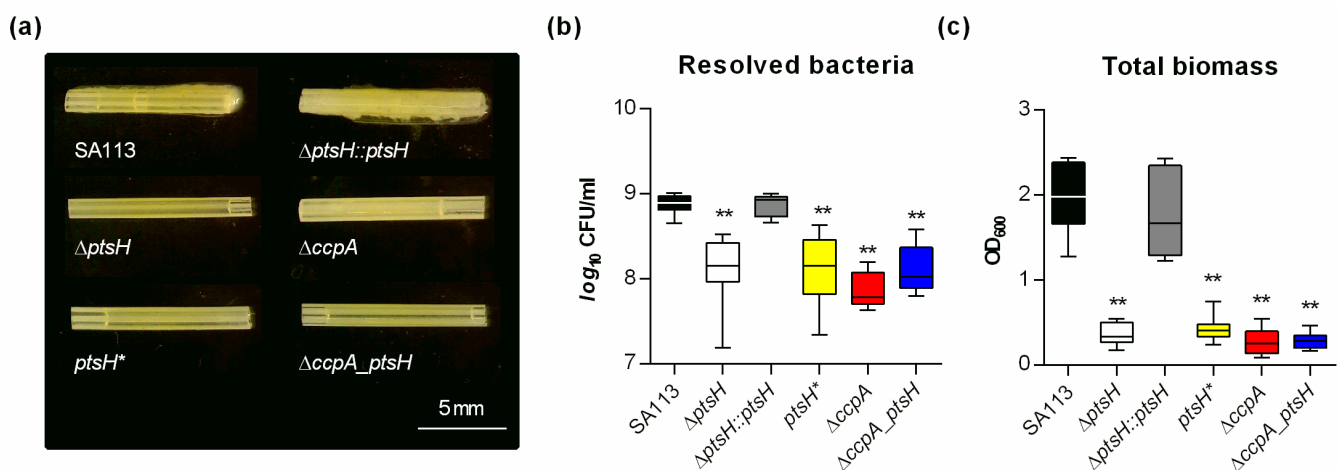


**Figure 4.** Mutations of *ptsH* affect biofilm formation of *S. aureus* under static and flow conditions. (a) Biofilm growth of *S. aureus* strains in a static 96-well microplate assay. The data show the mean + SD of five biological replicates. (b) Flow cell chambers were inoculated with *S. aureus* strains as indicated, allowed to attach to the surfaces for 30 min, and incubated under constant flow for 24 h. The results shown are representative of two independent experiments. (c) Effect of the *ptsH* mutation on the transcription of *icaA* in *S. aureus* strain SA113. Cells of SA113, the  $\Delta ptsH$  mutant, and the cis-complemented *ptsH::ptsH* derivative were cultured aerobically in TSB. After 2 h of growth, cells were harvested, total RNAs isolated, and qRT-PCRs performed for *icaA*. Transcripts were quantified in reference to gyrase B mRNA. Data are presented as mean + SD of five biological replicates. \*\*,  $p < 0.01$  (one-way ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparison test; only differences between SA113 and mutants are shown).

Under static conditions, the  $\Delta ptsH$  and  $\Delta ccpA\_ptsH$  mutants of SA113 displayed drastic decreases in their biofilm formation capacities on polystyrene surfaces, whereas the cis-complemented derivative (*ptsH::ptsH*) formed biofilms that were comparable to the ones seen with the wild type (Figure 4a). Deletion of *ccpA* or the S46A mutation of HPr in SA113 (*ptsH\**) also significantly reduced biofilm formation, however, not to the extent seen with the  $\Delta ptsH$  mutant, supporting our hypothesis that a functional PTS is important for *S. aureus* to form a biofilm in this type of assay. In the flow chamber assay, the  $\Delta ptsH$  mutant failed to produce a clear biofilm within the microchannel after 24 h of constant flow, while both, the wild type and the cis-complemented *ptsH* derivative, almost completely filled the microchannel with biomass (Figure 4b), suggesting that HPr is also important for biofilm formation under shear flow. To exclude that the latter phenotype

was caused by a decreased capacity of the  $\Delta ptsH$  mutant to attach to the microchannel surface, the primary attachment capacities of the strains were determined. Here, no clear differences in attachment towards polystyrene surfaces were obtained for the strain triplet, suggesting that the observed lack of biofilm formation of the SA113  $\Delta ptsH$  mutant is likely due to a deficiency in biofilm maturation. To determine whether this effect might be due to a decreased capacity of the mutant to produce PIA, we assayed the transcription of *icaA*, which is part of the *icaADBC* polycistronic mRNA that encodes proteins needed for PIA synthesis [22]. Consistent with the reduced ability of the SA113 *ptsH* mutant to form a biofilm under static and flow conditions, we observed significantly decreased levels of *icaA* transcripts in the *ptsH* deletion mutant relative to the wild type and the cis-complemented mutant (Figure 4c). Together, these data suggest that HPr, in part, promotes biofilm formation of *S. aureus* by enhancing the expression of the PIA synthesis machinery.

In a third biofilm assay intended to resemble the in vivo situation more closely, we studied the ability of SA113 and its derivatives to form biofilms on peripheral venous catheter (PVC) fragments under non-nutrient limited conditions (Figure 5).

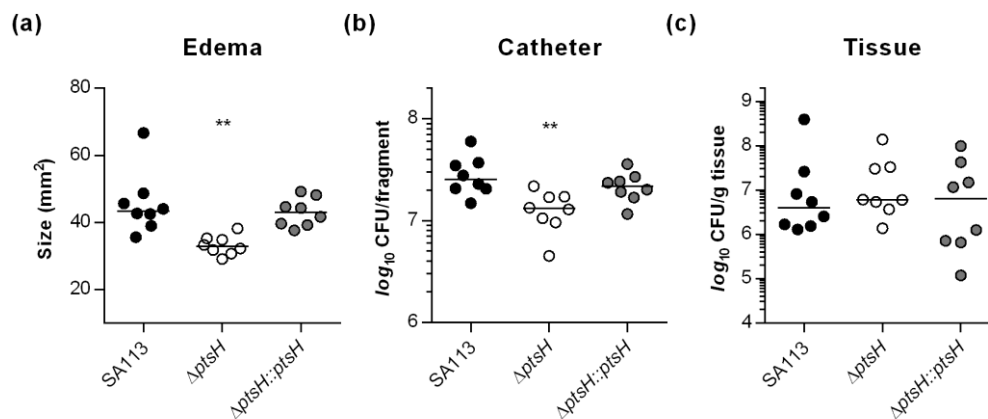


**Figure 5.** Inactivation of *ptsH* and/or *ccpA* reduces the biofilm formation capacity of *S. aureus* on medical devices. (a) Images of *S. aureus*-loaded catheter fragments at day 5 post inoculation (6.3-fold magnification). The results are representative of three independent experiments. (b,c) Colony forming units (CFU) and total biomass of detached biofilms were determined by plate counting (b) and measuring the OD<sub>600</sub> of the TSB solutions (c). The data are presented as box and whisker plot showing the interquartile range (25–75%, box), the median (horizontal line), and the standard deviation (bars) of nine independent experiments. \*\*,  $p < 0.01$  (one-way ANOVA and Holm-Sidak’s multiple comparison test; only differences between SA113 and mutants are shown).

Using this assay, a strong biofilm was macroscopically detectable on catheter fragments inoculated with the wild type or the cis-complemented *ptsH* derivative at 5 days post inoculation (Figure 5a). In contrast, on catheter fragments inoculated with either the  $\Delta ptsH$  mutant, the  $\Delta ccpA$  mutant, the *ptsH*\* mutant, or the  $\Delta ccpA\_ptsH$  double mutant, almost no biofilm was visible. These observations were further supported by CFU and OD<sub>600</sub> determinations of TSB solutions harboring the detached biofilms (Figure 5b,c). A significant reduction in viable bacteria (~1 log) was observed on all fragments inoculated with mutants when compared to the wild type inoculated fragments (Figure 5b). Similar to the CFU data, the OD<sub>600</sub> values were approximately 10-fold lower in the detached biofilms formed by the mutants (Figure 5c), suggesting that *ptsH* and *ccpA* deletions elicit rather comparable effects on the biofilm forming capacity of *S. aureus* on PVC surfaces under non-nutrient limited conditions.

### 3.4. HPr Contributes to Infectivity and Biofilm Formation of *S. aureus* SA113 in a Murine Foreign Body Infection Model

CcpA is not required for biofilm formation of *S. aureus* and *S. epidermidis* on implanted catheter fragments in normoglycemic mice [24,43], but this did not address the function of HPr in vivo. In order to address this question, the ability of strains SA113, the  $\Delta ptsH$  mutant, and the cis-complemented *ptsH* derivative to form biofilms on implanted catheter fragments was assessed in the murine foreign body infection model [36] with normoglycemic mice (Figure 6).



**Figure 6.** Inactivation of *ptsH* reduces the infectivity of *S. aureus* SA113 in a murine foreign body infection model. Catheter fragments were implanted subcutaneously into the back of normoglycemic mice and inoculated with cells of *S. aureus* strains SA113 (black symbols), its *ptsH* deletion mutant (white symbols), and the cis-complemented *ptsH* mutant (grey symbols), respectively ( $n =$  eight animals per group). Ten days post infection, animals were euthanized, edema sizes around the implanted catheters were measured (a), and the catheters and surrounding tissues were explanted. Bacterial loads from catheter detached biofilms (b) and in surrounding tissue homogenates (c) were determined by CFU counting. The data represent the values of every individual animal (symbols) and the median (horizontal line). \*\*,  $p < 0.01$  (one-way ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparison test).

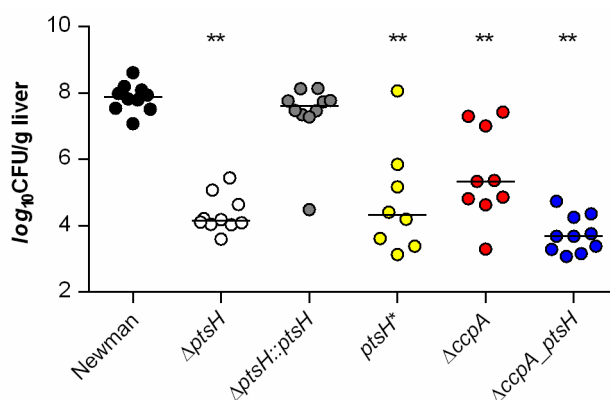
Mice challenged with the  $\Delta ptsH$  mutant displayed a clear reduction in edema sizes around the implanted catheter fragments (Figure 6a) and a small but significant reduction (~2-fold) in detached bacteria (Figure 6b), when compared to animals infected with wild type bacteria or the cis-complemented *ptsH* derivative. In contrast, no significant differences in bacterial loads of tissues surrounding the catheter fragments were obtained (Figure 6c). These findings suggest that HPr, unlike CcpA, has a small but important function on the biofilm formation capacity of PIA producing *S. aureus* in normoglycemic mice. This difference is probably due to a reduced sugar uptake capacity of the *ptsH* mutant, which might interfere with the enhanced carbon and energy demand of *S. aureus* during biofilm maturation.

### 3.5. HPr and CcpA Are Both Required for Full Infectivity of *S. aureus* in a Murine Liver Abscess Model

The formation of liver abscesses is one of the clinical manifestations caused by *S. aureus* in which CcpA exerts a strong effect on disease progression in normoglycemic mice [6]. To determine how P-Ser-HPr affects infectivity of *S. aureus* in a murine liver abscess model, the bacterial loads in livers four days post infection were assessed (Figure 7).

Consistent with previous observations [6,24], we observed a nearly 3 log reduction in bacterial loads in liver tissue of C57BL/6 mice challenged with the *ccpA* mutant bacteria (median  $2.2 \times 10^5$  CFU/g tissue) relative to mice infected with the wild type strain (median  $7.6 \times 10^7$  CFU/g tissue). Importantly, a greater reduction in CFU/g liver was observed (~4 log; median  $1.4 \times 10^4$  CFU/g tissue), when mice were challenged with the  $\Delta ptsH$  mutant. Infection of mice with the cis-complemented *ptsH* derivative resulted in a bacterial

burden in the liver (median  $4.2 \times 10^7$  CFU/g tissue) comparable to that seen in wild type infected mice, demonstrating that the decreased CFU rates determined in liver tissues of  $\Delta ptsH$  infected mice were due to the lack of HPr. Notably, mice challenged with the  $ptsH^*$  mutant carrying the S46A exchange in HPr also caused an almost  $\sim 4$  log reduction in bacterial loads in liver tissue (median  $2.1 \times 10^4$  CFU/g tissue), suggesting that both, the deletion of  $ptsH$  and a mutation of serine 46 of HPr, alter the virulence of *S. aureus* in this murine infection model in a CcpA-independent manner. The lowest CFU rates in liver tissues were observed when mice were challenged with the  $\Delta ccpA\_ptsH$  double mutant (median  $4.8 \times 10^3$  CFU/g tissue), suggesting that CcpA might also exert some effects on virulence of *S. aureus* in this infection model independently of HPr.



**Figure 7.** Inactivation of  $ptsH$  and/or  $ccpA$  results in decreased bacterial burden of *S. aureus* Newman in a murine abscess model. C57BL/6N mice were infected retro bulbar with  $5 \times 10^7$  CFU of *S. aureus* strains Newman (black symbols), its  $\Delta ptsH$  (white symbols) and  $\Delta ccpA$  (red symbols) mutants, the  $ptsH^*$  mutant (yellow symbols), the  $\Delta ccpA\_ptsH$  double mutant (blue symbols), and the cis-complemented  $ptsH$  derivative (grey symbols), respectively. Bacterial loads in liver tissue homogenates were determined four days post infection. The data display the median (horizontal lines) and individual values of every animal (dots;  $n = 8$ –10 animals per group). \*\*,  $p < 0.01$  (one-way ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparison test; only differences between Newman and mutants are shown).

#### 4. Conclusions

Central carbon metabolism and virulence factor synthesis are tightly linked in *S. aureus* and controlled by several transcription factors [3]. Notably, CcpA is the only transcription factor known to enhance infectivity of *S. aureus* [6,24,25], while other regulators such as CcpE, CodY, and RpiRc are thought to attenuate rather than to promote infectivity of this bacterium in mice [33,44–47]. We show here that HPr contributes positively to infectivity of *S. aureus* in mice, presumably by affecting central carbon metabolism and virulence factor synthesis in a CcpA-dependent and -independent manner. These effects are likely mediated through changes in sugar transport and carbon metabolism that alter biofilm formation [24]. It is also possible that HPr in *S. aureus* acts like the HPr homolog of *E. coli* to modulate quorum sensing by interacting with autoinducer-2 (AI-2) modifying factors [48]. Given the importance of HPr on biofilm formation and virulence in *S. aureus*, this phosphocarrier protein could be a promising drug target for the development of novel anti-staphylococcal compounds.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/3/466/s1>, Table S1: Primers used in this study.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.B., R.G. and G.A.S.; methodology, L.P., E.-L.B. and R.G.; investigation, L.P., A.-C.B., E.-L.B. and L.Z.; writing—original draft preparation, L.P. and M.B.; writing—review and editing, M.B., R.G. and G.A.S.; visualization, M.B. and R.G.; supervision, R.G.;



project administration, M.B. and R.G.; funding acquisition, M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the German Research Foundation (DFG), grant numbers BI 1350/1-2 and SFB1027. We acknowledge the support by the DFG and Saarland University within the funding program Open Access Publishing.

**Data Availability Statement:** The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to Karin Hilgert and Benjamin Kastell for excellent technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Deutscher, J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11*, 87–93. [[CrossRef](#)]
- Görke, B.; Stülke, J. Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 613–624. [[CrossRef](#)]
- Richardson, A.R. Virulence and Metabolism. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*. [[CrossRef](#)]
- Henkin, T.M.; Grundy, F.J.; Nicholson, W.L.; Chambliss, G.H. Catabolite repression of  $\alpha$  amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacl* and *galR* repressors. *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 575–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Weickert, M.J.; Chambliss, G.H. Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6238–6242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, C.; Sun, F.; Cho, H.; Yelavarthi, V.; Sohn, C.; He, C.; Schneewind, O.; Bae, T. CcpA mediates proline auxotrophy and is required for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 3883–3892. [[CrossRef](#)]
- Deutscher, J.; Saier, M.H. ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 6790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schumacher, M.A.; Allen, G.S.; Diel, M.; Seidel, G.; Hillen, W.; Brennan, R.G. Structural Basis for Allosteric Control of the Transcription Regulator CcpA by the Phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* **2004**, *118*, 731–741. [[CrossRef](#)]
- Leiba, J.; Hartmann, T.; Cluzel, M.E.; Cohen-Gonsaud, M.; Delolme, F.; Bischoff, M.; Molle, V. A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 43607–43619. [[CrossRef](#)]
- Ramstrom, H.; Sanglier, S.; Leize-Wagner, E.; Philippe, C.; Van Dorsselaer, A.; Haiech, J. Properties and regulation of the bifunctional enzyme HPr kinase/phosphatase in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1174–1185. [[CrossRef](#)]
- Hengstenberg, W.; Penberthy, W.K.; Hill, K.L.; Morse, M.L. Phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*: Its requirement for the accumulation and metabolism of galactosides. *J. Bacteriol.* **1969**, *99*, 383–388. [[CrossRef](#)]
- Postma, P.W.; Lengeler, J.W.; Jacobson, G.R. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **1993**, *57*, 543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Deutscher, J.; Küster, E.; Bergstedt, U.; Charrier, V.; Hillen, W. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **1995**, *15*, 1049–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Deutscher, J.; Francke, C.; Postma, P.W. How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 939. [[CrossRef](#)]
- Seidl, K.; Stucki, M.; Rugg, M.; Goerke, C.; Wolz, C.; Harris, L.; Berger-Bächi, B.; Bischoff, M. *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1183–1194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Seidl, K.; Müller, S.; François, P.; Kriebitzsch, C.; Schrenzel, J.; Engelmann, S.; Bischoff, M.; Berger-Bächi, B. Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 95. [[CrossRef](#)]
- Reed, J.M.; Olson, S.; Brees, D.F.; Griffin, C.E.; Grove, R.A.; Davis, P.J.; Kachman, S.D.; Adamec, J.; Somerville, G.A. Coordinated regulation of transcription by CcpA and the *Staphylococcus aureus* two-component system HptRS. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Seidl, K.; Bischoff, M.; Berger-Bächi, B. CcpA mediates the catabolite repression of *tst* in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 5093–5099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Seidl, K.; Goerke, C.; Wolz, C.; Mack, D.; Berger-Bächi, B.; Bischoff, M. *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 2044–2050. [[CrossRef](#)]
- Halsey, C.R.; Lei, S.; Wax, J.K.; Lehman, M.K.; Nuxoll, A.S.; Steinke, L.; Sadykov, M.; Powers, R.; Fey, P.D. Amino Acid Catabolism in *Staphylococcus aureus* and the Function of Carbon Catabolite Repression. *mBio* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
- Nuxoll, A.S.; Halouska, S.M.; Sadykov, M.R.; Hanke, M.L.; Bayles, K.W.; Kielian, T.; Powers, R.; Fey, P.D. CcpA regulates arginine biosynthesis in *Staphylococcus aureus* through repression of proline catabolism. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1003033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Cramton, S.E.; Gerke, C.; Schnell, N.F.; Nichols, W.W.; Götz, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 5427–5433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mann, E.E.; Rice, K.C.; Boles, B.R.; Endres, J.L.; Ranjit, D.; Chandramohan, L.; Tsang, L.H.; Smeltzer, M.S.; Horswill, A.R.; Bayles, K.W. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bischoff, M.; Wonnenberg, B.; Nippe, N.; Nyffenegger-Jann, N.J.; Voss, M.; Beisswenger, C.; Sunderkötter, C.; Molle, V.; Dinh, Q.T.; Lammert, F.; et al. CcpA Affects Infectivity of *Staphylococcus aureus* in a Hyperglycemic Environment. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 172. [[CrossRef](#)]
25. Liao, X.; Yang, F.; Wang, R.; He, X.; Li, H.; Kao, R.Y.; Xia, W.; Sun, H. Identification of Catabolite Control Protein A from *Staphylococcus aureus* as a Target of Silver Ions. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 8061–8066. [[CrossRef](#)]
26. Hartmann, T.; Zhang, B.; Baronian, G.; Schulthess, B.; Homerova, D.; Grubmüller, S.; Kutzner, E.; Gaupp, R.; Bertram, R.; Powers, R.; et al. Catabolite control protein E (CcpE) is a LysR-type transcriptional regulator of tricarboxylic acid cycle activity in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 36116–36128. [[CrossRef](#)]
27. Giachino, P.; Engelmann, S.; Bischoff, M. Sigma(B) activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1843–1852. [[CrossRef](#)]
28. Monk, I.R.; Shah, I.M.; Xu, M.; Tan, M.W.; Foster, T.J. Transforming the untransformable: Application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio* **2012**, *3*. [[CrossRef](#)]
29. Leibig, M.; Krismer, B.; Kolb, M.; Friede, A.; Gotz, F.; Bertram, R. Marker removal in staphylococci via Cre recombinase and different lox sites. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 1316–1323. [[CrossRef](#)]
30. Duthie, E.S. Variation in the antigenic composition of staphylococcal coagulase. *J. Gen. Microbiol.* **1952**, *7*, 320–326. [[CrossRef](#)]
31. Kreiswirth, B.N.; Lofdahl, S.; Betley, M.J.; O'Reilly, M.; Schlievert, P.M.; Bergdoll, M.S.; Novick, R.P. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* **1983**, *305*, 709–712. [[CrossRef](#)]
32. Iordanescu, S.; Surdeanu, M. Two Restriction and Modification Systems in *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *Microbiology* **1976**, *96*, 277–281. [[CrossRef](#)]
33. Gaupp, R.; Wirf, J.; Wonnenberg, B.; Biegel, T.; Eisenbeis, J.; Graham, J.; Herrmann, M.; Lee, C.Y.; Beisswenger, C.; Wolz, C.; et al. RpiRc Is a Pleiotropic Effector of Virulence Determinant Synthesis and Attenuates Pathogenicity in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **2016**, *84*, 2031–2041. [[CrossRef](#)]
34. Beenken, K.E.; Blevins, J.S.; Smeltzer, M.S. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 4206–4211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhu, Y.; Nandakumar, R.; Sadykov, M.R.; Madayiputhiya, N.; Luong, T.T.; Gaupp, R.; Lee, C.Y.; Somerville, G.A. RpiR homologues may link *Staphylococcus aureus* RNAPIII synthesis and pentose phosphate pathway regulation. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 6187–6196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rupp, M.E.; Ulphani, J.S.; Fey, P.D.; Bartscht, K.; Mack, D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 2627–2632. [[CrossRef](#)]
37. Ferreira, M.T.; Manso, A.S.; Gaspar, P.; Pinho, M.G.; Neves, A.R. Effect of oxygen on glucose metabolism: Utilization of lactate in *Staphylococcus aureus* as revealed by in vivo NMR studies. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Vitko, N.P.; Grosser, M.R.; Khatri, D.; Lance, T.R.; Richardson, A.R. Expanded glucose import capability affords *Staphylococcus aureus* optimized glycolytic flux during infection. *mBio* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Gill, S.R.; Fouts, D.E.; Archer, G.L.; Mongodin, E.F.; Deboy, R.T.; Ravel, J.; Paulsen, I.T.; Kolonay, J.F.; Brinkac, L.; Beanan, M.; et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2426–2438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Deutscher, J.; Herro, R.; Bourand, A.; Mijakovic, I.; Poncet, S. P-Ser-HPr—a link between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1754*, 118–125. [[CrossRef](#)]
41. Pullen, K.; Rajagopal, P.; Branchini, B.R.; Huffine, M.E.; Reizer, J.; Saier, M.H., Jr.; Scholtz, J.M.; Klevit, R.E. Phosphorylation of serine-46 in HPr, a key regulatory protein in bacteria, results in stabilization of its solution structure. *Protein Sci. A Publ. Protein Soc.* **1995**, *4*, 2478–2486. [[CrossRef](#)]
42. Thapar, R.; Nicholson, E.M.; Rajagopal, P.; Waygood, E.B.; Scholtz, J.M.; Klevit, R.E. Influence of N-cap mutations on the structure and stability of *Escherichia coli* HPr. *Biochemistry* **1996**, *35*, 11268–11277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sadykov, M.R.; Hartmann, T.; Mattes, T.A.; Hiatt, M.; Jann, N.J.; Zhu, Y.; Ledala, N.; Landmann, R.; Herrmann, M.; Rohde, H.; et al. CcpA coordinates central metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **2011**, *157*, 3458–3468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hartmann, T.; Baronian, G.; Nippe, N.; Voss, M.; Schulthess, B.; Wolz, C.; Eisenbeis, J.; Schmidt-Hohagen, K.; Gaupp, R.; Sunderkötter, C.; et al. The catabolite control protein E (CcpE) affects virulence determinant production and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 29701–29711. [[CrossRef](#)]
45. Ding, Y.; Liu, X.; Chen, F.; Di, H.; Xu, B.; Zhou, L.; Deng, X.; Wu, M.; Yang, C.G.; Lan, L. Metabolic sensor governing bacterial virulence in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E4981–E4990. [[CrossRef](#)]

46. Balasubramanian, D.; Ohneck, E.A.; Chapman, J.; Weiss, A.; Kim, M.K.; Reyes-Robles, T.; Zhong, J.; Shaw, L.N.; Lun, D.S.; Ueberheide, B.; et al. *Staphylococcus aureus* coordinates leukocidin expression and pathogenesis by sensing metabolic fluxes via RpiRc. *mBio* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Montgomery, C.P.; Boyle-Vavra, S.; Roux, A.; Ebine, K.; Sonenshein, A.L.; Daum, R.S. CodY deletion enhances in vivo virulence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 2382–2389. [[CrossRef](#)]
48. Ha, J.H.; Hauk, P.; Cho, K.; Eo, Y.; Ma, X.; Stephens, K.; Cha, S.; Jeong, M.; Suh, J.Y.; Sintim, H.O.; et al. Evidence of link between quorum sensing and sugar metabolism in *Escherichia coli* revealed via cocrystal structures of LsrK and HPr. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, eaar7063. [[CrossRef](#)]

# Supplementary Material

## Impact of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr on carbon metabolism and virulence in *Staphylococcus aureus*

Linda Pätzold <sup>1</sup>, Anne-Christine Brausch <sup>1</sup>, Evelyn Kirch <sup>1</sup>, Lisa Zimmer <sup>1</sup>, Greg A. Somerville <sup>2</sup>, Markus Bischoff <sup>1,\*</sup>, and Rosmarie Gaupp <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Saarland University, Homburg/Saar, Germany

<sup>2</sup> School of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, USA

\* Correspondence: markus.bischoff@uks.eu; Tel.: +49 6841 162 39 63

Supplementary Table 1: Primers used in this study.

Primer	Direction	Sequence (5'-3') <sup>1</sup>
<b>Cloning primer</b>		
MBH20	Rev	gtcgggtacCTCCACCTATATCTAAAGTACG
MBH86	For.	GGTGTATGAGCCTTGGTG
MBH94	Rev.	ctcgaaTTCATAATTACATTTCTCCTTCG
MBH112	For.	gtcggatACCTTGAAGATGGTTTGATGAC
MBH113	For.	gtcggatCCATTCAAGCAATCAGTGATGTC
MBH114	Rev.	ggatctAGAATGGATTCATTTCTTCAGGC
MBH427	For.	gtcgaattCTGAGTTTTTATATATGGGTCGTG
MBH428	Rev.	gtcgggtacCTACATTTTGTTAATGACACATAGTTG
MBH484	Rev.	CCAACA <u>CCAAGG</u> CTCATAACACCCATGATTGcTTTTAAGT TTACTTTCTTACC
MBH485	For.	GAATTATGT <u>CTGCAG</u> CAGCAATTCAAGGTAGTC
<b>qRT-PCR primer</b>		
<i>citB</i>	For.	CAAGATCATCAAGTGCCTATTCGT
<i>citB</i>	Rev.	CGTGATTACCACGTCTTGAACC
<i>gyrB</i>	For.	GACTGATGCCGATGTGGA
<i>gyrB</i>	Rev.	AACGGTGGCTGTGCAATA
<i>hla</i>	For.	AACCCGGTATATGGCAATCAACT
<i>hla</i>	Rev.	CTGCTGCTTTCATAGAGCCATTT
<i>icaA</i>	For.	CTGGCGCAGTCAATACTATTTCCGGGTGTCT
<i>icaA</i>	Rev.	GACCTCCCAATGTTTCTGGAACCAACATCC
<i>pckA</i>	For.	CACGGCTGGAATAAAAACGG
<i>pckA</i>	Rev.	TGCATAGCAGCCACCTTCG

<sup>1</sup> Small letters represent nucleotides that do not fit with the target sequence. Restriction sites used for cloning are underlined.

**Publikation B - PtpA, a secreted tyrosine phosphatase from *Staphylococcus aureus*, contributes to virulence and interacts with coronin-1A during infection**

**Authors:** Laila Gannoun-Zaki<sup>‡1,2</sup>, Linda Pätzold<sup>§1</sup>, Sylvaine Huc-Brandt<sup>‡</sup>, Grégory Baronian<sup>‡</sup>, Mohamed Ibrahim Elhawry<sup>§3</sup>, Rosmarie Gaupp<sup>§</sup>, Marianne Martin<sup>‡</sup>, Anne-Béatrice Blanc-Potard<sup>‡</sup>, François Letourneur<sup>‡</sup>, Markus Bischoff<sup>§</sup>, and Virginie Molle<sup>‡4</sup>

From the <sup>‡</sup>Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université de Montpellier, CNRS, UMR 5235, Montpellier 34000, France and the <sup>§</sup>Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Saarland, 66421 Homburg/Saar, Germany

**Abstract:** Secretion of bacterial signaling proteins and adaptation to the host, especially during infection, are processes that are often linked in pathogenic bacteria. The human pathogen *Staphylococcus aureus* is equipped with a large arsenal of immune-modulating factors, allowing it to either subvert the host immune response or to create permissive niches for its survival. Recently, we showed that one of the low-molecular-weight protein tyrosine phosphatases produced by *S. aureus*, PtpA, is secreted during growth. Here, we report that deletion of *ptpA* in *S. aureus* affects intramacrophage survival and infectivity. We also observed that PtpA is secreted during macrophage infection. Immunoprecipitation assays identified several host proteins as putative intracellular binding partners for PtpA, including coronin-1A, a cytoskeleton-associated protein that is implicated in a variety of cellular processes. Of note, we demonstrated that coronin-1A is phosphorylated on tyrosine residues upon *S. aureus* infection and that its phosphorylation profile is linked to PtpA expression. Our results confirm that PtpA has a critical role during infection as a bacterial effector protein that counteracts host defenses.

Reprint with kind permission of Journal of Biological Chemistry (ELSEVIER).

*J. Biol. Chem.* (2018) 293(40) 15569–15580

DOI: 10.1074/jbc.RA118.003555

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>



Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>



Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich. Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich. Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich. Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich. Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003555>

## Publikation C - The Phosphoarginine Phosphatase PtpB from *Staphylococcus aureus* Is Involved in Bacterial Stress Adaptation during Infection

**Authors:** Mohamed Ibrahim Elhawry <sup>1,2</sup>, Sylvaine Huc-Brandt <sup>3</sup>, Linda Pätzold <sup>1</sup>, Laila Gannoun-Zaki <sup>3</sup>, Ahmed Mohamed Mostafa Abdrabou <sup>1,4</sup>, Markus Bischoff <sup>1,\*</sup> and Virginie Molle <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Saarland, D-66421 Homburg, Germany;

<sup>2</sup> Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, Zagazig 44511, Egypt

<sup>3</sup> Laboratory of Pathogen Host Interactions, Université de Montpellier, CNRS, UMR 5235, 34095 Montpellier, France;

<sup>4</sup> Medical Microbiology and Immunology Department, Faculty of Medicine, Mansoura University, Mansoura 35516, Egypt

\* Correspondence: markus.bischoff@uks.eu (M.B.); virginie.molle@umontpellier.fr (V.M.);  
Tel.: +49-(68)-411623963 (M.B.); +33-(46)-7144725 (V.M.)

**Abstract:** *Staphylococcus aureus* continues to be a public health threat, especially in hospital settings. Studies aimed at deciphering the molecular and cellular mechanisms that underlie pathogenesis, host adaptation, and virulence are required to develop effective treatment strategies. Numerous host-pathogen interactions were found to be dependent on phosphatases-mediated regulation. This study focused on the analysis of the role of the low-molecular weight phosphatase PtpB, in particular, during infection. Deletion of *ptpB* in *S. aureus* strain SA564 significantly reduced the capacity of the mutant to withstand intracellular killing by THP-1 macrophages. When injected into normoglycemic C57BL/6 mice, the SA564  $\Delta$ *ptpB* mutant displayed markedly reduced bacterial loads in liver and kidney tissues in a murine *S. aureus* abscess model when compared to the wild type. We also observed that PtpB phosphatase-activity was sensitive to oxidative stress. Our quantitative transcript analyses revealed that PtpB affects the transcription of various genes involved in oxidative stress adaptation and infectivity. Thus, this study disclosed first insights into the physiological role of PtpB during host interaction allowing us to link phosphatase-dependent regulation to oxidative bacterial stress adaptation during infection.

Reprint with kind permission of Cells (MDPI).

*Cells* 2021, 10, 645

DOI: 10.3390/cells10030645

Article

# The Phosphoarginine Phosphatase PtpB from *Staphylococcus aureus* Is Involved in Bacterial Stress Adaptation during Infection

Mohamed Ibrahim Elhawy <sup>1,2</sup>, Sylvaine Huc-Brandt <sup>3</sup>, Linda Pätzold <sup>1</sup>, Laila Gannoun-Zaki <sup>3</sup>, Ahmed Mohamed Mostafa Abdrabou <sup>1,4</sup>, Markus Bischoff <sup>1,\*</sup> and Virginie Molle <sup>3,\*</sup>

- <sup>1</sup> Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Saarland, D-66421 Homburg, Germany; Mohamed.Elhawy@uks.eu (M.I.E.); Linda.Paetzold@uks.eu (L.P.); Ahmed.Mostafa@uks.eu (A.M.M.A.)  
<sup>2</sup> Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, Zagazig 44511, Egypt  
<sup>3</sup> Laboratory of Pathogen Host Interactions, Université de Montpellier, CNRS, UMR 5235, 34095 Montpellier, France; sylvaine.huc-brandt@umontpellier.fr (S.H.-B.); laila.gannoun@umontpellier.fr (L.G.-Z.)  
<sup>4</sup> Medical Microbiology and Immunology Department, Faculty of Medicine, Mansoura University, Mansoura 35516, Egypt  
 \* Correspondence: markus.bischoff@uks.eu (M.B.); virginie.molle@umontpellier.fr (V.M.); Tel.: +49-(68)-411623963 (M.B.); +33-(46)-7144725 (V.M.)



**Citation:** Elhawy, M.I.; Huc-Brandt, S.; Pätzold, L.; Gannoun-Zaki, L.; Abdrabou, A.M.M.; Bischoff, M.; Molle, V. The Phosphoarginine Phosphatase PtpB from *Staphylococcus aureus* Is Involved in Bacterial Stress Adaptation during Infection. *Cells* **2021**, *10*, 645. <https://doi.org/10.3390/cells10030645>

Academic Editor: Alessandro Poggi

Received: 16 February 2021

Accepted: 12 March 2021

Published: 14 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** *Staphylococcus aureus* continues to be a public health threat, especially in hospital settings. Studies aimed at deciphering the molecular and cellular mechanisms that underlie pathogenesis, host adaptation, and virulence are required to develop effective treatment strategies. Numerous host-pathogen interactions were found to be dependent on phosphatases-mediated regulation. This study focused on the analysis of the role of the low-molecular weight phosphatase PtpB, in particular, during infection. Deletion of *ptpB* in *S. aureus* strain SA564 significantly reduced the capacity of the mutant to withstand intracellular killing by THP-1 macrophages. When injected into normoglycemic C57BL/6 mice, the SA564  $\Delta$ *ptpB* mutant displayed markedly reduced bacterial loads in liver and kidney tissues in a murine *S. aureus* abscess model when compared to the wild type. We also observed that PtpB phosphatase-activity was sensitive to oxidative stress. Our quantitative transcript analyses revealed that PtpB affects the transcription of various genes involved in oxidative stress adaptation and infectivity. Thus, this study disclosed first insights into the physiological role of PtpB during host interaction allowing us to link phosphatase-dependent regulation to oxidative bacterial stress adaptation during infection.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; arginine phosphatase; infection; oxidative response

## 1. Introduction

*Staphylococcus aureus* has emerged as a major human pathogen responsible for hospital and community-associated infections that can involve almost any organ system, including skin and soft tissue infections, necrotizing pneumonia, and infective endocarditis [1]. The increase in multi-resistant variants of this species, coupled with its increasing prevalence as a nosocomial pathogen, is of major concern [2]. The success of *S. aureus* as a pathogen and its ability to cause such a wide range of infections are the result of its large armamentarium of virulence factors that is controlled by a sophisticated network of regulatory molecules [3,4]. *S. aureus* has an exceptional ability to survive under unfavorable conditions, either by adapting to environmental factors or by defending against exogenous stresses [5]. Within the human host, the bacterium can infect and reside in a wide range of tissues, ranging from superficial surfaces like the skin to deeper tissues such as the gastrointestinal tract, heart and bones. In order to achieve this multifaceted lifestyle, *S. aureus* uses complex regulatory networks to sense diverse signals that enable it to adapt to different environments and modulate virulence [6].

To survive in changing environments, bacteria have developed exquisite systems that not only sense these stresses but also trigger appropriate responses, which allow survival and even propagation under these conditions. Basic research of staphylococcal protein regulation is therefore required to decipher molecular and cellular mechanisms that underlie pathogenesis, host adaptation and virulence. Thus, understanding how *S. aureus* regulates its virulence in response to host environments is important to devise effective treatment strategies.

Signal transduction is an essential and universal mechanism that allows all cells—from prokaryotes to eukaryotes—to translate environmental signals into adaptive changes. By this mechanism, extracellular inputs propagate through complex signaling networks whose activity is often regulated by reversible protein phosphorylation [7]. Protein kinases and phosphatases are the regulatory proteins that tend to amplify an external signal, thus making it crucial. Protein phosphorylation is carried out by a multitude of protein kinases that transfer the gamma-phosphate from ATP to specific amino acids on proteins, predominantly to the side chains of serine, threonine, and tyrosine residues [8,9]. An analogous number of protein phosphatases counteract these reactions by catalyzing the dephosphorylation of specific substrate proteins. Based on their sequence, structure, and function, protein phosphatases are grouped into three main classes. Phosphatases acting on phospho-serine/threonine (pSer, pThr) comprise the PPP (phospho-protein phosphatase) and PPM ( $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -dependent protein phosphatase) families, whereas enzymes acting on phospho-tyrosine (pTyr) constitute the protein tyrosine phosphatase (PTP) superfamily [8,10]. In addition, specialized protein phosphatases act on phospho-aspartate, phospho-histidine, and phospho-cysteine residues [11–14]. Recently, a member of the low-molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) family was shown to efficiently target phospho-arginine [15]. Protein arginine phosphorylation represents a novel posttranslational modification (PTM) that alters protein function *in vitro* and *in vivo* [16,17]. While bacterial tyrosine phosphatases can be intimately involved in a number of cellular processes, one major theme has become apparent with the involvement of phosphatases as virulence factors [18]. Although a detailed picture is yet unavailable, a role of bacterial protein tyrosine phosphatases during host infection has been identified in different facultative and obligate intracellular pathogens, and the strategies employed by them are currently being elucidated [18,19].

A wealth of information has been gained from studies aimed at deciphering the pathophysiological events during *S. aureus*-macrophage infection [20], but the signaling pathways leading to these adaptations are still poorly understood. Protein phosphatases are suggested to be important regulatory enzymes in pathogenic bacteria, though the upstream signaling of these proteins needs to be further analyzed under specific environmental conditions, which may help in identifying their sensing mechanisms. *S. aureus* has been reported to produce two LMW-PTPs, PtpA and PtpB [21], with the corresponding genes being part of the *S. aureus* core genome [22]. In our previous work, we demonstrated the secretion of the *S. aureus* phosphatase PtpA [23], and its involvement in the process of infection and intracellular survival [24]. Furthermore, while PtpB was initially described as a tyrosine phosphatase [21], recent phosphoproteomic analysis indicated that PtpB functions as an arginine phosphatase [25] that is involved in oxidative stress response, amino acid metabolism, and virulence factor synthesis [26]. Yet, its role during infection remains to be investigated. In this study, we demonstrate that PtpB contributes to the intracellular survival capacity of *S. aureus* within macrophages and participates in the infectivity of this pathogen in a murine *S. aureus* abscess model. *In vitro* phosphatase activity assays revealed furthermore that PtpB is sensitive to oxidative stress. Additionally, we show that PtpB affects the transcription of various genes involved in oxidative stress adaptation and infectivity.



## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bacterial Strains, Media, and Growth Conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. All mutant strains and plasmids generated for this study were confirmed by sequencing of the affected region, and by assessing gene transcription by quantitative real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR). *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in LB medium. *S. aureus* isolates were plated on Tryptic Soy Agar (TSA; BD, Heidelberg, Germany), or grown in Tryptic Soy Broth (TSB; BD) medium at 37 °C and 225 rpm with a culture to flask volume of 1:10. Antibiotics were only used for strain construction and phenotypic selection at the following concentrations: ampicillin, 100 µg/mL; tetracycline, 2.5 µg/mL; erythromycin, 2.5 µg/mL; and chloramphenicol, 10 µg/mL.

**Table 1.** Strains and plasmids used in this study.

Strain	Description <sup>1</sup>	Reference or Source
<i>S. aureus</i> SA564	<i>S. aureus</i> clinical isolate, wild type	[27]
SA564 $\Delta$ <i>ptpB</i>	SA564 $\Delta$ <i>ptpB</i> ::lox66- <i>erm</i> (B)-lox71; <i>Erm</i> <sup>R</sup>	This study
SA564 $\Delta$ <i>ptpB</i> :: <i>ptpB</i>	<i>cis</i> -complemented SA564 $\Delta$ <i>ptpB</i> derivative	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3)Star	<i>E. coli</i> strain allowing a high-level recombinant protein expression. IPTG-inducible T7 RNA polymerase	Invitrogen
IM08B	<i>E. coli</i> DC10B derivative harboring <i>hsdS</i> of <i>S. aureus</i> strain NRS384, $\Delta$ <i>dcm</i>	[28]
TOP10	<i>E. coli</i> derivative ultra-competent cells used for general cloning	Invitrogen
Plasmids		
pBASE6	<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> temperature-sensitive suicide shuttle vector, <i>secY</i> counterselection; <i>bla</i> <i>cat</i>	[29]
pBASE6 <i>ptpB</i> comp	pBASE6 derivative harboring the C-terminal region of NWMN_2020, <i>ptpB</i> , and the N-terminal region of <i>glyA</i> ; <i>bla</i> , <i>cat</i>	This study
pBT	<i>S. aureus</i> suicide plasmid; <i>tet</i> (L)	[30]
pBT <i>ptpB</i> KO	pBT derivative harboring the genomic regions flanking <i>ptpB</i> and lox66- <i>erm</i> (B)-lox71; <i>tet</i> (L), <i>erm</i> (B)	This study
pET19b	<i>E. coli</i> vector for IPTG inducible protein expression; <i>bla</i>	Novagen
pET19b_PtpB	pET19b derivative used to express HAT-tagged fusion of <i>S. aureus</i> PtpB WT in <i>E. coli</i> ; <i>bla</i>	This study
pET19b_PtpB_D111A	pET19b derivative used to express HAT-tagged fusion of <i>S. aureus</i> PtpB_D111A in <i>E. coli</i> ; <i>bla</i>	This study
pET19b_PtpB_T11I	pET19b derivative used to express HAT-tagged fusion of <i>S. aureus</i> PtpB_T11I in <i>E. coli</i> ; <i>bla</i>	This study
pRMC2	<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> shuttle vector, Tetracycline-inducible expression; <i>bla</i> , <i>tet</i>	[31]
pRMC2_PtpA-Spot	pRMC2 derivative used to express C-terminal Spot-tagged fusion of <i>S. aureus</i> PtpA; <i>bla</i> , <i>tet</i>	This study
pRMC2_PtpB-Spot	pRMC2 derivative used to express C-terminal Spot-tagged fusion of <i>S. aureus</i> PtpB; <i>bla</i> , <i>tet</i>	This study
pRMC2_SecA-Spot	pRMC2 derivative used to express C-terminal Spot-tagged fusion of <i>S. aureus</i> SecA; <i>bla</i> , <i>tet</i>	This study

<sup>1</sup> *Erm*<sup>R</sup>, erythromycin-resistant.

### 2.2. Cloning and Expression of PtpA, PtpB and SecA Spot-Tagged Proteins in *S. aureus*

The *ptpA*, *ptpB*, and *secA* genes were amplified by PCR using *S. aureus* Newman chromosomal DNA as a template, and the Spot fragment was amplified by PCR using the pSpot2 vector as a template (Chromotek, Planegg, Germany) with the primers listed in Table S1. The *ptpA*, *ptpB*, and *secA* plasmids were constructed using NEB Gibson Assembly kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The *ptpA*, *ptpB* and *secA* purified PCR products were fused to the Spot-tag at the C-terminus and Gibson cloned into the KpnI/EcoRI digested pRMC2 vector [31], thus generating pRMC2\_PtpA-Spot, pRMC2\_PtpB-Spot and pRMC2\_SecA-Spot, respectively. The plasmids were propagated in *E. coli* IM08B [28] and electroporated into *S. aureus* strain SA564 [27].

### 2.3. Cloning, Expression and Purification of Recombinant PtpB Proteins.

The *ptpB* derivatives plasmids were constructed using NEB Gibson Assembly kit (New England Biolabs). The *ptpB* gene was amplified by PCR using *S. aureus* Newman chromosomal DNA as a template with the primers listed in Table S1. The *ptpB* fragment was fused to Histidine Affinity Tag (HAT) [32] at the C-terminus and Gibson cloned into the NcoI/BamHI digested pET19b vector (Novagen, Madison, WI, USA), thus generating pET19b\_PtpB. PtpB\_T11I and PtpB\_D111A derivatives harboring threonine to isoleucine or aspartic acid to alanine substitutions, respectively, were generated by Gibson assembly (Table S1). Transformed *E. coli* BL21 Star cells were grown at 16 °C in LB medium containing 1 mg/mL of glucose and 100 µg/mL of ampicillin, and protein synthesis was induced with 0.5 mM IPTG overnight. Bacteria were disrupted in a French pressure cell and centrifuged at 14,000 rpm for 25 min. Purifications of the HAT-tagged recombinants were performed using TALON<sup>®</sup> metal affinity resins (Clontech, Mountain View, CA, USA) accordingly to the manufacturer's instructions and eluted in 200 mM imidazole, 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, and 10% [vol/vol] glycerol, to be stored at −20 °C.

### 2.4. Construction of the *S. aureus ptpB* Deletion and Cis-Complementation Strains

For the *S. aureus ptpB* deletion mutants, 0.95- and 1.1-kb fragments (nucleotides 2236272-2237225 and 2234785-2235883 of GenBank accession no. AP009351.1, respectively), containing the flanking regions of the *ptpB* open reading frame (ORF), were amplified by PCR from chromosomal DNA of *S. aureus* strain Newman using primer pairs MBH-510/MBH-511 and MBH-512/MBH-513, respectively (Table S1). The PCR products were digested with KpnI/XhoI and EcoRI/SacI, respectively, and cloned together with an XhoI/EcoRI digested lox66-*erm*(B)-lox71 fragment into suicide vector pBT [30] to generate plasmid pBT *ptpB* KO. Plasmid pBT *ptpB* KO was propagated in *E. coli* strain IM08B [28] and subsequently electroporated directly into *S. aureus* strain Newman to obtain strain Newman  $\Delta$ *ptpB*, in which nucleotides 17 to 405 of the 420-bp spanning *ptpB* open reading frame were replaced by the lox66-*erm*(B)-lox71 cassette by allelic replacement. The deletion of *ptpB* in Newman  $\Delta$ *ptpB* was confirmed by sequencing, and the strain was then used as a donor for transducing the lox66-*erm*(B)-lox71 tagged *ptpB* deletion into *S. aureus* strain SA564 [27].

For the *cis*-complementation of the  $\Delta$ *ptpB-erm*(B) mutation in SA564  $\Delta$ *ptpB*, a 2.4-kb fragment (nucleotides 2234785-2237225 of GenBank accession no. AP009351.1) covering the C-terminal region of ORF NWMN\_2020, *ptpB*, the annotated terminator region of the NWMN-2020-*ptpB* operon, and the N-terminal region of *glyA* was amplified by primers MBH-510/MBH-513 (Table S1), digested with KpnI/SacI, and cloned into KpnI/SacI-predigested plasmid pBASE6 [29] to generate plasmid pBASE6 *ptpB* comp. The plasmid was propagated in *E. coli* IM08B and electroporated into *S. aureus* strain SA564  $\Delta$ *ptpB*. Replacement of the *erm*(B)-tagged *ptpB* deletion by the functional NWMN\_2020-*ptpB* locus was done as previously described [33].

### 2.5. Murine Abscess Model

Animal experiments were performed with approval of the local State Review Board of Saarland, Germany, and conducted following the national and European guidelines for the ethical and human treatment of animals. Preparation of the bacterial inoculum and infection of the animals were carried out as described [34], with minor modifications. Briefly, 100 µL bacterial suspensions containing  $\sim 10^7$  colony forming units (CFU) were administered intravenously by retro-orbital injection into female, 8- to 10-week-old C57BL/6N mice (Charles River, Sulzfeld, Germany) that were anesthetized by isoflurane inhalation (3.5%; Baxter, Unterschleißheim, Germany). Immediately after infection, mice were treated with a dose of carprofen (5 mg/kg; Zoetis, Berlin, Germany), and at four days post infection, mice were sacrificed, and livers and kidneys were removed. The organs were weight adjusted and homogenized in PBS (Thermo Fisher, Dreieich, Germany), and serial dilutions of the homogenates were plated on blood agar plates to enumerate the CFU rates in the organs.

## 2.6. Macrophage Culture and Infection

Cells of the human leukemia monocytic cell line THP-1 [35] were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ no. ACC 16). THP-1 cells were cultured and differentiated into macrophages as described in [36]. For macrophage infection, *S. aureus* cells were grown to the mid-exponential growth phase (i.e., 2 h) in TSB medium. The bacteria were collected by centrifugation at 4,000 g for 10 min and resuspended in PBS. The differentiated THP-1 macrophages ( $5 \times 10^5$  cells/well) were inoculated with *S. aureus* at the multiplicity of infection (MOI) of 20:1 (bacteria to cells) and incubated in 10% fetal calf serum (FCS; PAA, Pasching, Germany)-supplemented RPMI-1640 (Thermo Fisher) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 1 h. Subsequently, cells were washed with PBS to remove unbound bacteria, and the remaining extracellular bacteria were killed by incubation with 100 µg/mL gentamicin (Merck, Darmstadt, Germany) and 20 µg/mL lysostaphin (Genmedics, Reutlingen, Germany) for 30 min. After gentamicin/lysostaphin treatment, macrophages were rinsed twice with PBS (time point T0), and then further incubated in FCS (10%) and gentamicin (100 µg/mL)-supplemented RPMI-1640 for 45 min (time point T45). Lysis of macrophages and enumeration of intracellular bacteria at time points T0 and T45 was performed as described in [24]. The intracellular survival rate was determined by dividing the CFU rate seen at T45 by the corresponding CFU rates seen at T0.

## 2.7. PtpB Phosphatase Activity Assay

The phosphatase activity of PtpB was assayed *in vitro* by using a method based on the detection of p-nitrophenol (PNP) formed from p-nitrophenyl phosphate (PNPP) cleavage. Tests were performed in buffer containing 100 mM sodium citrate, 40 mM PNPP, and 3 mM dithiothreitol (DTT) when required. The reaction was initiated by the addition of 0.5 µM PtpB phosphatase or derivatives followed by incubation in 96-well microplates at 25 °C. To test the effect of oxidation, DTT was omitted and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µM final concentration) was added, respectively. The phosphatase reaction was monitored at 405 nm (absorption maximum of the generated PNP) using a Spark 20M fluorimeter (Tecan, Lyon, France) microplate reader. All experiments were performed at least in triplicate.

## 2.8. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Susceptibility Assays

Minimal inhibitory concentrations of SA564 and its  $\Delta ptpB$  derivative for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) were determined by broth microdilution assays according to CLSI standard M07 [37], however, by using TSB instead of cation-adjusted Mueller-Hinton broth. In a second assay, bacterial cells were cultured in TSB at 37 °C and 225 rpm for 2 h, and subsequently challenged with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mM final concentration) for 1 h. At the end of the incubation time, CFU rates of the cultures were determined by plate counting.

## 2.9. NO Susceptibility Assay

SA564 and its isogenic  $\Delta ptpB$  mutant were grown overnight on TSA, and colonies were picked on the next morning and suspended in fresh TSB to a McFarland of 0.5. Cell suspensions were diluted 1:100 in TSB and subsequently mixed 1:1 with TSB supplemented with different concentrations (0, 6.25 and 12.5 µM final concentration) of the NO<sup>•</sup> donor diethylamine NONOate diethylammonium salt (DEA NONOate, Sigma). Growth of the cultures was monitored for 12 h using digital time-lapse microscopy with the oCelloScope instrument (BioSense Solutions, Farum, Denmark) under static conditions at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Growth kinetics of the cultures were determined using the Background Corrected Absorption (BCA) algorithm of the UniExplorer software (BioSense Solutions, version 9.0).

## 2.10. pH 5.5 Survival Assay

Exponential growth phase cells (i.e., 2 h) of SA564 and its isogenic  $\Delta ptpB$  mutant were washed with PBS (pH 7.4) and suspended in PBS (pH 5.5) to an OD<sub>600</sub> of 1. PBS washed cells resuspended in PBS (pH 7.4) served as unchallenged controls. Cell suspensions were cultured for up to 3 h at 37 °C, and OD<sub>600</sub> values of acid stressed cell suspensions were

determined every 30 min. The relative survival rates were determined by dividing the OD<sub>600</sub> readings of the cell suspensions through the values recorded at time point 0. At 1 h post inoculation, aliquots of acid stress challenged cell suspensions and controls were removed, and CFU rates of the cultures were determined by plate counting.

#### 2.11. Measurement of Gene Expression by qRT-PCR

RNA isolation, cDNA synthesis and qRT-PCR were carried out as previously described [38], using the primer pairs listed in Table S1. Transcripts were quantified in reference to the transcription of gyrase B (in copies per copy of *gyrB*).

#### 2.12. Statistical analyses

The statistical significance of changes between groups was assessed by the Mann-Whitney *U* test for experiments containing  $\geq 4$  biological replicates using the GraphPad Prism 6.01 software package (GraphPad, San Diego, CA, USA). *p* values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. PtpB Does Not Affect the In Vitro Growth of *S. aureus* SA564 but Promotes Survival in Macrophages

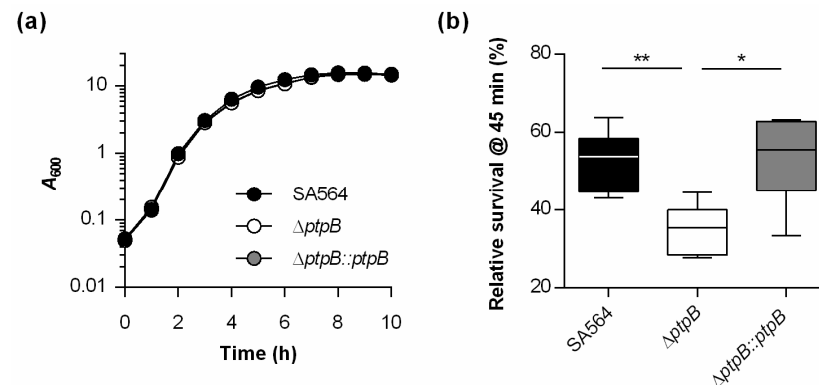
Earlier work demonstrated that *S. aureus* survives readily in macrophages [39]. Given the impact of Ptp homologues on survival within macrophages [24,40], we wondered whether PtpB might fulfill similar functions in *S. aureus*. For this purpose, a *ptpB* deletion mutant in *S. aureus* strain SA564, a clinical isolate of clonal complex 5 (CC5), was generated (SA564  $\Delta$ *ptpB*), as well as the *cis*-complementation derivative SA564  $\Delta$ *ptpB*::*ptpB*. In vitro growth curves performed with the wild type, the mutant and the complemented strain demonstrated that the deletion of *ptpB* in *S. aureus* SA564 did not markedly affect the bacterial growth in TSB (Figure 1a), which is in line with earlier observations made with *S. aureus ptpB* mutants cultured in full media [26,41]. Next, survival rates of *S. aureus* SA564, the  $\Delta$ *ptpB* mutant, and the *cis*-complemented strain were determined within THP-1 macrophages at 45 min post Gentamicin treatment (pGt). Already after this short period, a significantly smaller proportion of intracellular surviving cells were observed in THP-1 cells infected with the  $\Delta$ *ptpB* mutant. *Cis*-complementation of the *ptpB* mutant with a functional *ptpB* locus reverted the intracellular survival rates to levels comparable to the wild type strain (Figure 1b). These data suggest that PtpB is involved in the intracellular survival capacity of *S. aureus* within macrophages.

#### 3.2. PtpB Contributes to Infectivity of *S. aureus* in a Murine Abscess Model

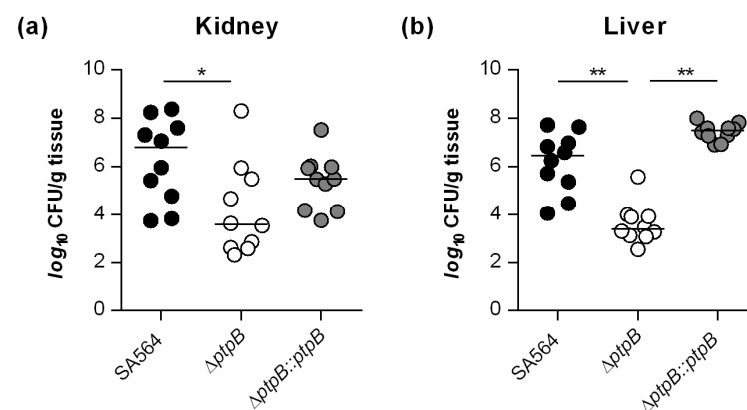
As PtpB is involved in the survival capacity of *S. aureus* within macrophages (Figure 1b), we wondered whether and how PtpB might affect the infectivity of the bacterium in vivo. To address this, we assessed the ability of the strain triplet SA564/SA564  $\Delta$ *ptpB*/SA564  $\Delta$ *ptpB*::*ptpB* to cause disease in a murine abscess model [34]. Coherent with our intramacrophage survival results (Figure 1b), a significant decrease (about 3-log) in the bacterial loads in liver and kidney was detected in mice infected with the  $\Delta$ *ptpB* mutant when compared to mice challenged with the wild type strain (Figure 2).

Mice infected with the *cis*-complemented derivative SA564  $\Delta$ *ptpB*::*ptpB* displayed comparable bacterial loads in liver as wild type infected mice. In kidneys, SA564  $\Delta$ *ptpB*::*ptpB* infected mice produced CFU rates that were about 1-log lower than the CFU rates determined in wild type infected mice (Figure 2a). However, SA564  $\Delta$ *ptpB*::*ptpB* infected mice displayed about 100-fold higher bacterial loads in kidneys than the  $\Delta$ *ptpB* mutant challenged mice, indicating that the decreases in bacterial loads seen in livers and kidneys of  $\Delta$ *ptpB* mutant challenged mice were due to the deletion of *ptpB* and not caused by polar mutations. Taken together, these findings suggest that PtpB is a major contributor to abscess formation of *S. aureus* in mice. Remarkably, inactivation of *ptpB* in *S. aureus* decreased abscess formation in both, liver and kidneys, which is not the rule for other

mutations affecting liver and renal abscess formation of *S. aureus*, such as *ccpA*, *nor*, *nos*, and *sea* that altered the abscess formation only in one of the two organs upon infection via the blood system [42–44].



**Figure 1.** PtpB does not affect growth of *S. aureus* SA564 in TSB but promotes survival in macrophages. (a) Growth kinetics of *S. aureus* strains SA564 (black symbols), SA564  $\Delta ptpB$  (white symbols), and SA564  $\Delta ptpB::ptpB$  (gray symbols) in TSB. Cells were cultured at 37 °C and 225 rpm at a culture to flask volume of 1:10. Data represent the mean  $A_{600}$  readings  $\pm$  SD at the time points indicated ( $n = 3$ ). (b) *S. aureus* short-term survival in infected macrophages. Survival rates are given in relationship to the intracellular bacterial cell numbers seen immediately after the gentamicin/lysostaphin treatment, which was set to 100%. The data are presented as box and whisker plot showing the interquartile range (25–75%, box), the median (horizontal line) and the standard deviation (bars) of six independent experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (Mann-Whitney  $U$  test).

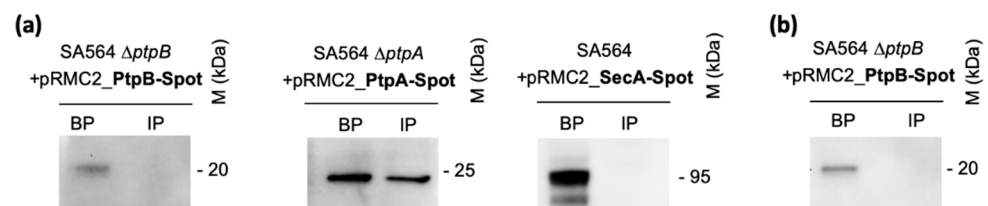


**Figure 2.** PtpB contributes to infectivity of *S. aureus* SA564 in a murine abscess model. C57BL/6N mice were infected via retroorbital injection with  $1 \times 10^7$  cells of *S. aureus* strain SA564 (black symbols), SA564  $\Delta ptpB$  (white symbols), and the *cis*-complemented derivative SA564  $\Delta ptpB::ptpB$  (gray symbols), respectively ( $n = 10$  per group). Mice were euthanized 4 days post-infection, livers and kidneys were removed and homogenized in PBS, and serial dilutions of the homogenates plated on sheep blood agar plates to determine the bacterial loads in kidney (a) and liver (b) organs. Each symbol represents an individual mouse. Horizontal bars indicate the median of all observations. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (Mann-Whitney  $U$  test).

### 3.3. PtpB Is Not Secreted by *S. aureus* during In Vitro Growth and Upon Ingestion by Macrophages

Various pathogenic bacteria use the secretion of bacterial signaling proteins into target host cells to modulate the phosphorylation status of host signaling networks [45–47]. We have recently shown that *S. aureus* PtpA is secreted during in vitro growth or within macrophages [23,24]. Additionally, PtpA has been identified in the secretome of this bacterium [48], despite of the fact that PtpA does not exhibit a general export pathway

signal sequence at its *N*-terminus. In order to determine whether PtpB might be secreted by *S. aureus* and interact directly with signaling networks of the host, we created a C-terminal Spot-tag *ptpB* translational fusion construct and introduced this construct in *trans* into the SA564  $\Delta ptpB$  derivative to avoid the expression of endogenous PtpB, generating strain SA564  $\Delta ptpB$  + pRMC2\_PtpB-Spot. The plasmid is expected to drive high levels of expression of a PtpB-Spot fusion protein upon anhydrotetracycline induction [31]. Cultures expressing the PtpB-Spot fusion protein were induced and grown in liquid media for only two hours in order to minimize cell death and lysis. Presence of PtpB-Spot in supernatants and bacterial cells was determined by Western-blot analyses using anti-Spot antibodies. SA564 derivatives expressing Spot-tagged versions of PtpA and SecA served as positive and negative secretion control, respectively [24,49] (Figure 3).



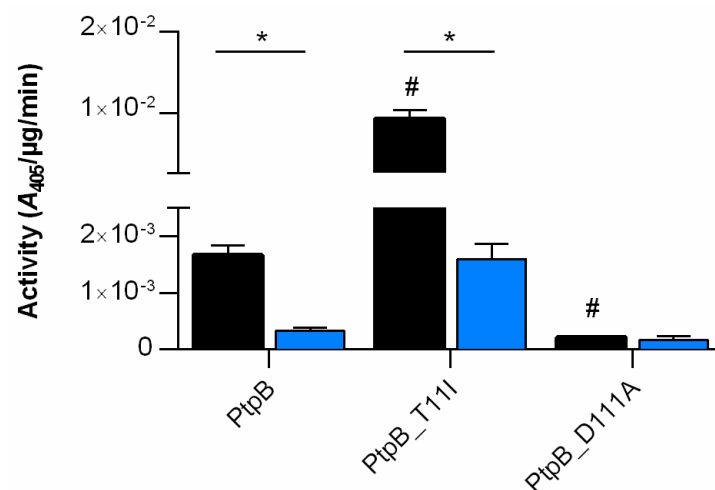
**Figure 3.** PtpB is not secreted by *S. aureus*. (a) Cultures were induced with 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of anhydrotetracycline for 2 h and supernatants from *S. aureus* SA564  $\Delta ptpB$  + pRMC2\_PtpB-Spot, SA564  $\Delta ptpA$  + pRMC2\_PtpA-Spot (positive secretion control), and SA564 + pRMC2\_SecA-Spot (negative secretion control) were filtered and immunoprecipitated with anti-Spot magnetic beads, whereas bacterial pellets were resuspended and lysed in PBS with protease inhibitor cocktail, lysostaphin, and DNAaseI. Immunoprecipitated proteins (IP) from supernatants and bacterial pellets (BP) were resolved on SDS-PAGEs, transferred to PVDF membranes, and subjected to Western-blot analyses using an anti-Spot antibody as primary antibody (Chromotek) and a HRP-coupled goat-anti-lama antibody as secondary antibody (Bethyl). Data are representative of three independent experiments. (b) RAW 264.7 macrophages ( $5 \times 10^5$  cells/mL) were incubated in presence of anhydrotetracycline (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to induce PtpB expression after phagosomal uptake of the bacteria for 2 h with *S. aureus* SA564  $\Delta ptpB$  + pRMC2\_PtpB-Spot at a MOI of 20, and non-phagocytosed bacteria were subsequently removed by gentamicin/lysostaphin treatment. At 3 h pGt, infected macrophages were lysed in 0.1% Triton X-100, and centrifuged at 14 000 g. The obtained supernatants corresponding to macrophage lysates were immunoprecipitated with anti-Spot magnetic beads (Chromotek), whereas the pellets containing intracellular bacteria were resuspended in an equal amount of lysis buffer. Immunoprecipitated proteins and bacterial pellets were resolved on SDS-PAGE and detected with an anti-Spot antibody as described in (a). Data are representative of three independent experiments (M kDa: molecular markers).

Cultures expressing the PtpB-Spot fusion construct allowed the identification of the fusion protein within the bacterial pellet but did not indicate the presence of PtpB-Spot in immunoprecipitated culture supernatants (Figure 3a). As a positive secreted control, we used our recently constructed C-terminal Spot-tag translational fusion to the *S. aureus ptpA* gene in the pRMC2 vector [24], and introduced this construct into strain SA564  $\Delta ptpA$ . A C-terminal Spot-tag translational fusion to the *S. aureus secA* gene cloned into pRMC2 served as negative control to monitor the potential release of cytosolic proteins by cell lysis. In line with our earlier observations [23,24], we observed clear signals for PtpA-Spot in the bacterial pellets and in immunoprecipitated supernatant fractions, while SecA-Spot was exclusively found in bacterial pellets (Figure 3a), indicating that PtpA is secreted by *S. aureus* during exponential growth, while PtpB is kept within the bacterial cell under these growth conditions. The lack of a SecA-Spot signal in the IP culture supernatant fractions indicates furthermore a negligible release of intracellular proteins via cell lysis under the growth conditions used in this assay, supporting the idea that PtpA is actively secreted by *S. aureus* into the extracellular milieu by a yet unidentified mechanism [24]. Moreover, to test whether PtpB might be secreted by *S. aureus* under infection mimicking

conditions, we next infected THP-1 macrophages with the SA564  $\Delta ptpB$  + pRMC2\_PtpB-Spot derivative, induced the expression of PtpB-Spot by addition of anhydrotetracycline to the infected macrophages, and tested the presence of PtpB-Spot in lysed macrophage supernatants and intracellular persisting bacteria three hours post infection. Similar to our observations made with the in vitro cultured cells (Figure 3a), we failed to detect a PtpB-Spot signal in macrophage lysates upon cell infection, while a clear signal could be detected in bacterial cell pellets (Figure 3b), demonstrating that PtpB-Spot was produced by THP-1 ingested *S. aureus* cells. Taken together, these findings indicate that PtpB is not actively secreted by *S. aureus* to modulate host cell signaling, suggesting that the phospho-arginine phosphatase affects the macrophage survival capacity and infectivity of *S. aureus* via intracellular pathways.

### 3.4. *S. aureus* PtpB Phosphatase Activity Depends on a Highly Specific Threonine Residue in Its Catalytic Loop

PtpB from *S. aureus* was originally characterized in vitro as an acid low-molecular-mass phosphotyrosine protein phosphatases [21,50], although recent in vitro studies reported substrate specific activity of PtpB to release inorganic phosphate from arginine phosphate containing substrates [25,26]. However, the phosphotyrosine phosphatase activity of *S. aureus* PtpB was confirmed by structural motifs typical for LMW-PTPases, which are highly conserved among different staphylococcal strains and even species, and known to play pivotal roles in the catalytic cleavage mechanism [50]. All LMW-PTPs have a specifically shaped binding pocket to distinguish pTyr from other phosphorylated residues. Given this conserved architecture, it is surprising that an annotated LMW-PTP is able to target a different phospho-residue, but this was firstly reported for the LMW-PTP YwIE from *Bacillus subtilis*, which possesses a highly specific phospho-arginine phosphatase activity [15]. YwIE belongs to the LMW-PTP family which contains a conserved active site signature motif, C(X)4CR(S/T) (Supplementary Figure S1), corresponding to the active-site loop (P-loop) region that comprises a conserved cysteine and arginine residue. This P-loop is critical for binding the phosphate group of the incoming substrate and subsequently, to form a transient enzyme-substrate phosphothioester adduct [51]. Overall, YwIE adopts the typical LMW-PTP fold consisting of four  $\beta$ -strands forming a central, highly twisted parallel  $\beta$ -sheet that is flanked by  $\alpha$ -helices H1, H2, H5, and H6 on one side, and H3 and H4 on the other side (Fuhrmann et al., 2013a). The P-loop encompassing the C7XXXXXR13 motif connects strand S1 and a helix H1 and constitutes the base of the active-site pocket. As a result, residues Cys7 and Asp118 are properly arranged to dephosphorylate the incoming substrate in a concerted reaction [52]. Although all LMW-PTPs exhibit a similar active-site architecture, in which residues lining the substrate-binding cleft are particularly well conserved, structural comparison of YwIE with the related *S. aureus* PtpA and PtpB phosphatase revealed a remarkable difference regarding position 5 within the CXXXX5XR P-loop (the PX5 residue: Thr in YwIE and PtpB; Ile in PtpA) (Supplementary Figure S1). Fuhrmann et al. [15] demonstrated already that position PX5 of the CXXXX5XR P loop is critical to direct substrate selectivity either to pArg (PX5 = Thr) or pTyr (PX5 = Ile), as a Thr to Ile exchange increase the pTyr phosphatase activity of YwIE, while reducing its pArg phosphatase activity. We hypothesized that the *S. aureus* PtpB specificity towards pArg is mainly driven by the Thr residue at position PX5, as has been seen with its orthologue YwIE [15]. To assess the role of the critical residues, Thr11 and Asp111, on PtpB phosphatase activity, we constructed single mutants where Thr11 and Asp111 (the catalytically active Asp residue of the conserved D-P-Y triad) were mutated to isoleucine and alanine, respectively. Proteins were overexpressed in *E. coli* and purified as recombinant proteins fused to a HAT-tag. The purified tagged PtpB protein derivatives were then assayed for phosphatase activity in presence of the universal phosphate donor PNPP and the reducing agent DTT (Figure 4, black bars).



**Figure 4.** *S. aureus* PtpB phosphatase activity. Recombinant expressed versions of PtpB, PtpB\_T11I, and PtpB\_D111A were used to test their phosphatase activity on PNPP in presence (black bars) and absence of DTT (blue bars), respectively. Data are presented as mean + SD of four biological replicates. \*,# $p < 0.05$  (# Mann-Whitney  $U$  test between PtpB and its derivatives in presence of DTT; \* Mann-Whitney  $U$  test between + DTT and -DTT samples).

The D111A exchange in PtpB strongly decreased the PNPP hydrolysis capacity by a factor of ~7-fold, in line with earlier findings indicating that this Asp residue acts as the general acid catalyst in the transition stage for the phosphate group release [50]. Mutating residue Thr11, on the other hand, had an opposing effect. The T11I exchange in PtpB resulted in a significant increase in PNPP hydrolysis (~6-fold). Therefore, substitution of a single hydroxyl group (threonine) by an ethyl group (isoleucine) led to a drastic change in the phosphatase activity of PtpB as previously described for YwIE from *B. subtilis* [15].

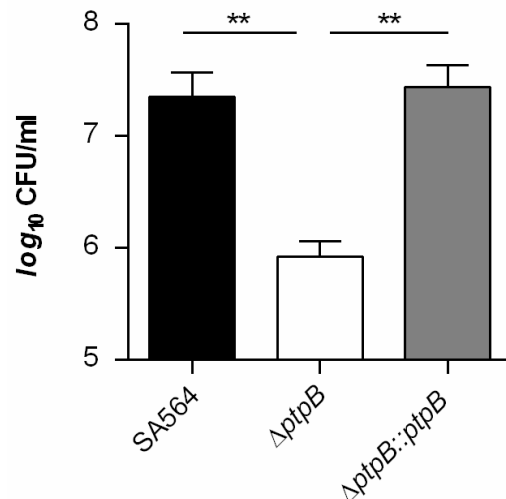
The C(X)4 CR(S/T) motif possessed by LMW-PTPs is crucial for catalysis and redox regulation of their activity. In fact, the dephosphorylation mechanism occurs in a two-step process and involves the formation of a covalent phosphothioester reaction intermediate that is generated by nucleophilic attack of the active site cysteine on the incoming phosphoarginine residue. Studies with other LMW-PTPs suggest that the active site cysteine exists as the negatively charged thiolate anion at physiological pH [53]. In this form, the cysteine residue acts as a strong nucleophile. However, in the latter state, the cysteine residue is also particularly vulnerable to oxidation via reactive oxygen species (e.g., hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). To further explore the redox-based putative regulation of PtpB, we performed phosphatase assays with our PtpB derivatives in absence of DTT and in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively. The results of these studies revealed that both the wild-type PtpB and the T11I mutant activities were decreased in absence of the reducing agent by a factor > 5, while the PNPP hydrolase activity of the D111A mutant was not markedly changed (Figure 4, blue bars). No PNPP hydrolase activities were detectable for all three PtpB derivatives in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (data not shown), in line with observations obtained with other LMW-PTPs [54–56]. Thus, it can be inferred that the redox status of the cell is likely to affect PtpB activity in *S. aureus*.

### 3.5. PtpB Affects the Capacity of *S. aureus* to Adapt to Oxidative Stress

*S. aureus* cells phagocytosed by macrophages are likely to end up in phagolysosomes in which the bacterial cells are challenged among others by reactive oxygen species (ROS) and low pH [57]. Based on our observations that *S. aureus* cells lacking a functional *ptpB* locus have a reduced capacity to survive within THP-1 macrophages (Figure 1b) and that PtpB activity is modulated by oxidative treatment (Figure 4), we wondered whether PtpB



might affect the ability of *S. aureus* to cope with oxidative stress. To test this hypothesis, we first determined the minimal inhibitory concentration (MIC) of SA564 and its  $\Delta ptpB$  derivative for  $H_2O_2$  using a broth microdilution assay. Unexpectedly, cells of the wild type and the *ptpB* deletion mutant displayed an equal MIC of 0.25 mM. However, when grown in TSB for 2 h and subsequently challenged with 50 mM of  $H_2O_2$ , SA564 and its  $\Delta ptpB$  derivative produced clearly differing CFU rates at 1 h post  $H_2O_2$  challenge (Figure 5).



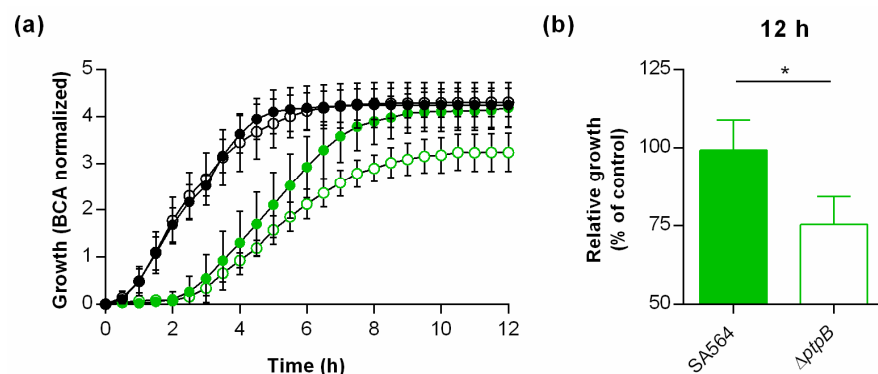
**Figure 5.** Effect of a *ptpB* deletion on the  $H_2O_2$  resistance of *S. aureus* SA564. Cells of *S. aureus* strain SA564, its isogenic  $\Delta ptpB$  mutant, and the *cis*-complemented derivative were cultured in TSB at 37 °C and 225 rpm for 2 h, challenged with 50 mM  $H_2O_2$ , and CFU rates of the cultures determined at 1 h post  $H_2O_2$  challenge. The data presented are the mean + SD of five biological experiments. \*\*  $p < 0.01$  (Mann-Whitney *U* test).

Treatment of exponential growth phase cultures of the  $\Delta ptpB$  mutant with  $H_2O_2$  significantly reduced the number of CFU, when compared to the CFU rates obtained with  $H_2O_2$  challenged cultures of the wild type and the *cis*-complemented derivative, respectively, in line with findings made by Junker et al. [26] for *S. aureus* strain COL. These findings suggest that PtpB does not alter the ability of *S. aureus* SA564 to cope with  $H_2O_2$  stress *per se*, but does affect the ability of the pathogen to adapt to oxidative stress during growth.

### 3.6. PtpB Promotes the Capacity of *S. aureus* to Withstand $NO^{\cdot}$ Stress.

In order to test whether PtpB might also affect the capacity of *S. aureus* to cope with  $NO^{\cdot}$  stress, cells of SA564 and its  $\Delta ptpB$  mutant were challenged with  $NO^{\cdot}$  donor diethylamine NONOate (DEA NONOate), and growth of the cultures monitored over time (Figure 6).

Addition of the  $NO$  donor at a concentration of 12.5  $\mu M$  delayed the growth of wild type and  $\Delta ptpB$  mutant cultures for about 2 h, but had only little effect on the growth rate of the wild type after 12 h of growth (Figure 6a,b). In contrast, a clear decrease in growth rates was observed when cells of the  $\Delta ptpB$  mutant were challenged with the  $NO^{\cdot}$  donor, which reached about 75% of the growth rates seen with the untreated control after 12 h of cultivation (Figure 6b). These findings suggest that PtpB also contributes positively to the capacity of *S. aureus* to recover from nitrosative stress.



**Figure 6.** Effect of a *ptpB* deletion on the NO<sup>•</sup> resistance of *S. aureus* SA564. Cells of *S. aureus* strain SA564 (filled symbols) and its isogenic  $\Delta$ *ptpB* mutant (opened symbols) were cultured in presence and absence of 12.5  $\mu$ M DEA NONOate in TSB under static conditions at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 12 h. Growth was measured by optical density using the oCelloScope BCA algorithm. (a) Growth kinetics of DEA NONOate treated (green symbols) and untreated (black symbols) cell suspensions. The graph represents the average growth values  $\pm$  SD of four biological experiments. (b) Relative growth rates of DEA NONOate treated cells in relation to the growth rates recorded for the untreated controls at 12 h of growth. \*  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).

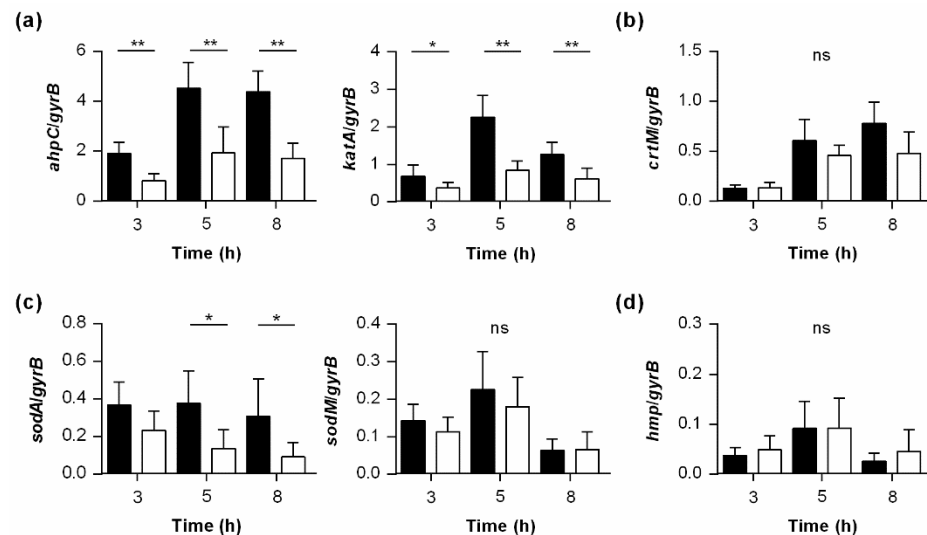
### 3.7. PtpB Alters the Transcription of Genes Encoding Factors Involved in the Detoxification of ROS

The adaptive capacity of staphylococcal cells to oxidative stress is of major impact for host infection [58], and our findings show that the lack of *ptpB* decreased the capacity of *S. aureus* to protect itself from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO<sup>•</sup> induced oxidative stress (Figures 5 and 6). Thus, we wondered whether PtpB might affect the transcription of genes whose products are involved in the detoxification of ROS, specifically of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *S. aureus* is thought to be accomplished mainly by catalase (encoded by *katA*) and the peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase (encoded by *ahpC*), which convert H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to water and oxygen [59]. At first, we analyzed the impact of the *ptpB* deletion on *katA* and *ahpC* transcription of *S. aureus* during growth in TSB (Figure 7a). In line with earlier findings [59], we observed a growth phase-dependent transcription of both genes in wild type cells, with a maximum expression in the post-exponential growth phase. Notably, when the transcript rates of *katA* and *ahpC* were determined in cultures of the isogenic  $\Delta$ *ptpB* mutant along with growth, rather similar growth phase-dependent kinetics were observed. However, when compared in relation to the transcript rates seen for *katA* and *ahpC* in wild type cells at a given time point,  $\Delta$ *ptpB* mutant cells produced significantly reduced amounts of *katA* and *ahpC* at all three time points analyzed (Figure 7a), suggesting that PtpB is involved in the expression of KatA and AhpC in *S. aureus*.

Another mechanism utilized by *S. aureus* to cope with extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress is the production of the yellow to orange pigment staphyloxanthin [60], which is synthesized from the enzymes coded within the *crtOPQMN* operon [61], and known to be of importance for the resistance of *S. aureus* to phagocytotic killing [60,62,63]. However, we neither observed clear differences in pigment production between the  $\Delta$ *ptpB* mutant and wild type cells of SA564 during in vitro growth (data not shown), nor in the transcription of *crtM* (Figure 7b), suggesting that PtpB does not affect intramacrophage survival via the modulation of staphyloxanthin biosynthesis.

Encouraged by our findings that PtpB promotes the transcription of *katA* and *ahpC* (Figure 7a), we additionally tested the impact of the *ptpB* deletion on the transcription of the superoxide dismutases encoding genes *sodA* and *sodM* [64,65]. Both gene products are involved in maintaining cell viability during exogenous O<sub>2</sub><sup>•−</sup> stress by catalyzing the dismutation of O<sub>2</sub><sup>•−</sup> to oxygen and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [58]. While no clear differences in *sodM* transcription between  $\Delta$ *ptpB* mutant cells and wild type cells were noticed in our qRT-PCR analyses, we observed significantly decreased *sodA* transcript rates in  $\Delta$ *ptpB* mutant cells for the later time points analyzed (Figure 7c).

Detoxification of nitric oxide in *S. aureus* is mediated mainly by the flavohemoglobin Hmp [66]. To test whether PtpB might also affect the expression of Hmp, we also analyzed the transcription of the respective gene (Figure 7d). Here, no clear differences in *hmp* transcription between  $\Delta ptpB$  mutant cells and wild type cells were noticed, suggesting that PtpB does not modulate the nitrosative stress response of *S. aureus* via transcription of *hmp*, at least under uninduced conditions. Taken together, these data suggest that PtpB is likely to contribute to intramacrophage survival and abscess formation of *S. aureus* via the upregulation of ROS detoxifying enzymes such as AhpC, KatA, and SodA.



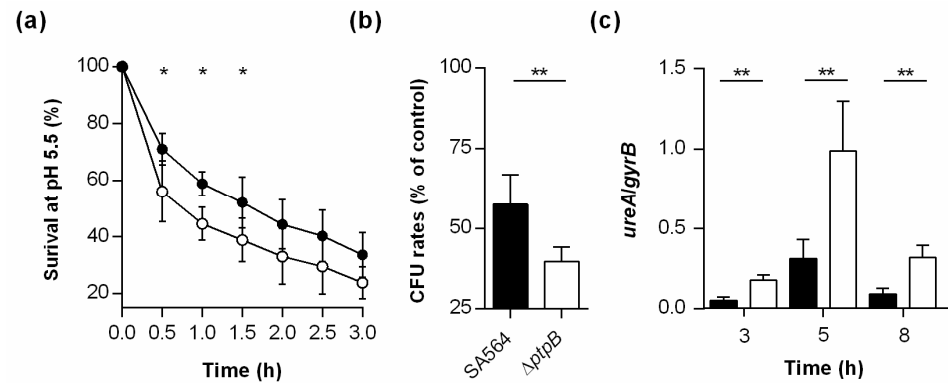
**Figure 7.** Effect of a *ptpB* deletion on the transcription of genes encoding enzymes involved in the detoxification of ROS in *S. aureus*. Quantitative transcript analyses of *ahpC* and *katA* (a), *crtM* (b), *sodA* and *sodM* (c), and *hmp* (d) by qRT-PCR in SA564 (black bars) and SA564  $\Delta ptpB$  (white bars) cells grown in TSB at 37 °C and 225 rpm to the time points indicated. Transcripts were quantified in reference to the transcription of gyrase B (in copies per copy of *gyrB*). Data are presented as mean + SD of five biological replicates. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (Mann-Whitney *U* test between WT and mutant at a given time point).

### 3.8. PtpB Contributes to the Survival Capacity of *S. aureus* Under Low pH.

*S. aureus* cells ingested by macrophages are challenged among others in the phagolysosome by low pH [67]. To evaluate whether PtpB might also affect the capacity of *S. aureus* to cope with acidic stress, we next tested the survival capacity of wild type and  $\Delta ptpB$  mutant cells in PBS at pH 5.5, an average pH found in phagolysosomes of macrophages loaded with viable *S. aureus* cells [67]. To closer resemble conditions seen in the macrophage phagolysosome, exponential growth phase cells of the wild type and the  $\Delta ptpB$  mutant were challenged with the low pH in PBS and not the culture medium (i.e., TSB). When compared to wild type cells incubated in PBS at pH 5.5, the OD<sub>600</sub> values of the  $\Delta ptpB$  mutant cell suspensions dropped faster at all time points analyzed (Figure 8a).

Similarly, cell suspensions of the  $\Delta ptpB$  mutant produced significantly smaller relative CFU rates after 1 h of cultivation than wild type cultures (Figure 8b), suggesting that PtpB contributes to the ability of *S. aureus* to survive under pH conditions encountered by the bacterial cell in the macrophage phagolysosome. As urease was recently reported to represent an essential component of the acid response network of *S. aureus* [68], we next tested whether PtpB might affect the transcription of the corresponding operon, *ureABCEFGD*. Our qRT-PCR analyses revealed that the *ptpB* deletion indeed strongly affected the transcription of *ureA* in SA564 (Figure 8c), however, unlike expected. When cultured in TSB, cells of the  $\Delta ptpB$  mutant produced significantly increased transcript rates of *ureA* than wild type cells at all time points analyzed, suggesting that PtpB represses the transcription of the *ureABCEFGD* operon during in vitro growth. The enhanced level

of *ureA* transcripts seen in  $\Delta ptpB$  mutant cells is probably due to a reduced production of the transcriptional regulator CodY, a known repressor of urease gene transcription in gram-positive bacteria [68], as Junker et al. [26] reported significantly lower amounts of CodY in  $\Delta ptpB$  mutant cells when compared to wild type cells. However, if and how a reduction of urease affects the ability of *S. aureus* to survive within the macrophage phagolysosome remains subject to further analysis.



**Figure 8.** Effect of a *ptpB* deletion on the survival capacity of *S. aureus* at pH 5.5. Exponential growth phase cells of SA564 (black symbols) and its SA564  $\Delta ptpB$  mutant (white symbols) were inoculated into PBS (pH 5.5) at an OD<sub>600</sub> of 1 and cultured for 3 h at 37 °C. (a) Survival rates over time. Data are presented as mean  $\pm$  SD of five biological replicates. (b) Relative CFU rates of the cultures after 1 h of incubation in PBS at pH 5.5. CFU rates are given in relation to the CFU rates determined in cell suspensions cultured for 1 h in PBS at pH 7.4. Data are presented as mean + SD of five biological replicates. (c) Quantitative transcript analyses of *ureA* in *S. aureus* cells grown in TSB at 37 °C and 225 rpm to the time points indicated. Transcripts were quantified in reference to the transcription of gyrase B (in copies per copy of *gyrB*). Data are presented as mean + SD of five biological replicates. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (Mann-Whitney *U* test between WT and mutant at a given time point).

#### 4. Conclusions

Phosphatases expressed by pathogenic bacteria can act as key regulators of important microbial processes, especially during environmental adaptation encountered upon host infection [18,19]. Our macrophage survival-, mice infection-, and transcription data suggest a similar role for PtpB in *S. aureus*. Interestingly, *S. aureus* PtpB presents important differences compared to its LMW-PTPs orthologues. In particular, we provide evidence that PtpB phosphatase activity could be influenced by a single Thr residue in its catalytic loop. Our observations that PtpB activity is affected by its redox status suggest a putative role during the oxidative stress response, as has been seen for the PtpB homolog YlWE in bacilli [56,69]. In line with this assumption, we observed a decreased capacity of the *ptpB* deletion mutant to withstand H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sup>•</sup>, and low pH stresses, skills that are probably very important for *S. aureus* to survive inside macrophages [70]. Professional phagocytes such as macrophages express a multifaceted antimicrobial arsenal, which includes but is not limited to the production of reactive oxygen or nitrogen species (ROS, RNS), and antimicrobial peptides in an acidified environment [71]. Nevertheless, *S. aureus* can withstand these mechanisms and conditions [70]. It is thus tempting to speculate that PtpB redox regulation might participate in the adaptation processes initiated by *S. aureus* to survive and replicate within the phagolysosome. However, further work will be needed to decipher the molecular mechanisms utilized by PtpB that allow *S. aureus* to adapt to oxidative stresses encountered in macrophages and during infection.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/3/645/s1>, Table S1: Primers used in this study; Supplementary Figure S1: Alignment of LMW-PTPs.

**Author Contributions:** Conceptualization, V.M. and M.B.; methodology, V.M. and M.B.; formal analysis, V.M. and M.B.; investigation, M.I.E., S.H.-B., L.P., L.G.-Z., and A.M.M.A.; resources, V.M. and M.B.; writing—original draft preparation, V.M. and M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from the ATIP/AVENIR Program and Region Languedoc-Roussillon for V.M. M.I.E. and A.M.M.A. acknowledge support by the German Egyptian Research Long-Term Scholarship Program (GERLS).

**Institutional Review Board Statement:** Animal experiments were performed with approval of the local State Review Board of Saarland, Germany (project identification code 60/2015 [approved 21.12.2015]), and conducted following the national and European guidelines for the ethical and human treatment of animals.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Acknowledgments:** The authors thank Karin Hilgert for excellent technical support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Lowy, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 520–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gajdács, M. The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* **2019**, *8*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bischoff, M.; Romby, P. Genetic Regulation. In *Staphylococcus: Genetics and Physiology*; Caister Academic Press: Poole, UK, 2016; pp. 301–334.
- Schlievert, P.M. Staphylococcal Virulence Factors. In *Staphylococcus: Genetics and Physiology*; Somerville, G.A., Ed.; Caister Academic Press: Lincoln, NE, USA, 2016; pp. 81–106.
- Fraunholz, M.; Sinha, B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: Live-in and let die. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 43. [[CrossRef](#)]
- Balasubramanian, D.; Harper, L.; Shopsis, B.; Torres, V.J. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathog. Dis.* **2017**, *75*. [[CrossRef](#)]
- Barãjk, I. Complexity of bacterial phosphorylation interaction network. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 725. [[CrossRef](#)]
- Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **1995**, *80*, 225–236. [[CrossRef](#)]
- Pereira, S.F.F.; Goss, L.; Dworkin, J. Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinases and Phosphatases in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2011**, *75*, 192–212. [[CrossRef](#)]
- Barford, D.; Das, A.K.; Egloff, M.-P. The Structure and Mechanism of Protein Phosphatases: Insights into Catalysis and Regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 133–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Perego, M.; Hanstein, C.; Welsh, K.M.; Djavakhishvili, T.; Glaser, P.; Hoch, J.A. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell* **1994**, *79*, 1047–1055. [[CrossRef](#)]
- Rigden, D.J. The histidine phosphatase superfamily: Structure and function. *Biochem. J.* **2007**, *409*, 333–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Klumpp, S.; Krieglstein, J. Reversible Phosphorylation of Histidine Residues in Proteins from Vertebrates. *Sci. Signal.* **2009**, *2*, pe13. [[CrossRef](#)]
- Sun, F.; Ding, Y.; Ji, Q.; Liang, Z.; Deng, X.; Wong, C.C.L.; Yi, C.; Zhang, L.; Xie, S.; Alvarez, S.; et al. Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 15461–15466. [[CrossRef](#)]
- Fuhrmann, J.; Mierzwa, B.; Trentini, D.B.; Spiess, S.; Lehner, A.; Charpentier, E.; Clausen, T. Structural Basis for Recognizing Phosphoarginine and Evolving Residue-Specific Protein Phosphatases in Gram-Positive Bacteria. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 1832–1839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fuhrmann, J.; Schmidt, A.; Spiess, S.; Lehner, A.; Turgay, K.; Mechtler, K.; Charpentier, E.; Clausen, T. McsB Is a Protein Arginine Kinase That Phosphorylates and Inhibits the Heat-Shock Regulator CtsR. *Science* **2009**, *324*, 1323–1327. [[CrossRef](#)]
- Elsholz, A.K.W.; Turgay, K.; Michalik, S.; Hessling, B.; Gronau, K.; Oertel, D.; Mäder, U.; Bernhardt, J.; Becher, D.; Hecker, M.; et al. Global impact of protein arginine phosphorylation on the physiology of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 7451–7456. [[CrossRef](#)]
- Sajid, A.; Arora, G.; Singhal, A.; Kalia, V.C.; Singh, Y. Protein Phosphatases of Pathogenic Bacteria: Role in Physiology and Virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* **2015**, *69*, 527–547. [[CrossRef](#)]
- Whitmore, S.E.; Lamont, R.J. Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence. *Int. J. Oral Sci.* **2012**, *4*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Flannagan, R.S.; Heit, B.; Heinrichs, D.E. Antimicrobial Mechanisms of Macrophages and the Immune Evasion Strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* **2015**, *4*, 826–868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Soulat, D.; Vaganay, E.; Duclos, B.; Genestier, A.-L.; Etienne, J.; Cozzone, A.J. *Staphylococcus aureus* Contains Two Low-Molecular-Mass Phosphotyrosine Protein Phosphatases. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 5194–5199. [[CrossRef](#)]
22. Everitt, R.G.; Didelot, X.; Batty, E.M.; Miller, R.R.; Knox, K.; Young, B.C.; Bowden, R.; Auton, A.; Votintseva, A.; Larner-Svensson, H.; et al. Mobile elements drive recombination hotspots in the core genome of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3956. [[CrossRef](#)]
23. Brelle, S.; Baronian, G.; Huc-Brandt, S.; Zaki, L.G.; Cohen-Gonsaud, M.; Bischoff, M.; Molle, V. Phosphorylation-mediated regulation of the *Staphylococcus aureus* secreted tyrosine phosphatase PtpA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *469*, 619–625. [[CrossRef](#)]
24. Gannoun-Zaki, L.; Pätzold, L.; Huc-Brandt, S.; Baronian, G.; Elhawry, M.I.; Gaupp, R.; Martin, M.; Blanc-Potard, A.-B.; Letourneur, F.; Bischoff, M.; et al. PtpA, a secreted tyrosine phosphatase from *Staphylococcus aureus*, contributes to virulence and interacts with coronin-1A during infection. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 15569–15580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Junker, S.; Maaß, S.; Otto, A.; Michalik, S.; Morgenroth, F.; Gerth, U.; Hecker, M.; Becher, D. Spectral Library Based Analysis of Arginine Phosphorylations in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell. Proteom.* **2018**, *17*, 335–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Junker, S.; Maaß, S.; Otto, A.; Hecker, M.; Becher, D. Toward the Quantitative Characterization of Arginine Phosphorylations in *Staphylococcus aureus*. *J. Proteome Res.* **2018**, *18*, 265–279. [[CrossRef](#)]
27. Somerville, G.A.; Beres, S.B.; Fitzgerald, J.R.; DeLeo, F.R.; Cole, R.L.; Hoff, J.S.; Musser, J.M. In Vitro Serial Passage of *Staphylococcus aureus*: Changes in Physiology, Virulence Factor Production, and *agr* Nucleotide Sequence. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 1430–1437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Monk, I.R.; Tree, J.J.; Howden, B.P.; Stinear, T.P.; Foster, T.J. Complete Bypass of Restriction Systems for Major *Staphylococcus aureus* Lineages. *mBio* **2015**, *6*, e00308-15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Geiger, T.; Francois, P.; Liebeke, M.; Fraunholz, M.; Goerke, C.; Krismer, B.; Schrenzel, J.; Lalk, M.; Wolz, C. The Stringent Response of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Survival after Phagocytosis through the Induction of Intracellular PSMs Expression. *PLOS Pathog.* **2012**, *8*, e1003016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Giachino, P.; Engelmann, S.; Bischoff, M. Sigma(B) Activity Depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1843–1852. [[CrossRef](#)]
31. Corrigan, R.M.; Foster, T.J. An improved tetracycline-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **2009**, *61*, 126–129. [[CrossRef](#)]
32. Terpe, K. Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*, 523–533. [[CrossRef](#)]
33. Bae, T.; Schneewind, O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid* **2006**, *55*, 58–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gaupp, R.; Wirf, J.; Wonnemberg, B.; Biegel, T.; Eisenbeis, J.; Graham, J.; Herrmann, M.; Lee, C.Y.; Beisswenger, C.; Wolz, C.; et al. RpiRc Is a Pleiotropic Effector of Virulence Determinant Synthesis and Attenuates Pathogenicity in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **2016**, *84*, 2031–2041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Tsuchiya, S.; Yamabe, M.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, Y.; Konno, T.; Tada, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **1980**, *26*, 171–176. [[CrossRef](#)]
36. Stokes, R.W.; Doxsee, D. The Receptor-Mediated Uptake, Survival, Replication, and Drug Sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the Macrophage-like Cell Line THP-1: A Comparison with Human Monocyte-Derived Macrophages. *Cell. Immunol.* **1999**, *197*, 1–9. [[CrossRef](#)]
37. Weinstein, M.P.; Patel, J.B.; Burnham, C.-A.; Campeau, S.; Conville, P.S.; Doarn, C.; Eliopoulos, G.M.; Galas, M.F.; Humphries, R.M.; Jenkins, S.G.; et al. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically in CLSI Standard M07. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.
38. Chatterjee, I.; Becker, P.; Grundmeier, M.; Bischoff, M.; Somerville, G.A.; Peters, G.; Sinha, B.; Harraghy, N.; Proctor, R.A.; Herrmann, M. *Staphylococcus aureus* ClpC Is Required for Stress Resistance, Aconitase Activity, Growth Recovery, and Death. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 4488–4496. [[CrossRef](#)]
39. Kubica, M.; Guzik, K.; Koziel, J.; Zarebski, M.; Richter, W.; Gajkowska, B.; Golda, A.; Maciag-Gudowska, A.; Brix, K.; Shaw, L.; et al. A Potential New Pathway for *Staphylococcus aureus* Dissemination: The Silent Survival of *S. aureus* Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1409. [[CrossRef](#)]
40. Wong, D.; Chao, J.D.; Av-Gay, Y. *Mycobacterium tuberculosis*-secreted phosphatases: From pathogenesis to targets for TB drug development. *Trends Microbiol.* **2013**, *21*, 100–109. [[CrossRef](#)]
41. Vega, C.; Chou, S.; Engel, K.; Harrell, M.E.; Rajagopal, L.; Grundner, C. Structure and Substrate Recognition of the *Staphylococcus aureus* Protein Tyrosine Phosphatase PtpA. *J. Mol. Biol.* **2011**, *413*, 24–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Li, C.; Sun, F.; Cho, H.; Yelavarthi, V.; Sohn, C.; He, C.; Schneewind, O.; Bae, T. CcpA Mediates Proline Auxotrophy and Is Required for *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 3883–3892. [[CrossRef](#)]
43. Favazzo, L.J.; Gill, A.L.; Farnsworth, C.W.; Mooney, R.A.; Gill, S.R. The Response of *nor* and *nos* Contributes to *Staphylococcus aureus* Virulence and Metabolism. *J. Bacteriol.* **2019**, *201*, e00107-19. [[CrossRef](#)]
44. Xu, S.X.; Gilmore, K.J.; Szabo, P.A.; Zeppa, J.J.; Baroja, M.L.; Haeryfar, S.M.M.; McCormick, J.K. Superantigens Subvert the Neutrophil Response To Promote Abscess Formation and Enhance *Staphylococcus aureus* Survival In Vivo. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 3588–3598. [[CrossRef](#)]

45. Selbach, M.; Paul, F.E.; Brandt, S.; Guye, P.; Daumke, O.; Backert, S.; Dehio, C.; Mann, M. Host Cell Interactome of Tyrosine-Phosphorylated Bacterial Proteins. *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, 397–403. [[CrossRef](#)]
46. Canova, M.J.; Molle, V. Bacterial Serine/Threonine Protein Kinases in Host-Pathogen Interactions. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 9473–9479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Popa, C.M.; Tabuchi, M.; Valls, M. Modification of Bacterial Effector Proteins Inside Eukaryotic Host Cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 73. [[CrossRef](#)]
48. Busche, T.; Hillion, M.; Van Loi, V.; Berg, D.; Walther, B.; Semmler, T.; Strommenger, B.; Witte, W.; Cuny, C.; Mellmann, A.; et al. Comparative Secretome Analyses of Human and Zoonotic *Staphylococcus aureus* Isolates CC8, CC22, and CC398. *Mol. Cell. Proteom.* **2018**, *17*, 2412–2433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Yang, C.-K.; Ewis, H.E.; Zhang, X.; Lu, C.-D.; Hu, H.-J.; Pan, Y.; Abdelal, A.T.; Tai, P.C. Nonclassical Protein Secretion by *Bacillus subtilis* in the Stationary Phase Is Not Due to Cell Lysis. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 5607–5615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Mukherjee, S.; Dhar, R.; Das, A.K. Analyzing the catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatase PtpB from *Staphylococcus aureus* through site-directed mutagenesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **2009**, *45*, 463–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Denu, J.M.; Dixon, J.E. Protein tyrosine phosphatases: Mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 633–641. [[CrossRef](#)]
52. Zhang, Z.-Y. Mechanistic Studies on Protein Tyrosine Phosphatases. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **2003**, *73*, 171–220. [[CrossRef](#)]
53. Peters, G.H.; Frimurer, T.M.; Olsen, O.H. Electrostatic Evaluation of the Signature Motif (H/V)CX5R(S/T) in Protein–Tyrosine Phosphatases. *Biochemistry* **1998**, *37*, 5383–5393. [[CrossRef](#)]
54. Grundner, C.; Ng, H.-L.; Alber, T. *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase PtpB Structure Reveals a Diverged Fold and a Buried Active Site. *Structure* **2005**, *13*, 1625–1634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Fuhrmann, J.; Subramanian, V.; Thompson, P.R. Targeting the Arginine Phosphatase YwIE with a Catalytic Redox-Based Inhibitor. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2024–2032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Fuhrmann, J.; Subramanian, V.; Kojetin, D.J.; Thompson, P.R. Activity-Based Profiling Reveals a Regulatory Link between Oxidative Stress and Protein Arginine Phosphorylation. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 967–977. [[CrossRef](#)]
57. Abuaita, B.H.; Schultz, T.L.; O’Riordan, M.X. Mitochondria-Derived Vesicles Deliver Antimicrobial Reactive Oxygen Species to Control Phagosome-Localized *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* **2018**, *24*, 625–636. [[CrossRef](#)]
58. Gaupp, R.; Ledala, N.; Somerville, G.A. Staphylococcal Response to Oxidative Stress. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2012**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Cosgrove, K.; Coutts, G.; Jonsson, I.-M.; Tarkowski, A.; Kokai-Kun, J.F.; Mond, J.J.; Foster, S.J. Catalase (KatA) and Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) Have Compensatory Roles in Peroxide Stress Resistance and Are Required for Survival, Persistence, and Nasal Colonization in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2006**, *189*, 1025–1035. [[CrossRef](#)]
60. Clauditz, A.; Resch, A.; Wieland, K.-P.; Peschel, A.; Götz, F. Staphyloxanthin Plays a Role in the Fitness of *Staphylococcus aureus* and Its Ability To Cope with Oxidative Stress. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 4950–4953. [[CrossRef](#)]
61. Pelz, A.; Wieland, K.-P.; Putzbach, K.; Hentschel, P.; Albert, K.; Götz, F. Structure and Biosynthesis of Staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32493–32498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Liu, G.Y.; Essex, A.; Buchanan, J.T.; Datta, V.; Hoffman, H.M.; Bastian, J.F.; Fierer, J.; Nizet, V. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 209–215. [[CrossRef](#)]
63. Olivier, A.C.; Lemaire, S.; Van Bambeke, F.; Tulkens, P.M.; Oldfield, E. Role of RsbU and Staphyloxanthin in Phagocytosis and Intracellular Growth of *Staphylococcus aureus* in Human Macrophages and Endothelial Cells. *J. Infect. Dis.* **2019**, *200*, 1367–1370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Clements, M.O.; Watson, S.P.; Foster, S.J. Characterization of the Major Superoxide Dismutase of *Staphylococcus aureus* and Its Role in Starvation Survival, Stress Resistance, and Pathogenicity. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 3898–3903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Valderas, M.W.; Hart, M.E. Identification and Characterization of a Second Superoxide Dismutase Gene (*sodM*) from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 3399–3407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Richardson, A.R.; Dunman, P.M.; Fang, F.C. The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. *Mol. Microbiol.* **2006**, *61*, 927–939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Flannagan, R.S.; Kuiack, R.C.; McGavin, M.J.; Heinrichs, D.E. *Staphylococcus aureus* Uses the GraXRS Regulatory System To Sense and Adapt to the Acidified Phagolysosome in Macrophages. *mBio* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Zhou, C.; Bhinderwala, F.; Lehman, M.K.; Thomas, V.C.; Chaudhari, S.S.; Yamada, K.J.; Foster, K.W.; Powers, R.; Kielian, T.; Fey, P.D. Urease is an essential component of the acid response network of *Staphylococcus aureus* and is required for a persistent murine kidney infection. *PLOS Pathog.* **2019**, *15*, e1007538. [[CrossRef](#)]
69. Boortz, C. YwIE and the Regulation of the Oxidative Stress Response in *Bacillus anthracis*. In *Ph.D. Thesis*; Texas Christian University: Fort Worth, TX, USA, 2016.
70. Moldovan, A.; Fraunholz, M.J. In or out: Phagosomal escape of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Microbiol.* **2019**, *21*, e12997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Russell, D.G.; VanderVen, B.C.; Glennie, S.; Mwandumba, H.; Heyderman, R.S. The macrophage marches on its phagosome: Dynamic assays of phagosome function. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 594–600. [[CrossRef](#)]

# Supplementary Material

## The phosphoarginine phosphatase PtpB from *Staphylococcus aureus* is involved in bacterial stress adaptation during infection

Mohamed Ibrahim Elhawry <sup>1,3</sup>, Sylvaine Huc-Brandt <sup>2</sup>, Linda Pätzold <sup>1</sup>, Laila Gannoun-Zaki <sup>2</sup>, Ahmed Mostafa M. Abdrabou <sup>1,4</sup>, Markus Bischoff <sup>1,\*</sup>, and Virginie Molle <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Saarland, Homburg/Saar, Germany

<sup>2</sup> Laboratory of Pathogen Host Interactions, Université de Montpellier, CNRS, UMR 5235, Montpellier, France

<sup>3</sup> Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, Zagazig, Egypt.

<sup>4</sup> Medical Microbiology and Immunology Department, Faculty of Medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt.

\* Correspondence: V.M. virginie.molle@umontpellier.fr; Tel.: +33 467144725; M.B. markus.bischoff@uks.eu, +49 6841 1623963

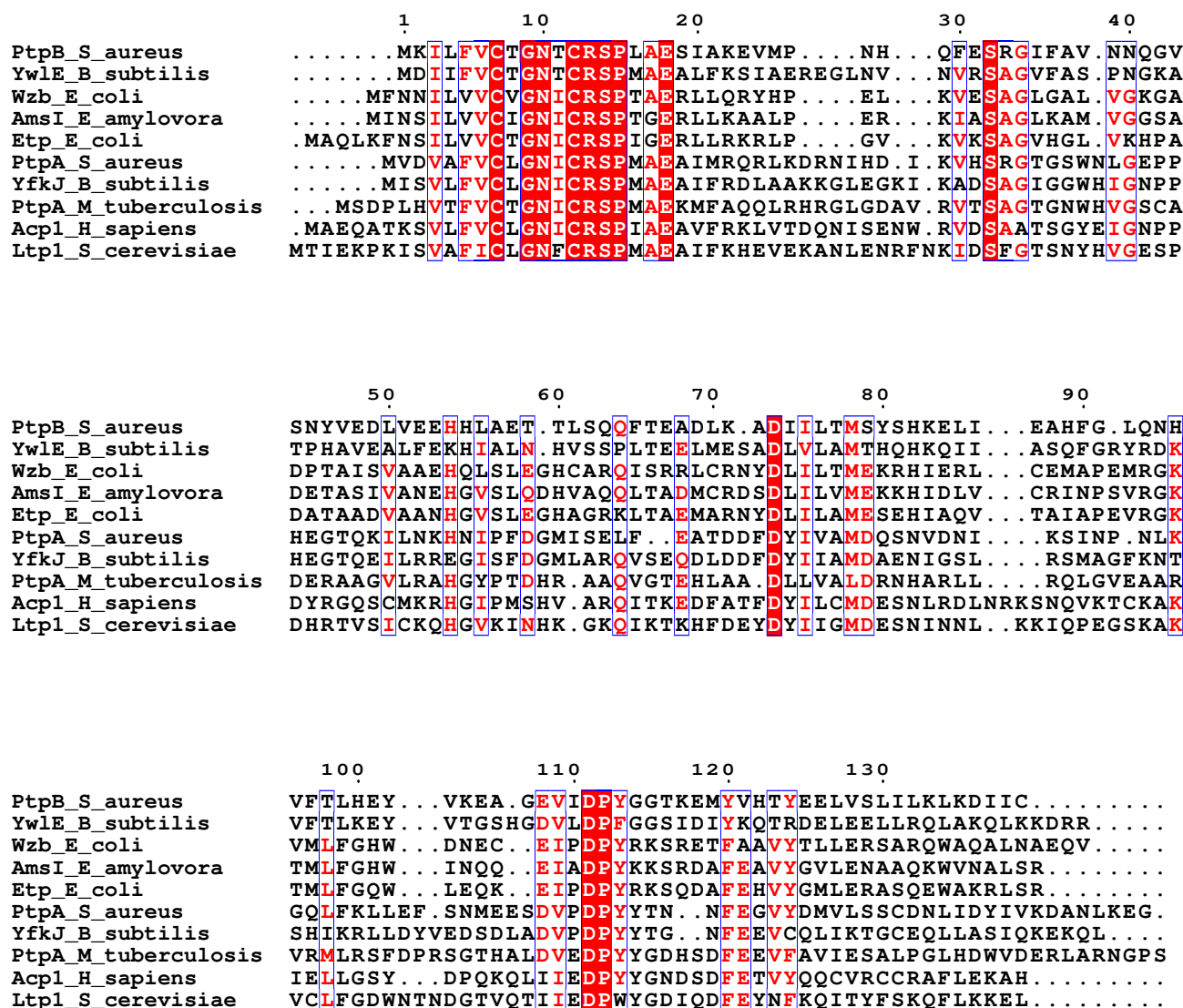
**Supplementary Table 1:** Primers used in this study.

Primer	Direction	Sequence (5'-3') <sup>1</sup>
<b>Cloning primer</b>		
MBH510	For.	gtcggT <u>ACCAACTGAAACAGTTT</u> TATGGAC
MBH511	Rev.	gtgctcgagACGAATAAAATCTTCATAGTTCACATCC
MBH512	For.	GATATTATTGCTAGTAGGA <u>ATTCTG</u>
MBH513	Rev.	gtcgcgCTCCATATTCAACGAAATTGTAG
VM11_PtpA_pRMC2	For.	tatGGT <u>ACCGGGATATAACTACATAGT</u>
VM11(1)_PtpA-spot-Ct_Gib	Rev.	CACGAACACGATCTGGCCCTTCTTTCAAATTTGC
VM11(2)_PtpA-spot-Ct_Gib	For.	GCAAATTTGAAAGAAGGGCCAGATCGTGTTCTGTG
VM26_PtpB_pRMC2	For.	TAAGCTT <u>GATGGTACATTATTA</u> AAGGATGTGAACT
VM27_PtpB-spot-Ct_Gib	Rev.	ACGATCTGGTGACCCGCAAATAATATCTTTTAATT
VM28_PtpB-Spot-Ct_Gib	For.	AAAGATATTATTTGCGGGTCACCAGATCGTGTTCCG
VM29_Spot-Ct_pRMC2	Rev.	GACGGCCAGTGA <u>ATTCTA</u> AAGAACTCCAATGTGATA
VM49_SecA_pRMC2	For.	TAAGCTT <u>GATGGTACAACAGTTTTT</u> TAGCTAAAGGAGC
VM50_SecA-spot-Ct_Gib	Rev.	ACGATCTGGTGACCCCTTTCCATGGCAATTTTTGAAT
VM51_SecA-spot-Ct_Gib	For.	AATTG <u>CCATGGAAA</u> AGGGTCACCAGATCGTGTTCCG
<b>qRT-PCR primer</b>		
<i>ahpC</i>	For.	TCCAACCTGAATTAGAAGACT
<i>ahpC</i>	Rev.	GAGAATACATTTACGCCTAAT
<i>crtM</i>	For.	ACAGTAGGTGAAGTATTGAC
<i>crtM</i>	Rev.	ATCGTATGTCTGATGTGTTT
<i>gyrB</i>	For.	GACTGATGCCGATGTGGA
<i>gyrB</i>	Rev.	AACGGTGGCTGTGCAATA
<i>hla</i>	For.	AACCCGGTATATGGCAATCAACT
<i>hla</i>	Rev.	CTGCTGCTTTCATAGAGCCATT
<i>katA</i>	For.	AATGGACAATGTATATCAAGT
<i>katA</i>	Rev.	ATCAAATGGATTATCTTTATGGT
<i>sodA</i>	For.	ACCAAGATAATCCATTAAGTGA
<i>sodA</i>	Rev.	ATTTTAGGTAATAAGCGTGTTT
<i>sodM</i>	For.	CCAAGATAATCCATTAACAGAA
<i>sodM</i>	Rev.	CCAACATCAAATAGTAAGATTG

<sup>1</sup> Small letters represent nucleotides that do not fit with the target sequence. Restriction sites used for cloning are underlined.



# Supplementary Figure 1



**Supplementary Figure 1: Alignment of LMW-PTPs.** Sequence alignment of LMW-PTPs from various species (the sequence names consist of the protein name followed by the source organism). Conserved residues are highlighted in red. The characters in red represent the conservative residues. This figure was created using the ESPript server (Robert & Gouet, 2014).

## **Publikation D - Evaluation of Bacterial RNA Polymerase Inhibitors in a *Staphylococcus aureus* Based Wound Infection Model in SKH1 Mice**

**Authors:** Jörg Haupenthal<sup>1,\*</sup>, Yannik Kautz<sup>2</sup>, Walid A. M. Elgaher<sup>1</sup>, Linda Pätzold<sup>2</sup>, Teresa Röhrig<sup>1</sup>, Matthias W. Laschke<sup>3</sup>, Thomas Tschernig<sup>4</sup>, Anna K. H. Hirsch<sup>1,5</sup>, Vadim Molodtsov<sup>6,7</sup>, Katsuhiko S. Murakami<sup>6</sup>, Rolf W. Hartmann<sup>1,5</sup> and Markus Bischoff<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Drug Design and Optimization, Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland (HIPS) – Helmholtz Centre for Infection Research (HZI), Campus Building E8.1, 66123 Saarbrücken, Germany

<sup>2</sup> Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Saarland University, 66421 Homburg/Saar, Germany

<sup>3</sup> Institute for Clinical & Experimental Surgery, Saarland University, 66421 Homburg/Saar, Germany

<sup>4</sup> Institute of Anatomy and Cell Biology, Saarland University, 66421 Homburg/Saar, Germany

<sup>5</sup> Department of Pharmacy, Saarland University, Campus Building E8.1, 66123 Saarbrücken, Germany

<sup>6</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Center for RNA Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA

<sup>7</sup> Current address: Waksman Institute and Department of Chemistry, Rutgers University, Piscataway NJ 08854, USA

\* Corresponding author. E-mail: Joerg.Haupenthal@Helmholtz-HIPS.de

**Abstract:** Chronic wounds infected with pathogens such as *Staphylococcus aureus* represent a worldwide health concern, especially in patients with a compromised immune system. As antimicrobial resistance has become an immense global problem, novel antibiotics are urgently needed. One strategy to overcome this threatening situation is the search for drugs targeting novel binding sites on essential and validated enzymes such as the bacterial RNA polymerase (RNAP). In this work, we describe the establishment of an *in vivo* wound infection model based on the pathogen *S. aureus* and hairless Crl:SKH1-Hrhr (SKH1) mice. The model proved to be a valuable preclinical tool to study selected RNAP inhibitors after topical application.

While rifampicin showed a reduction in the loss of body weight induced by the bacteria, an acceleration of wound healing kinetics, and a reduced number of colony forming units in the wound, the ureidothiophene-2- carboxylic acid 1 was inactive under *in vivo* conditions, probably due to strong plasma protein binding. The cocrystal structure of compound 1 with RNAP, that we hereby also present, will be of great value for applying appropriate structural modifications to further optimize the compound, especially in terms of plasma protein binding.

Reprint with kind permission of ACS Infectious Diseases.

*ACS Infect. Dis.* 2020, 6, 2573–2581

DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00034

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>



Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>



Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>



Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.  
Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00034>

**Publikation E - PLGA nanocapsules improve the delivery of clarithromycin to kill intracellular *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium abscessus***

**Authors:** Frantiescoli Anversa Dimer, PhD<sup>a, 1, 2</sup>, Cristiane de Souza Carvalho-Wodarz, PhD<sup>a, \*, 1</sup>, Adriely Goes, MSc<sup>a, d</sup>, Katarina Cirnski, MSc<sup>a, b</sup>, Jennifer Herrmann, PhD<sup>a, b</sup>, Viktoria Schmitta, <sup>b</sup>, Linda Pätzold, MSc<sup>e</sup>, Nadia Abed, PhD<sup>c</sup>, Chiara De Rossi, PhD<sup>a</sup>, Markus Bischoff, PhD<sup>e</sup>, Patrick Couvreur, PhD<sup>c</sup>, Rolf Müller, PhD<sup>a, b</sup>, Claus-Michael Lehr, PhD<sup>a, d, \*</sup>

<sup>a</sup> Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland (HIPS), Helmholtz Centre for Infection Research (HZI), Saarland University, Saarbrücken, Germany

<sup>b</sup> German Centre for Infection Research (DZIF), Partner Site Hannover-Braunschweig, Hannover, Germany

<sup>c</sup> Institut Galien Paris-Sud, UMR8612, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

<sup>d</sup> Department of Pharmacy, Saarland University, Saarbrücken, Germany

<sup>e</sup> Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Saarland University, Homburg, Germany.

**Abstract:** Drug delivery systems are promising for targeting antibiotics directly to infected tissues. To reach intracellular *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium abscessus*, we encapsulated clarithromycin in PLGA nanocapsules, suitable for aerosol delivery by nebulization of an aqueous dispersion. Compared to the same dose of free clarithromycin, nanoencapsulation reduced 1000 times the number of intracellular *S. aureus in vitro*. In RAW cells, while untreated *S. aureus* was located in acidic compartments, the treated ones were mostly situated in non-acidic compartments. Clarithromycin-nanocapsules were also effective against *M. abscessus* (70–80% killing efficacy). The activity of clarithromycin-nanocapsules against *S. aureus* was also confirmed *in vivo*, using a murine wound model as well as in zebrafish. The permeability of clarithromycin-nanocapsules across Calu-3 monolayers increased in comparison to the free drug, suggesting an improved delivery to sub-epithelial tissues. Thus, clarithromycin-nanocapsules are a promising strategy to target intracellular *S. aureus* and *M. abscessus*.

Reprint with kind permission of Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine (ELSEVIER).  
*Nanomedicine*. 2020 Feb;24:102125

DOI: 10.1016/j.nano.2019.102125



Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>



Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>



Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>



Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

Auf Grund von urheberrechtlichen Bestimmungen ist eine online Veröffentlichung der Publikation nicht möglich.

Sie finden den vollen Artikel unter folgendem Link:

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>

## Publikation F - IL-17C and IL-17RE Promote Wound Closure in a *Staphylococcus aureus*-Based Murine Wound Infection Model

**Authors:** Linda Pätzold <sup>1</sup>, Alexandra Stark <sup>2</sup>, Felix Ritzmann <sup>3</sup>, Carola Meier <sup>4</sup>, Thomas Tschernig <sup>4</sup>, Jörg Reichrath <sup>2</sup>, Robert Bals <sup>3</sup>, Markus Bischoff <sup>1,\*</sup> and Christoph Beisswenger <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Saarland University, 66421 Homburg, Germany;

linda.paetzold@uks.eu

<sup>2</sup> Department of Dermatology, Saarland University Hospital, 66421 Homburg, Germany;

Alexandra.Stark@uks.eu (A.S.); Joerg.Reichrath@uks.eu (J.R.)

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine V—Pulmonology, Allergology and Critical Care Medicine,

Saarland University, 66421 Homburg, Germany; Felix.Ritzmann@uks.eu (F.R.); Robert.Bals@uks.eu (R.B.)

<sup>4</sup> Institute of Anatomy and Cell Biology, Saarland University, 66421 Homburg, Germany;

Carola.Meier@uks.eu (C.M.); Thomas.Tschernig@uks.eu (T.T.)

\* Correspondence: markus.bischoff@uks.eu (M.B.); Christoph.Beisswenger@uks.eu (C.B.);

Tel.: +49-684-1162-3963 (M.B.); +49-684-1161-5868 (C.B.)

**Abstract:** The epithelial cytokine interleukin-17C (IL-17C) mediates inflammation through the interleukin 17 receptor E (IL-17RE). Prior studies showed a detrimental role of IL-17C in the pathogenesis of immune-mediated skin diseases (e.g., psoriasis). Here, we examined the role of IL-17C/IL-17RE in wound closure in a *Staphylococcus aureus* wound infection model. We demonstrate that wound closure is significantly delayed in IL-17RE (*Il-17re<sup>-/-</sup>*)- and 17C (*Il-17c<sup>-/-</sup>*)-deficient mice. There was no significant difference between WT, *Il-17re<sup>-/-</sup>*, and *Il-17c<sup>-/-</sup>* mice in the absence of infection. Deficiency for IL-17RE and IL-17C did not significantly affect the elimination of bacteria. IL-17C expression was increased in the epidermis of human *S. aureus*-infected skin. Our results indicate that the IL-17C/IL-17RE axis contributes to the closure of infected wounds but does not contribute to the elimination of *S. aureus*.

Reprint with kind permission of Microorganisms (MDPI).

*Microorganisms* 2021, 9(9), 1821

DOI: 10.3390/microorganisms9091821



Communication

# IL-17C and IL-17RE Promote Wound Closure in a *Staphylococcus aureus*-Based Murine Wound Infection Model

Linda Pätzold<sup>1</sup>, Alexandra Stark<sup>2</sup>, Felix Ritzmann<sup>3</sup>, Carola Meier<sup>4</sup>, Thomas Tschernig<sup>4</sup> , Jörg Reichrath<sup>2</sup>, Robert Bals<sup>3</sup>, Markus Bischoff<sup>1,\*</sup> and Christoph Beisswenger<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Saarland University, 66421 Homburg, Germany; linda.paetzold@uks.eu

<sup>2</sup> Department of Dermatology, Saarland University Hospital, 66421 Homburg, Germany; Alexandra.Stark@uks.eu (A.S.); Joerg.Reichrath@uks.eu (J.R.)

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine V—Pulmonology, Allergology and Critical Care Medicine, Saarland University, 66421 Homburg, Germany; Felix.Ritzmann@uks.eu (F.R.); Robert.Bals@uks.eu (R.B.)

<sup>4</sup> Institute of Anatomy and Cell Biology, Saarland University, 66421 Homburg, Germany; Carola.Meier@uks.eu (C.M.); Thomas.Tschernig@uks.eu (T.T.)

\* Correspondence: markus.bischoff@uks.eu (M.B.); Christoph.Beisswenger@uks.eu (C.B.); Tel.: +49-684-1162-3963 (M.B.); +49-684-1161-5868 (C.B.)

**Abstract:** The epithelial cytokine interleukin-17C (IL-17C) mediates inflammation through the interleukin 17 receptor E (IL-17RE). Prior studies showed a detrimental role of IL-17C in the pathogenesis of immune-mediated skin diseases (e.g., psoriasis). Here, we examined the role of IL-17C/IL-17RE in wound closure in a *Staphylococcus aureus* wound infection model. We demonstrate that wound closure is significantly delayed in IL-17RE (*Il-17re*<sup>-/-</sup>)- and 17C (*Il-17c*<sup>-/-</sup>)-deficient mice. There was no significant difference between WT, *Il-17re*<sup>-/-</sup>, and *Il-17c*<sup>-/-</sup> mice in the absence of infection. Deficiency for IL-17RE and IL-17C did not significantly affect the elimination of bacteria. IL-17C expression was increased in the epidermis of human *S. aureus*-infected skin. Our results indicate that the IL-17C/IL-17RE axis contributes to the closure of infected wounds but does not contribute to the elimination of *S. aureus*.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; wound infection; interleukin-17C; wound closure



**Citation:** Pätzold, L.; Stark, A.; Ritzmann, F.; Meier, C.; Tschernig, T.; Reichrath, J.; Bals, R.; Bischoff, M.; Beisswenger, C. IL-17C and IL-17RE Promote Wound Closure in a *Staphylococcus aureus*-Based Murine Wound Infection Model.

*Microorganisms* **2021**, *9*, 1821.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091821>

Academic Editor: Rajan P. Adhikari

Received: 15 June 2021

Accepted: 13 August 2021

Published: 27 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The interleukin 17 (IL-17) family comprises six subtypes (IL-17 A to F) which bind to homo- and hetero-dimeric receptor complexes of the IL-17 receptor family (IL-17RA to IL-17RE) [1]. IL-17C is mainly expressed by epithelial cells and mediates the expression of cytokines, chemokines, and antimicrobial peptides through a receptor complex of IL-17RA and IL-17RE, NF-κB, and MAP kinases [2–4]. Inflammatory mediators (e.g., TNF-α, IL-1β) induce the expression of IL-17C in keratinocytes [2,3,5–9]. Thus, a variety of studies have examined the function of IL-17C in the context of psoriasis and atopic dermatitis. Johnston et al. [8] showed that the overexpression of IL-17C in keratinocytes resulted in an increased proliferation of keratinocytes and the development of a psoriasisiform-skin phenotype in mice. Ramirez-Carrozzi et al. [3] demonstrated that IL-17C promotes imiquimod-dependent skin-inflammation, epidermal thickening, and keratinocyte proliferation. In addition, studies have demonstrated that IL-17C is expressed in the skin of patients with atopic dermatitis, and that the treatment with therapeutic antibodies directed against IL-17C decreased skin inflammation in IL-23- and calcipotriol-dependent mouse models of psoriasis and atopic dermatitis, respectively [5,6,8].

Bacterial infections of wounds are a major health issue worldwide and cause considerable costs to public health care systems [10]. A commonly found bacterial species in chronic wound infection is *Staphylococcus aureus*, which delays wound closure and causes pain to the patient [10]. Notably, Roth et al. [11] showed that the pattern recognition receptor

NOD2 mediates *S. aureus*-induced IL-17C expression in keratinocytes. Given that IL-17C mediates keratinocyte proliferation and epidermal thickening in experimental models of psoriasis and atopic dermatitis, we wondered about the function(s) of the IL-17C/IL-17RE axis in the healing of wounds infected with *S. aureus*. Here, we studied the function of the IL-17C/IL-17RE axis in a murine *S. aureus* wound infection model and determined the expression of IL-17C in human *S. aureus*-infected skin.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. *S. aureus*-Based Murine Wound Infection Model

Animal experiments were performed with approval of the local State Review Boards of Saarland, Germany (project identification codes 41/2017, approved 19 January 2018, and 30/2018, approved 2 August 2018) and were conducted following the national and European guidelines for the ethical and human treatment of animals. Wounds were introduced in the flanks of female 8- to 12-week-old wild-type (WT), IL-17C-deficient (*Il-17c*<sup>-/-</sup> [12]), and IL-17RE-deficient (*Il-17re*<sup>-/-</sup> [13]) mice (all C57BL/6 background) as described before [14]. In brief, anesthetized mice were treated with carprofen (5 mg/kg bodyweight; Zoetis, Berlin, Germany) and both flanks were shaved and depilated with asid-med hair removal cream (Asid Bonz, Herrenberg, Germany). Skin was disinfected and one full-thickness wound was created on each side with a sterile 5 mm biopsy punch (pfm medical, Köln, Germany). Wounds were stabilized with silicon O-rings (external diameter of 5.5 mm; HUG, Ergolding, Germany) until day 2 to prevent wound healing by contraction and were inoculated with  $1 \times 10^5$  colony-forming units (CFU) of *S. aureus* strain Newman [15] or phosphate-buffered saline (PBS) without bacteria (control) directly after wounding. The bacterial inoculum was prepared by diluting bacteria from overnight cultures in tryptic soy broth (TSB; BD, Heidelberg, Germany) to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.05, and incubating the cultures at 37 °C and 225 rpm with a flask-to-medium ratio of 10:1. After 2–2.5 h of growth, cells were harvested by centrifugation, washed twice with PBS, and resuspended in PBS to an OD<sub>600</sub> of 0.1 ( $\sim 1 \times 10^7$  CFU/mL). A 10 µl aliquot of the bacterial solution was spotted onto the wound and allowed to infiltrate into the wound bed for 5 min. Afterwards, wounds were covered with air-permeable Tegaderm films (3M, Neuss, Germany), and animals were monitored daily. At day 6 post-infection, wounds were documented, the mice sacrificed, and the wound areas excised and homogenized in PBS with a hand dispenser (Polytron PT 1200 E Kinematica, Eschbach, Germany). Numbers of CFU were determined by plating serial dilutions on sheep blood agar.

### 2.2. Cytokine Determinations in Wound Tissue Homogenates

Wound homogenates obtained from excised wound areas of *S. aureus*-infected WT-, *Il-17c*<sup>-/-</sup>, and *Il-17re*<sup>-/-</sup> mice at day 6 post-infection were centrifugated at 4 °C and 2500 × g for 10 min. Concentrations of cytokines were measured in supernatants using ELISAs for G-CSF, IL-6, KC, MIP-2, and TNF-α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) as described by the manufacturer.

### 2.3. Histologic and Immunohistochemical Analyses of Infected Wounds

On day 6 post-infection, mice were euthanized, the entire wound areas excised and fixed overnight in 4% buffered paraformaldehyde at 4 °C, followed by dehydration and embedding of the samples in paraffin. Skin sections were cut into 5 µm in thickness, and placed on slides. Hematoxylin and eosin (H&E)-stained slides were prepared using routine methods. Ki-67 was stained with the primary antibody ab15580, and CD68 with the primary antibody ab125212 (Abcam, Cambridge, UK). Corresponding HRP-conjugated secondary antibodies (Histofine Simple Stain, Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) were used as described in [16]. Keratin 5 (K5) was stained with the primary antibody ab64081 (Abcam), followed by the HRP-conjugated secondary antibody inv10547 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Photomicrographs of H&E-, CD68- and K5-stained wound sections were taken with a Leica DM100 system (Leica, Wetzlar, Germany) and a MikroCam SP 5.1 microscope

camera (Bresser, Rhede, Germany) at 4 to 40-fold magnification. Polymorphonuclear neutrophil (PMN) and macrophage (CD68) numbers in the dermal regions of the infected wounds edges were determined in two randomly chosen high-power fields per slide blinded to the investigator and calculated to numbers/mm<sup>2</sup>. K5 staining intensities of the keratinocytes in the epidermis of infected wound edges were scored (2 = intense staining; 1 = medium staining; 0 = weak to no staining) and a mean score index was calculated per wound. Images of Ki-67 labeled wound sections were taken with an Olympus BX51 microscope system (Olympus, Shinjuku, Japan) using the software Cell Sense Dimension version 1.5 (Olympus). Ki-67-positive cells were counted in the epidermal regions of infected wound edges. The Ki-67 proliferation index was defined as Ki-67-positive cells per 100 cells.

#### 2.4. IL-17C Determinations in *S. aureus*-Infected Wound Biopsies

*S. aureus*-infected wound biopsies and skin biopsies from uninfected donors that were sampled for clinical purposes were obtained anonymously from the Clinic for Dermatology, Venereology and Allergology, Saarland University Hospital, Homburg, Germany. Subsequent usage of these biopsies for research purposes was approved by the Ethics Committee of the Medical Association of Saarland (code number 178/11, approved 10 October 2011). Immunohistochemical staining for IL-17C in human skin sections was performed as described before [17]. IL-17C staining intensities in the epidermal and dermal regions were determined using the image analysis software program Fiji [18], version 1.53c, and normalized to the intensities of the control stain hematoxylin in the respective regions. To determine the IL-17C staining intensity, several images of representative areas were taken for each patient (1 slide per patient). The mean intensity of the whole documented tissue was measured for each field. The data points represent the average of multiple fields from the same slide.

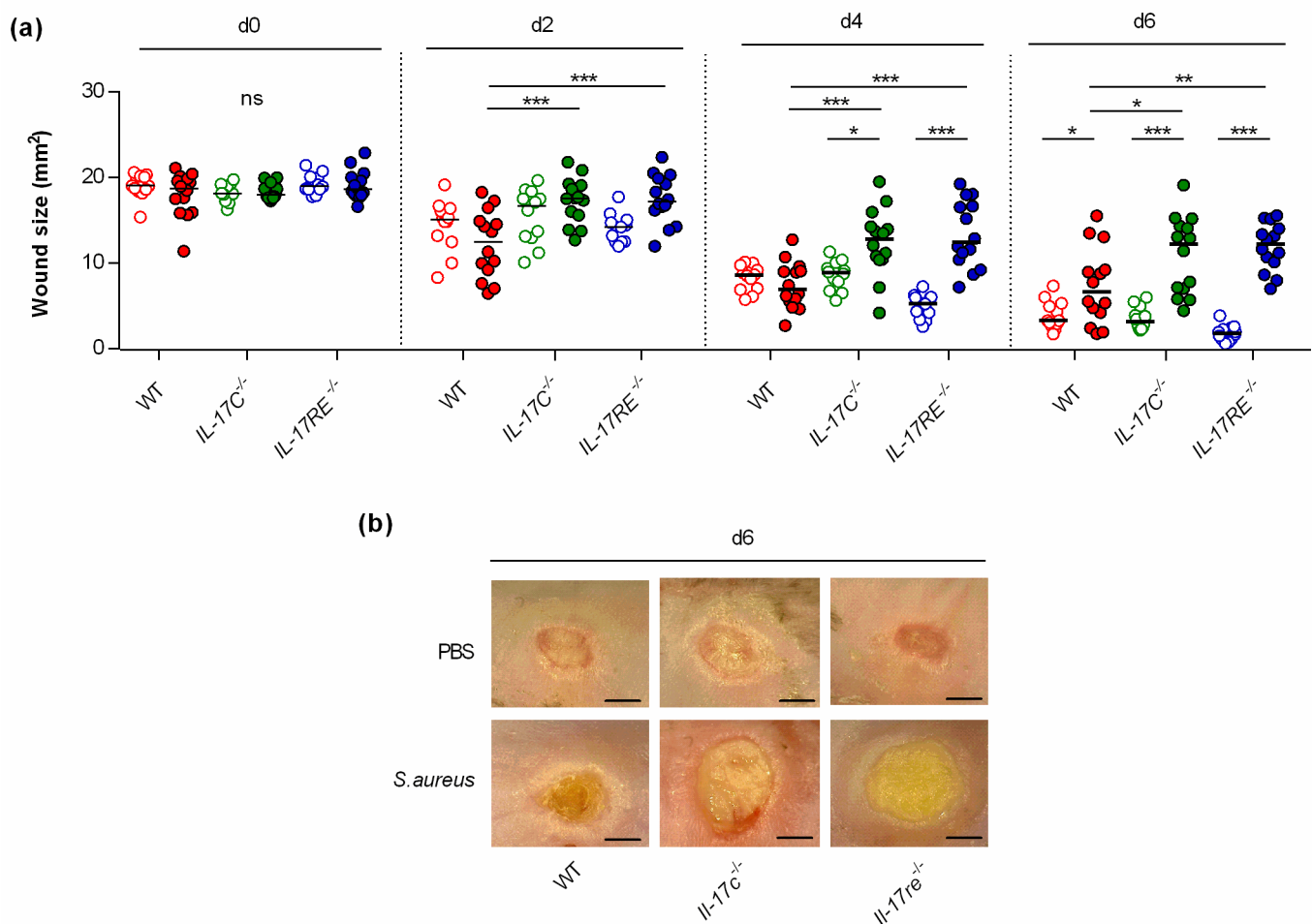
#### 2.5. Statistical Analyses

The statistical significance of changes between groups was determined using the Graph-Pad software package Prism 6.01. Identified *p*-values < 0.05 were considered statistically significant. Comparisons between groups were analyzed by a two-way ANOVA and Holm–Sidak’s post hoc test, a one-way ANOVA and Holm–Sidak’s multiple comparison test, or the unpaired Student’s *t*-test as indicated in the figure legends.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Infection with *S. aureus* Results in a Delayed Wound Closure in *Il-17c*<sup>-/-</sup> and *Il-17re*<sup>-/-</sup> Mice

To study the function of the IL-17C/IL-17RE axis in wound healing, punch wounds were introduced on both flanks of WT-, *Il-17c*<sup>-/-</sup>, and *Il-17re*<sup>-/-</sup> mice, respectively, either infected with approximately 10<sup>5</sup> CFU of *S. aureus* strain Newman or treated with an equal volume of PBS as sham-infected control, and wound closure was monitored after day 2, 4, and 6 post-infection (Figure 1). This analysis revealed no clear difference in the wound closure rates between sham-infected WT-, *Il-17c*<sup>-/-</sup>, and *Il-17re*<sup>-/-</sup> mice after 6 days of infection. However, a significant decrease in wound closure was observed in the *S. aureus* Newman-infected WT mice at day 6 post-infection (Figure 1a,b), in line with earlier observations [14]. Notably, the average wound sizes at 2, 4 and 6 days after wounding were significantly increased in infected *Il-17c*<sup>-/-</sup> and *Il-17re*<sup>-/-</sup> mice when compared with those of infected WT mice (Figure 1a), suggesting that the IL-17C/IL-17-RE axis is negligible for the wound healing of uninfected wounds but is important for the wound healing capacity of *S. aureus*-infected wounds.



**Figure 1.** The deficiency for IL-17C and IL-17RE results in a delayed closure of infected wounds. Wounds were introduced into the flanks of WT (red symbols), *Il-17c*<sup>-/-</sup> (green symbols) and *Il-17re*<sup>-/-</sup> (blue symbols) mice and infected with 10<sup>5</sup> CFU of *S. aureus* strain Newman (filled symbols) or PBS (open symbols) as control. (a) The averaged wound areas (mm<sup>2</sup>) are shown 0, 2, 4, and 6 days after wounding (n = 12–14 per group). Each symbol represents an individual wound. Horizontal bars indicate the median of all observations. Data were compared by a two-way ANOVA and Holm–Sidak’s post hoc test. \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001; ns, not significant. (b) Representative images of wounds 6 days after wounding. Scale bar, 2 mm.

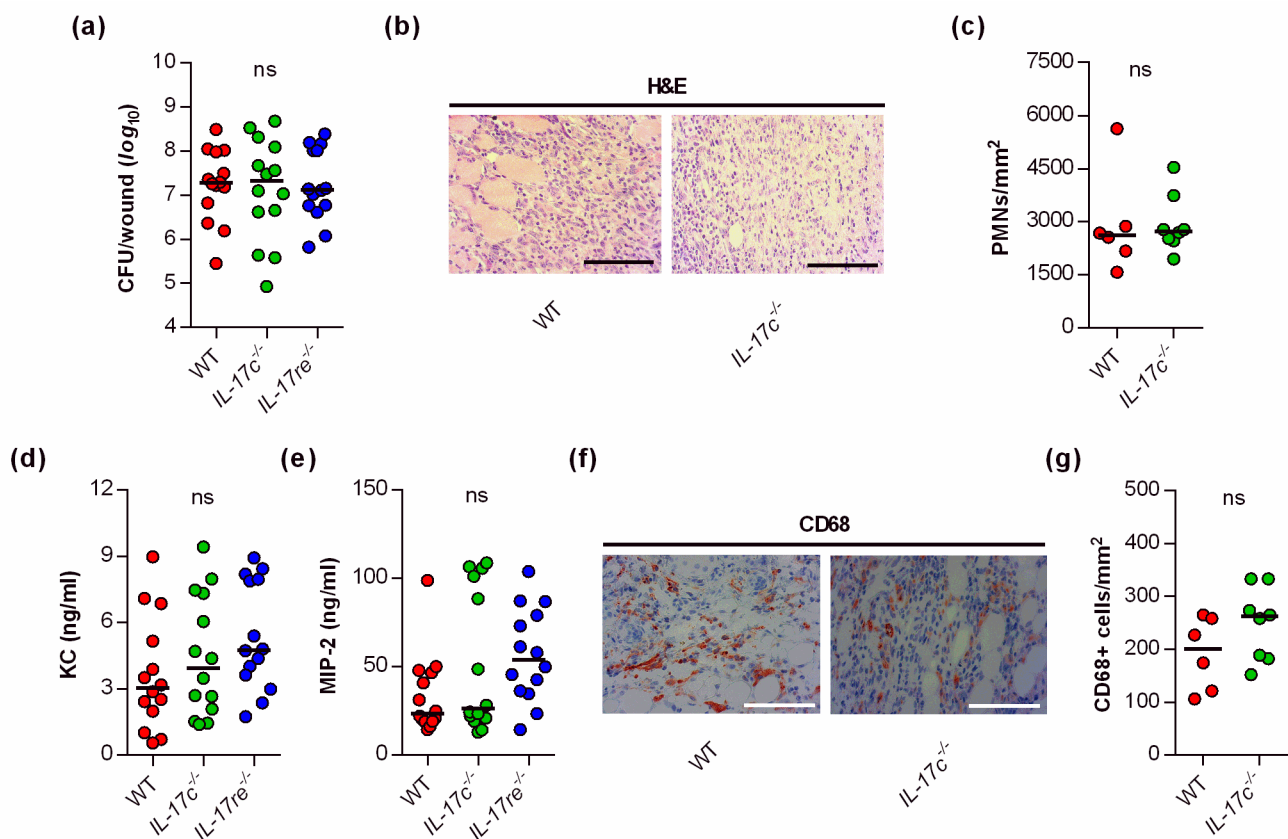
### 3.2. The Deficiency for IL-17C and IL-17RE Neither Affects Bacterial Numbers in *S. aureus*-Infected Wounds nor the Recruitment of Polymorphonuclear Neutrophils

Given the significant impact of the IL-17C and IL-17RE deficiency on the wound healing kinetics of *S. aureus*-infected wounds, we wondered whether and how the IL-17C/IL-17RE axis affects the bacterial burden and immune cell recruitment in the infected tissue. Thus, we next determined the bacterial loads in wound tissues obtained from *S. aureus*-infected WT, *Il-17c*<sup>-/-</sup> and *Il-17re*<sup>-/-</sup> mice at day 6 post-infection (Figure 2a).

Surprisingly, neither the lack of IL-17C nor IL-17RE markedly affected the bacterial loads in the wounds at the end of the experiment (i.e., 6 days post-infection). There was also no significant difference in the bacterial loads between WT and *Il-17re*<sup>-/-</sup> mice 2 days post-infection (data not shown). Similarly, we did not observe clear differences in PMN contents in the infected wound tissues of *S. aureus*-infected WT and *Il-17c*<sup>-/-</sup> mice at day 6 post-infection (Figure 2b,c). In line with the latter observation, we also failed to detect clear differences in keratinocyte-derived chemokine (KC, CXCL1) and macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2, CXCL2) contents in wound homogenates of *S. aureus*-infected WT, *Il-17c*<sup>-/-</sup>, and *Il-17re*<sup>-/-</sup> mice at day 6 post-infection (Figure 2d,e), two major players in neutrophil recruitment to infected tissues [19], although concentrations of MIP-2

were about twice as high in *Il-17re*<sup>-/-</sup> mice than in WT mice (Figure 2e;  $p = 0.148$  [one-way ANOVA and Holm–Sidak’s multiple comparison test]).

To test whether the IL-17C/IL-17RE axis might affect the influx of macrophages/monocytes into the infected wound areas, we additionally stained wound sections of *S. aureus*-infected wild-type and *Il-17c*<sup>-/-</sup> mice for CD68, a marker for mononuclear phagocytes [20]. Numbers of CD68 positive cells were slightly, but not significantly increased in wounds of *Il-17c*<sup>-/-</sup> mice at day 6 post-infection (Figure 2f,g). Taken together, these findings suggest that the IL-17C/IL-17RE axis seems to play neither a major role in the elimination of the bacterial load nor in the recruitment of PMNs/macrophages to the infected wound tissue, at least during the later stage of infection.



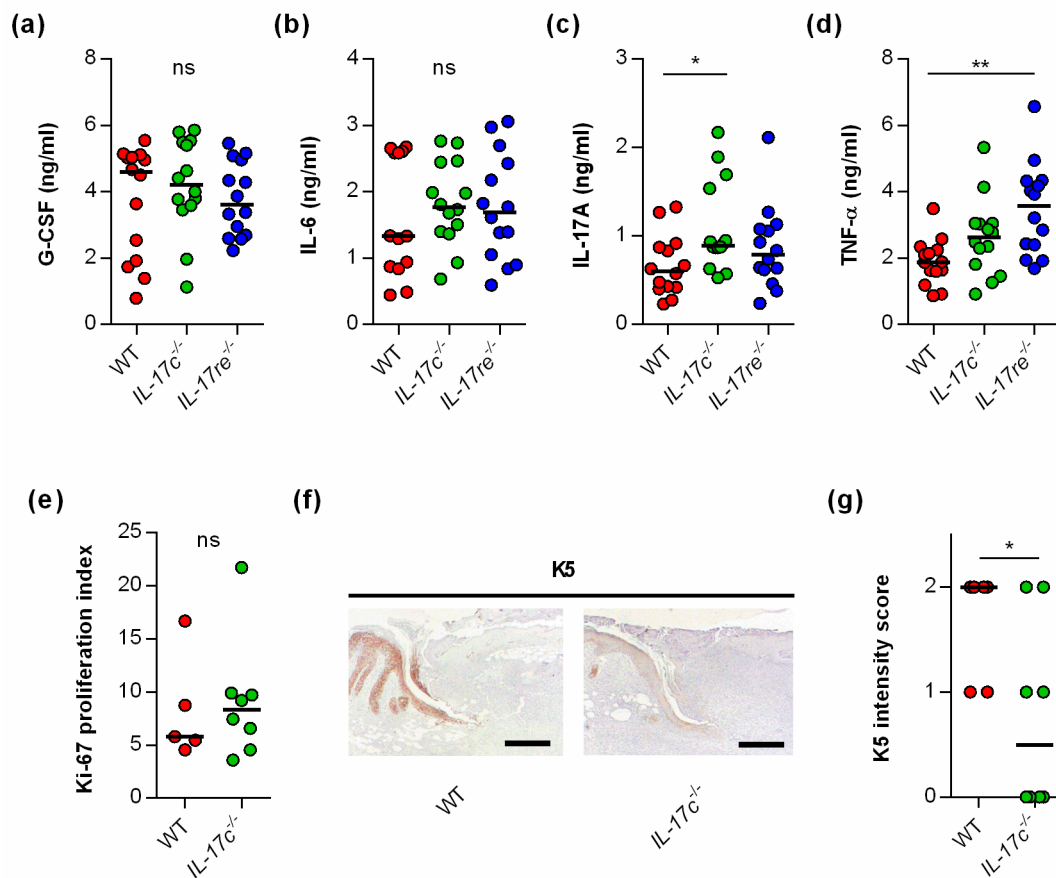
**Figure 2.** The deficiency for IL-17C and IL-17RE does not affect the bacterial load and PMN content of *S. aureus*-infected wounds. (a) Numbers of viable bacteria (CFU) in wounds of WT (red symbols), *Il-17c*<sup>-/-</sup> (green symbols) and *Il-17re*<sup>-/-</sup> (blue symbols) mice at 6 days post-infection. (b) Representative images of hematoxylin–eosin (H&E)-stained tissue sections obtained from *S. aureus*-infected wounds of wild-type and *Il-17c*<sup>-/-</sup> mice at 6 days post-infection. Scale bar, 100  $\mu$ m. (c) Numbers of PMNs in the dermal regions of the infected wounds ( $n = 6$ –8 per group). (d,e) Concentrations of KC (d) and MIP-2 (e) in wound homogenates of 6-day-old *S. aureus*-infected wounds ( $n = 14$  per group). (f) Representative images of CD68-stained tissue sections obtained from *S. aureus*-infected wounds of wild-type and *Il-17c*<sup>-/-</sup> mice at 6 days post-infection. Scale bar, 100  $\mu$ m. (g) Numbers of CD68<sup>+</sup> cells in the dermal regions of the infected wounds ( $n = 6$ –8 per group). Each symbol represents an individual wound. Horizontal bars indicate the median of all observations. Data were compared by a one-way ANOVA and Holm–Sidak’s multiple comparison test (a,d,e) or the unpaired Student’s *t*-test (c). ns, not significant.

### 3.3. The Deficiency for IL-17C and IL-17RE Only Marginally Affects the Contents of Wound-Healing-Associated Cytokines and Cell Proliferation in *S. aureus*-Infected Wounds

To test whether the IL-17C/IL-17RE axis might affect tissue repair of *S. aureus*-infected wounds via the modulation of other wound-healing promoting/decelerating cytokines, we next determined the concentrations of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) [21],



interleukin-6 (IL-6) [22], interleukin-17A (IL-17A) [23], and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [24] in wound homogenates (Figure 3).



**Figure 3.** The deficiency for IL-17C and IL-17RE does only marginally affect the contents of wound-healing-associated cytokines in *S. aureus*-infected wounds. (a–d) Concentrations of G-CSF (a), IL-6 (b), IL-17A (c), and TNF- $\alpha$  (d) in wound homogenates of 6 days old *S. aureus*-infected wounds ( $n = 14$  per group). (e) Ki-67 proliferation indices of tissue sections obtained from *S. aureus*-infected wounds of wild-type and *IL-17c*<sup>-/-</sup> mice at 6 days post-infection ( $n = 5-7$ ). (f) Representative images of K5-stained tissue sections obtained from *S. aureus*-infected wounds of WT and *IL-17c*<sup>-/-</sup> mice at 6 days post-infection. Scale bar, 1 mm. (g) Intensity scores of K5-positive cells in the epidermal regions of the infected wound edges ( $n = 6-8$  per group). Each symbol represents an individual wound. Horizontal bars indicate the median of all observations. Data were compared by one-way ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparison test (a–d) or the unpaired Student's *t*-test (e,g). ns, not significant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

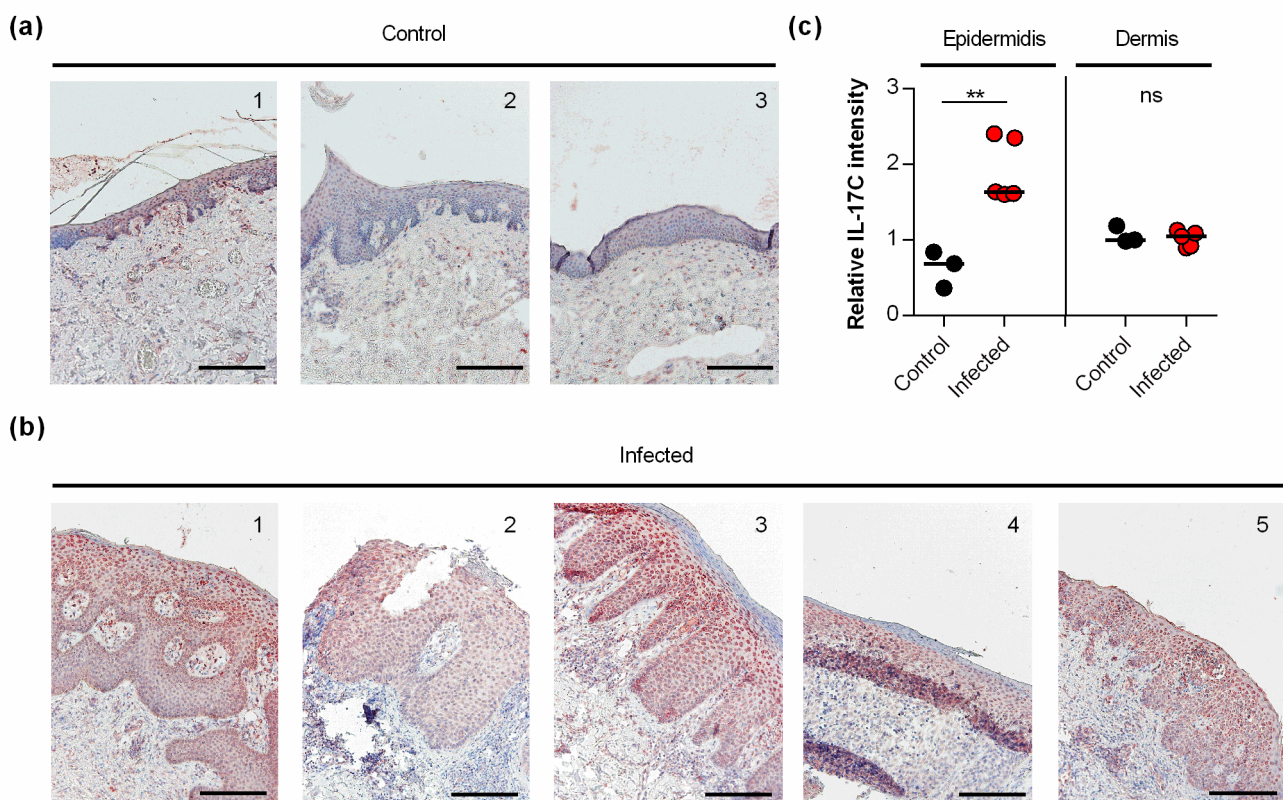
No clear differences in cytokine levels were observed in wound homogenates of *S. aureus*-infected WT, *IL-17c*<sup>-/-</sup>, and *IL-17re*<sup>-/-</sup> mice for the wound-closure-accelerating cytokines G-CSF and IL-6 [21,22] (Figure 3a,b). However, significant differences in cytokine expression between *S. aureus*-infected WT, *IL-17c*<sup>-/-</sup> and *IL-17re*<sup>-/-</sup> mice were found for the skin wound-healing-impairing cytokines IL-17A and TNF- $\alpha$  [23,24] at day 6 post-infection, which were significantly increased in wound homogenates obtained from *IL-17c*<sup>-/-</sup> mice and *IL-17re*<sup>-/-</sup> mice, respectively (Figure 3c,d).

To test whether the IL-17C/IL-17RE axis might promote wound closure of *S. aureus*-infected wounds by stimulating cell proliferation or keratinocyte differentiation, we also determined the Ki-67 and keratin 5 (K5) contents in wound edges of *S. aureus*-infected WT and *IL-17c*<sup>-/-</sup> mice at day 6 post-infection (Figure 3e–g). Although no clear difference in the Ki-67 proliferative indices between the wounds of *S. aureus*-infected WT and *IL-17c*<sup>-/-</sup> mice were identified (Figure 3e), we observed a higher K5 staining intensity in the epidermal regions of *S. aureus*-infected wound edges obtained from wild-type mice (Figure 3f,g).

Taken together, these data suggest that the IL-17C/IL-17RE axis might promote the wound closure of *S. aureus*-infected wounds via the modulation of IL17A/TNF- $\alpha$  expression and/or the formation of K5/K14 intermediate filament-producing keratinocytes at the wound edges but does not markedly alter cell proliferation in *S. aureus*-infected wounds.

### 3.4. IL-17C Is Expressed in *S. aureus*-Infected Human Skin

Earlier work demonstrated that *S. aureus* induces the transcription of IL-17C in keratinocytes via NOD2 activation [11]. However, to the best of our knowledge, it remains unknown whether and how *S. aureus* affects the expression of IL-17C in infected skin. Thus, we also evaluated whether and how IL-17C is expressed in *S. aureus*-infected human skin (Figure 4). We found strong expression of IL-17C in tissue slices of *S. aureus*-infected skin biopsies, particularly in the granular and spinous layers of the harmed epidermis (i.e., stratum granulosum and stratum spinosum; Figure 4a). Semi-quantitative evaluation of the IL-17C staining showed that the expression of IL-17C was significantly increased in the epidermis of *S. aureus*-infected skin biopsies compared to non-infected control biopsies, whereas no clear differences in IL-17C staining were observed in the dermal regions of *S. aureus*-infected and non-infected biopsies (Figure 4b), suggesting that IL-17C production is increased, particularly in the epidermal regions of *S. aureus*-infected wound but not in the lower parts of the infected skin.



**Figure 4.** IL-17C is expressed in *S. aureus*-infected skin (a,b). IL-17C was detected by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded skin samples obtained from 3 non-infected individuals (a) and 5 patients with *S. aureus* skin infection (b). Scale bar, 100  $\mu$ m. (c) The relative IL-17C intensity was quantified in the epidermis and dermis in relation to the staining intensities seen with hematoxylin in the respective regions. Relative IL-17C intensities between non-infected (black symbols) and *S. aureus* infected (red symbols) wound biopsies were compared by unpaired Student's *t*-test. \*\*,  $p < 0.01$ .

## 4. Conclusions

Here, we demonstrate that the IL-17C/IL-17RE axis promotes wound closure in a *S. aureus* wound infection model; however, it does not affect immune cell recruitment,

bacterial clearance, or the expression of wound-healing-associated cytokines. Additionally, we could not identify any function for IL-17C and IL-17RE in the absence of infection. As the expression of IL-17C depends on microbial factors and inflammatory mediators, the latter result was to be expected. We further demonstrated that the expression of IL-17C is increased in the epidermis of *S. aureus*-infected human skin. Increased expression of IL-17C could also be detected in psoriasis and atopic dermatitis [6,8]. Thus, epidermal expression of IL-17C seems to be a common feature of inflamed skin. Contrary to our wound model, pre-clinical studies showed a detrimental role of the IL-17C/IL-17RE axis in the pathogenesis of immune-mediated skin diseases. Different mouse models of psoriasis and atopic dermatitis demonstrated that IL-17C mediates skin inflammation, epidermal thickening, and keratinocyte proliferation [3,5,6,8]. Our finding that wound healing is delayed in infected wounds in the absence of IL-17C and IL-17RE is in line with the mentioned studies. In our wound-healing model, as well as in the models of experimental psoriasis and in lung cancer models [3,8,16], IL-17C mediates cell proliferation and growth. Thus, IL-17C/IL-17RE contributes to wound healing in infected wounds, but is detrimental in immune-mediated diseases, such as psoriasis. Moreover, *S. aureus* is frequently found in the skin of patients with psoriasis and atopic dermatitis [25,26]. Therefore, it is tempting to speculate whether *S. aureus* contributes to the expression of IL-17C in psoriasis and atopic dermatitis and, thereby, to the IL-17C-mediated disease progression. The elimination of an aberrant microbiota often found in these chronic skin diseases [27] could result in a reduced IL-17C-mediated skin inflammation and keratinocyte proliferation.

Our study has limitations. We did not analyze, in depth, the cellular mechanisms underlying IL-17C/IL-RE-mediated healing of infected wounds. As delayed wound closure in IL-17C- and IL-17RE-deficient mice was already visible at 2 days post-infection, IL-17C/IL-17RE-mediated cell proliferation and differentiation is likely an early event in our model. Roth et al. [11] showed that viable *S. aureus* induced IL-17C expression in keratinocytes within 6 h post-infection. Thus, it is possible that IL-17C accelerates wound closure by supporting keratinocyte survival and the differentiation of wounds shortly after infection without affecting the clearance of *S. aureus*. In the later course of infection, IL-17A (which shares the receptor IL-17RA with IL-17C) released from immune cells such as  $\gamma\delta$  T cell may compensate the loss of IL-17C-signaling in *S. aureus*-infected wounds [28,29]. This may explain why we could not detect a clear difference in the proliferation index at 6 days post-infection when the wound lesions were embedded, although an increased expression of K5 was noticed in keratinocytes at the wound edges of *S. aureus*-infected WT mice. The molecular mechanism(s) modulated by IL-17C/IL-17RE to promote K5 expression and wound closure of *S. aureus*-infected wounds still needs to be identified.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.P., M.B. and C.B.; methodology, L.P.; validation, L.P., M.B. and C.B.; formal analysis, L.P., T.T., M.B. and C.B.; investigation, L.P., A.S., C.M., T.T. and F.R.; resources, C.M., R.B. and J.R.; writing—original draft preparation, L.P., M.B. and C.B.; writing—review and editing, L.P., M.B., T.T. and C.B.; visualization, L.P., M.B. and C.B.; supervision, M.B. and C.B.; project administration, C.B. and M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** We acknowledge the support by the DFG and Saarland University within the funding program Open Access Publishing.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Medical Association of Saarland (code number 178/11, approved 10 October 2011).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Acknowledgments:** The authors thank Andreas Kamyschnikow, Anja Honecker (Saarland University, Department of Internal Medicine V), and Alexander Grißmer (Saarland University, Institute of Anatomy and Cell Biology) for excellent technical support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Monin, L.; Gaffen, S.L. Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a028522. [[CrossRef](#)]
2. Song, X.; Zhu, S.; Shi, P.; Liu, Y.; Shi, Y.; Levin, S.D.; Qian, Y. IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 1151–1158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ramirez-Carozzi, V.; Sambandam, A.; Luis, E.; Lin, Z.; Jeet, S.; Lesch, J.; Hackney, J.; Kim, J.; Zhou, M.; Lai, J.; et al. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 1159–1166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kusagaya, H.; Fujisawa, T.; Yamanaka, K.; Mori, K.; Hashimoto, D.; Enomoto, N.; Inui, N.; Nakamura, Y.; Wu, R.; Maekawa, M.; et al. Toll-like receptor-mediated airway IL-17C enhances epithelial host defense in an autocrine/paracrine manner. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2014**, *50*, 30–39. [[CrossRef](#)]
5. Lauffer, F.; Jargosch, M.; Baghin, V.; Krause, L.; Kempf, W.; Absmaier-Kijak, M.; Morelli, M.; Madonna, S.; Marsais, F.; Lepescheux, L.; et al. IL-17C amplifies epithelial inflammation in human psoriasis and atopic eczema. *J. Eur. Acad. Derm. Venereol.* **2020**, *34*, 800–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vandeghinste, N.; Klattig, J.; Jagerschmidt, C.; Lavazais, S.; Marsais, F.; Haas, J.D.; Auberval, M.; Lauffer, F.; Moran, T.; Ongenaert, M.; et al. Neutralization of IL-17C Reduces Skin Inflammation in Mouse Models of Psoriasis and Atopic Dermatitis. *J. Invest. Derm.* **2018**, *138*, 1555–1563. [[CrossRef](#)]
7. Peng, T.; Chanthaphavong, R.S.; Sun, S.; Trigilio, J.A.; Phasouk, K.; Jin, L.; Layton, E.D.; Li, A.Z.; Correnti, C.E.; De van der Schueren, W.; et al. Keratinocytes produce IL-17c to protect peripheral nervous systems during human HSV-2 reactivation. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 2315–2329. [[CrossRef](#)]
8. Johnston, A.; Fritz, Y.; Dawes, S.M.; Diaconu, D.; Al-Attar, P.M.; Guzman, A.M.; Chen, C.S.; Fu, W.; Gudjonsson, J.E.; McCormick, T.S.; et al. Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 2252–2262. [[CrossRef](#)]
9. Johansen, C.; Riis, J.L.; Gedebjerg, A.; Kragballe, K.; Iversen, L. Tumor necrosis factor alpha-mediated induction of interleukin 17C in human keratinocytes is controlled by nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 25487–25494. [[CrossRef](#)]
10. Tong, S.Y.; Davis, J.S.; Eichenberger, E.; Holland, T.L.; Fowler, V.G., Jr. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 603–661. [[CrossRef](#)]
11. Roth, S.A.; Simanski, M.; Rademacher, F.; Schroder, L.; Harder, J. The pattern recognition receptor NOD2 mediates Staphylococcus aureus-induced IL-17C expression in keratinocytes. *J. Invest. Derm.* **2014**, *134*, 374–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Jungnickel, C.; Schmidt, L.H.; Bittigkoffer, L.; Wolf, L.; Wolf, A.; Ritzmann, F.; Kamyschnikow, A.; Herr, C.; Menger, M.D.; Spieker, T.; et al. IL-17C mediates the recruitment of tumor-associated neutrophils and lung tumor growth. *Oncogene* **2017**, *36*, 4182–4190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Steck, P.; Ritzmann, F.; Honecker, A.; Vella, G.; Herr, C.; Gaupp, R.; Bischoff, M.; Speer, T.; Tschernig, T.; Bals, R.; et al. Interleukin 17 Receptor E (IL-17RE) and IL-17C Mediate the Recruitment of Neutrophils during Acute Streptococcus pneumoniae Pneumonia. *Infect. Immun.* **2019**, *87*, e00329–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hauptenthal, J.; Kautz, Y.; Elgaher, W.A.M.; Pätzold, L.; Röhrig, T.; Laschke, M.W.; Tschernig, T.; Hirsch, A.K.H.; Molodtsov, V.; Murakami, K.S.; et al. Evaluation of Bacterial RNA Polymerase Inhibitors in A. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 2573–2581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bae, T.; Baba, T.; Hiramatsu, K.; Schneewind, O. Prophages of Staphylococcus aureus Newman and their contribution to virulence. *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 1035–1047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ritzmann, F.; Jungnickel, C.; Vella, G.; Kamyschnikow, A.; Herr, C.; Li, D.; Menger, M.M.; Angenendt, A.; Hoth, M.; Lis, A.; et al. IL-17C-mediated innate inflammation decreases the response to PD-1 blockade in a model of Kras-driven lung cancer. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10353. [[CrossRef](#)]
17. Pfeifer, P.; Voss, M.; Wonenberg, B.; Hellberg, J.; Seiler, F.; Lepper, P.M.; Bischoff, M.; Langer, F.; Schafers, H.J.; Menger, M.D.; et al. IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *48*, 415–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)]
19. Lentini, G.; Famà, A.; Biondo, C.; Mohammadi, N.; Galbo, R.; Mancuso, G.; Iannello, D.; Zummo, S.; Giardina, M.; De Gaetano, G.V.; et al. Neutrophils Enhance Their Own Influx to Sites of Bacterial Infection via Endosomal TLR-Dependent Cxcl2 Production. *J. Immunol.* **2020**, *204*, 660–670. [[CrossRef](#)]
20. Holness, C.L.; Simmons, D.L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* **1993**, *81*, 1607–1613. [[CrossRef](#)]

21. Huang, H.; Zhang, Q.; Liu, J.; Hao, H.; Jiang, C.; Han, W. Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) Accelerates Wound Healing in Hemorrhagic Shock Rats by Enhancing Angiogenesis and Attenuating Apoptosis. *Med Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2017**, *23*, 2644–2653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lin, Z.Q.; Kondo, T.; Ishida, Y.; Takayasu, T.; Mukaida, N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J. Leukoc. Biol.* **2003**, *73*, 713–721. [[CrossRef](#)]
23. Takagi, N.; Kawakami, K.; Kanno, E.; Tanno, H.; Takeda, A.; Ishii, K.; Imai, Y.; Iwakura, Y.; Tachi, M. IL-17A promotes neutrophilic inflammation and disturbs acute wound healing in skin. *Exp. Dermatol.* **2017**, *26*, 137–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ashcroft, G.S.; Jeong, M.J.; Ashworth, J.J.; Hardman, M.; Jin, W.; Moutsopoulos, N.; Wild, T.; McCartney-Francis, N.; Sim, D.; McGrady, G.; et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* **2012**, *20*, 38–49. [[CrossRef](#)]
25. Iwamoto, K.; Moriwaki, M.; Miyake, R.; Hide, M. Staphylococcus aureus in atopic dermatitis: Strain-specific cell wall proteins and skin immunity. *Allergol. Int.* **2019**, *68*, 309–315. [[CrossRef](#)]
26. Ng, C.Y.; Huang, Y.H.; Chu, C.F.; Wu, T.C.; Liu, S.H. Risks for Staphylococcus aureus colonization in patients with psoriasis: A systematic review and meta-analysis. *Br. J. Dermatol.* **2017**, *177*, 967–977. [[CrossRef](#)]
27. Bjerre, R.D.; Bandier, J.; Skov, L.; Engstrand, L.; Johansen, J.D. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis: A systematic review. *Br. J. Dermatol.* **2017**, *177*, 1272–1278. [[CrossRef](#)]
28. Cho, J.S.; Pietras, E.M.; Garcia, N.C.; Ramos, R.I.; Farzam, D.M.; Monroe, H.R.; Magorien, J.E.; Blauvelt, A.; Kolls, J.K.; Cheung, A.L.; et al. IL-17 is essential for host defense against cutaneous Staphylococcus aureus infection in mice. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 1762–1773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Marchitto, M.C.; Dillen, C.A.; Liu, H.; Miller, R.J.; Archer, N.K.; Ortines, R.V.; Alphonse, M.P.; Marusina, A.I.; Merleev, A.A.; Wang, Y.; et al. Clonal Clonal V $\gamma$ 6+V $\delta$ 4+ T Cells promote IL-17-mediated immunity against Staphylococcus aureus skin infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *22*, 10917–10926. [[CrossRef](#)]

## **Danksagung**

Ich möchte in erster Linie meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Bischoff danken. In den inzwischen fast 5 Jahren unserer Zusammenarbeit hat er mich gefördert und gefordert und mir geholfen meine praktischen und theoretischen Fähigkeiten auszubauen. Durch seine Mithilfe und Bekanntschaften mit anderen Instituten konnte ich mit verschiedensten Arbeitsgruppen weltweit an einer Vielzahl interessanter Projekte zusammenarbeiten. Für sein Vertrauen in mich und meine Förderung als Leiterin des institutsinternen S2-Tierstalls bin ich sehr dankbar.

Prof. Dr. Dr. Robert Bals danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Auch wenn sie leider kein Teil des Institutes mehr ist, möchte ich insbesondere Dr. Rosmarie Gaupp für ihre technische, theoretische und oft auch moralische Unterstützung in den letzten Jahren danken.

Großer Dank gilt zudem meinen Arbeitskollegen aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Ganz besonderer Dank gilt hier Karin Hilgert, die stets ein offenes Ohr hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand, insbesondere wenn Arbeitsmaterialien wieder einmal nicht auffindbar waren.

Besonderer Dank gilt auch allen Kooperationspartnern (in alphabetischer Reihenfolge):

- Department of Biochemistry and Molecular Biology (Pennsylvania, USA)
- Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (Hannover)
- Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (Saarbrücken)
- Institut für Anatomie und Zellbiologie (Homburg)
- Institut für klinische und experimentelle Chirurgie (Homburg)
- Institut für Pharmazie (Saarbrücken)
- Institut Galien Paris-Sud (Paris)
- Klinik für innere Medizin V (Homburg)
- Laboratory of Pathogen Host Interactions (Montpellier, Frankreich)
- School of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences (Nebraska, USA)

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinem Partner für die fortwährende Unterstützung in dieser schönen, aber auch anstrengenden Zeit mit vielen Hochs und Tiefs danken. Ohne euren Rückhalt hätte ich diesen Lebensabschnitt nur schwer zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht.

## **Lebenslauf**

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