

---

**Untersuchungen zum Einfluss der Rho-Aktivität auf  
die Expression SaeRS-abhängiger Virulenzfaktoren  
in *Staphylococcus aureus***

---

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von

Anna Nagel

geboren am 23.04.1991

Greifswald, 23.04.2018

Dekan: Prof. Dr. Werner Weitschies

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Völker

2. Gutachter: Prof. Dr. Christiane Wolz

Tag der Promotion: 05.10.2018

# INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung	vii
1 Einleitung	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2 Virulenzregulatoren in <i>S. aureus</i>	4
1.2.1 Zweikomponentensysteme	4
1.2.2 Transkriptionsfaktoren	9
1.2.3 Alternative RNA-Polymerase-Sigma-Faktoren	10
1.2.4 Regulatorische RNAs	11
1.3 Transkriptionstermination	12
1.3.1 Rho-unabhängige Transkriptionstermination	12
1.3.2 Rho-abhängige Transkriptionstermination	14
1.3.3 Studien zur Rho-abhängigen Transkriptionstermination in Bakterien	16
1.4 <i>Antisense</i> -RNA in Bakterien	21
1.5 Zielstellung der Arbeit	24
2 Material	25
2.1 Bakterienstämme und Zelllinien	25
2.1.1 Bakterienstämme	25
2.1.2 Humane Zelllinien	27
2.2 Chemikalien, Enzyme, Farbstoffe & Kits	27
2.3 Primer	30
2.4 Spezifische Verbrauchsmaterialien	31
2.5 Instrumente	32
2.6 Medien, Puffer und Lösungen	33
2.6.1 Medien	33
2.6.2 Puffer und Lösungen für Transkriptomanalysen	35
2.6.3 Puffer und Lösungen für Proteomanalysen	36
2.7 Software	37
3 Methoden	39

3.1	Kultivierung von <i>S. aureus</i>	39
3.1.1	Kultivierung von <i>S. aureus</i> für Proteomanalysen	39
3.1.2	Kultivierung von <i>S. aureus</i> unter Zugabe von Bicyclomycin	40
3.1.3	Kultivierung GFP-markierter <i>S. aureus</i> -Stämme	41
3.2	Proteomanalysen bakterieller Proben	42
3.2.1	Gewinnung zellulärer Proteine	42
3.2.2	Gewinnung extrazellulärer Proteine	42
3.2.3	Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse	44
3.2.4	Massenspektrometrische Analyse	45
3.2.5	Analyse der Proteomdaten	49
3.3	Northern Blot- und Transkriptomanalysen von <i>S. aureus</i>	52
3.3.1	Zellernte und RNA-Präparation	52
3.3.2	Northern-Blot-Analysen	54
3.3.3	Microarray-Analysen	58
3.4	<i>In vivo</i> -Infektionsversuch	59
3.4.1	Infektionsinokulum	59
3.4.2	Bakteriämie-Infektionsmodell	59
3.5	<i>In vitro</i> -Infektionsversuche	61
3.5.1	Genetische Manipulation von <i>S. aureus</i>	61
3.5.2	Kultivierung von humanen Epithelzellen	63
3.5.3	Bestimmung der Zellkonzentration von prokaryotischen Zellen	63
3.5.4	Infektion humaner Epithelzellen mit <i>S. aureus</i>	64
3.5.5	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen infizierter humaner Epithelzellen	68
4	Ergebnisse	71
4.1	Proteomanalysen von <i>S. aureus</i>	72
4.1.1	Erweiterung der Spektrenbibliothek des <i>S. aureus</i> HG001	72
4.1.2	Analyse des zellulären Proteoms	73
4.1.3	Analyse des extrazellulären Proteoms	80
4.2	Der Einfluss von Rho auf das Infektionsverhalten von <i>S. aureus</i> in einem <i>in vivo</i> -Infektionsmodell	90 90
4.3	Der Einfluss von Rho auf das Infektionsverhalten von <i>S. aureus</i> in einem <i>in vitro</i> -Infektionsmodell	92 92
4.3.1	Infektion von 16HBE14o- Epithelzellen mit <i>S. aureus</i>	92
4.3.2	Methodenoptimierung zur Fluoreszenz-Markierung von <i>S. aureus</i>	95

4.3.3	Infektion von A549-Epithelzellen mit <i>S. aureus</i>	100
4.4	Analyse des Einflusses von Bicyclomycin auf <i>S. aureus</i>	104
4.4.1	Northern Blot-Analysen	104
4.4.2	Microarray-Analysen	109
4.4.3	Proteomanalysen	115
5	Diskussion	121
5.1	Vergleichende Proteomanalyse des <i>S. aureus</i> -Wildtyps und der $\Delta rho$ -Mutante	121
5.2	Der Einfluss von Rho auf das Infektionsverhalten von <i>S. aureus</i> in verschiedenen Infektionsmodellen	127
5.3	Die Effekte von Bicyclomycin auf die Expression von SaeRS-abhängigen Genen und <i>Antisense</i> -Transkription in <i>S. aureus</i>	135
6	Referenzen	141
	Anhang	155
	Eigenständigkeitserklärung	163
	Curriculum Vitae	165
	Publikationen	166
	Danksagung	169

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	<i>amino acid</i>
ACN	Acetonitril
<i>ad</i>	auf
<i>A. dest.</i>	destilliertes Wasser
AGC	<i>automatic gain control</i>
AIP	<i>auto inducing peptide</i>
AS	Aminosäure
asRNA	<i>Antisense-RNA</i>
BCAA	<i>branched-chain amino acids</i>
Bicyclomycin	BCM
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CDM	chemisch definiertes Medium
DDA	<i>data dependent acquisition</i>
DIA	<i>data independent acquisition</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>elongation complex</i>
eMEM	<i>eukaryotic minimal essential medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ery	Erythromycin
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
exp	exponentiell
FCS	<i>fetal calf serum</i>
for	<i>forward</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
KBE	koloniebildende Einheit
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NEAA	<i>non-essential amino acids</i>
OD <sub>600nm</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAB	<i>penassay broth</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
p. i.	<i>post-infection</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pMEM	<i>prokaryotic minimal essential medium</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAP	RNA-Polymerase
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
rev	<i>reverse</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
srm	<i>strokes per minute</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SMM	Spizizen's Minimalmedium
SMMP	SMM/PAB
sRNA	<i>small regulatory RNA</i>
stat	stationär
TCA	<i>trichloroacetic acid</i>
TE	TRIS/EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
TU	<i>transcription unit</i>
UT	Urea/Thiourea
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
VMB	Vancomycin BODIPY FL
WT	Wildtyp

## ZUSAMMENFASSUNG

*Staphylococcus aureus* ist ein Gram-positives pathogenes Bakterium, welches bei ca. 30 % der gesunden Bevölkerung zur kommensalen Flora der Nasenschleimhaut gehört. Jedoch zählt *S. aureus* auch zu den häufigsten Erregern bakterieller Infektionen beim Menschen. Aus diesem Grund wurden *S. aureus*-Stämme in zahlreichen Studien untersucht, um die Pathophysiologie und Virulenz der Bakterien sowie die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen zu verstehen. Die Expression von Virulenzfaktoren wird direkt oder indirekt durch verschiedene Regulatoren beeinflusst. Zu diesen zählen beispielsweise das Quorum-Sensing-System Agr, der alternative Sigma-Faktor SigB und das Zweikomponentensystem SaeRS. Bei der Regulation der Genexpression spielt neben Mechanismen, die die Transkriptionsinitiation beeinflussen, auch die Transkriptionstermination eine Rolle. Bei Bakterien unterscheidet man zwischen der Rho-unabhängigen und der Rho-abhängigen Transkriptionstermination. In bisherigen Studien wurde die Rolle des Transkriptionsterminationsfaktors Rho in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Mycobacterium tuberculosis* untersucht. Hierzu zählt unter anderem das Silencing von horizontal erworbenen Genen, die Verhinderung von DNA-Doppelstrangbrüchen und die Unterdrückung der persistierenden *Antisense*-Transkripten. Besonders die erhöhte *Antisense*-Transkription konnte auch in einer Tiling Array-Studie des *S. aureus* Wildtypstammes HG001 und einer isogenen  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 festgestellt werden. In dieser Transkriptom-Analyse wurden die *S. aureus*-Stämme in RPMI- und TSB-Medium in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase untersucht. Es konnten insgesamt 416 chromosomale Regionen identifiziert werden, deren Transkriptmenge in einer der vier Bedingungen in der  $\Delta\rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp wenigstens 4-fach erhöht waren. Von diesen Regionen ließen sich nur 11 % annotierten Genen zuordnen, während eine massive Erhöhung der Menge solcher Transkripte festgestellt wurde, die vom Gegenstrang kodierender Gene stammen.

Ausgehend von diesen Befunden wurde in dieser Studie das zelluläre und extrazelluläre Proteom des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 verglichen, um die Auswirkungen der Abwesenheit von Rho auf das Proteom zu untersuchen. Dabei lag die Mehrheit der relativ quantifizierten Proteine in erhöhten Mengen in der  $\Delta\rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vor. Viele dieser Proteine konnten dem SaeRS-Zweikomponentensystem von *S. aureus* zugeordnet werden. In der Proteomanalyse konnten 34 von 39 Proteinen, die durch SaeR reguliert werden, quantifiziert werden. Von diesen wiesen 29 erhöhte Proteinmengen in der  $\Delta\rho$ -Mutante auf. Durch das Sae-System werden Gene reguliert, von denen die meisten für Virulenzfaktoren, wie

Adhäsine, Toxine und *immune evasion*-Proteine, kodieren. Die Daten der Proteomanalyse zeigen, dass in *S. aureus*-Zellen, denen die Aktivität von Rho fehlt, das Sae-System aktiviert wird und dadurch die Induktion des SaeR-Regulons zu beobachten ist.

Die Relevanz dieser Ergebnisse wurde durch ein *in vivo*-Infektionsexperiment untersucht. In einem Bakteriämie-Modell führte die Inaktivierung von Rho zu einer signifikant erhöhten Virulenz von *S. aureus*, welche sich in einer signifikant reduzierten Überlebensrate der Mäuse äußerte. Zwischen dem Wildtyp und dem Komplementationsstamm konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate der infizierten Mäuse gezeigt werden.

Es ist bekannt, dass SaeRS-abhängige Virulenzfaktoren auch für die Invasion in Epithel- und Endothelzellen entscheidend sind. Anhand der Zahl der internalisierten *S. aureus*-Bakterien nach Infektion von humanen Lungenepithelzellen konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp HG001 und  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 im zeitlichen Verlauf festgestellt werden. Dabei konnten weder Unterschiede im Überleben in 16HBE14o- Zellen noch in der Internalisierungsrate in A549-Zellen zwischen den beiden Stämmen gezeigt werden.

Das Antibiotikum Bicyclomycin ist ein spezifischer Inhibitor des Transkriptionsterminationsfaktors Rho und wird in Studien zur Rho-abhängigen Transkriptionstermination in Gram-negativen Bakterien eingesetzt, da in diesen Rho ein essentielles Protein ist. In Transkriptom- und Proteomanalysen konnten vergleichbare Effekte durch die Behandlung des Wildtyps mit Bicyclomycin wie in der  $\Delta rho$ -Mutante hervorgerufen werden. Die *Antisense*-Transkription und die Expression SaeRS-abhängigen Gene waren im Wildtyp nach Gabe von Bicyclomycin deutlich erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Sae-Systems unter Rho-defizienten Bedingungen direkt mit der Transkriptionsterminationsaktivität von Rho verbunden ist und eine neue Verbindung zwischen antibiotischer Wirkung und schädlicher Virulenzgenexpression in *S. aureus* hergestellt werden konnte. In anderen Studien konnten Effekte von Antibiotika auf die Expression von Virulenzfaktoren in *S. aureus* gezeigt werden, jedoch wurden in diesen Studien die Effekte von Anti-Staphylokokken-Wirkstoffen untersucht. Im Gegensatz dazu ist im Fall von Bicyclomycin ein Antibiotikum verwendet worden, das gegen Gram-negative Bakterien wirksam ist und dennoch die Expression von Virulenzfaktoren in *S. aureus* beeinflusst. Diese Untersuchungen haben damit auch klinische Relevanz, nicht nur für Patienten, die an gemischten Infektionen mit verschiedenen Bakterienarten leiden, sondern auch für Patienten mit einer Gram-negativen bakteriellen Infektion, die jedoch Träger von *S. aureus* sind.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist ein Gram-positives, nicht-sporulierendes Bakterium und zählt taxonomisch zu den Firmicutes, die sich durch einen niedrigen G/C-Gehalt auszeichnen. Die Bakterien besitzen eine gelbgoldene Pigmentierung (*aureus* = der Goldene) und lagern sich meist in traubenförmigen Haufen (*staphylé* = Weintraube) zusammen. Die Farbe der Kolonien stammt von 17 Triterpenoid-Carotinoiden, von denen Staphyloxanthin das Hauptcarotinoid ist (Marshall & Wilmoth 1981).



Abbildung 1 Kolonien des *S. aureus* HG001 auf einer TSB-Agarplatte.

*S. aureus* ist unbeweglich, fakultativ anaerob und halotolerant (Lowy 1998). Die Pigmentierung der Kolonien, die Lyse roter Blutkörperchen auf Blutagarplatten und die Anwesenheit von Koagulase und Katalase werden verwendet, um *S. aureus* von anderen Bakterien zu unterscheiden (Boerlin *et al.* 2003; Roberson *et al.* 1992).

Bei 20 bis 30 % der gesunden Bevölkerung gehört *S. aureus* zur kommensalen Flora der Nasenschleimhaut (Wertheim *et al.* 2005). Diese Zahlen konnten in einer Studie von (Bode *et al.* 2010) bestätigt werden, wobei 6771 Patienten in den Niederlanden auf ihre Besiedlung mit *S. aureus* in der Nase untersucht wurden, von denen 18,8 % positiv getestet wurden.

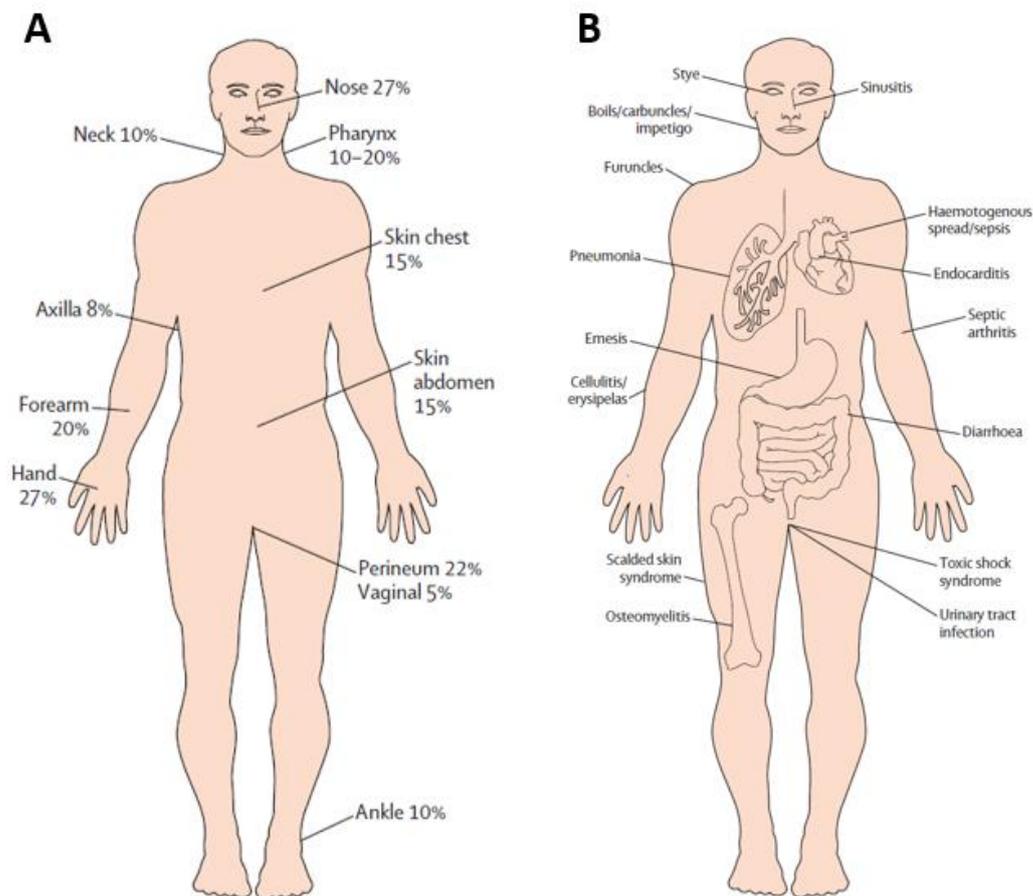


Abbildung 2 Besiedlungsrate von *S. aureus* an Körperstellen von gesunden Erwachsenen (A) sowie in (B) die verschiedenen Erkrankungen, die *S. aureus* beim Menschen hervorrufen kann. Die Abbildung stammt aus Wertheim *et al.* (2005).

*S. aureus* ist in der Lage, eine Vielzahl von Infektionskrankheiten auszulösen (Abbildung 2B), wobei mit *S. aureus* besiedelte Personen ein dreifach höheres Risiko einer Infektion besitzen (Wertheim *et al.* 2005; Kluytmans *et al.* 1997). In einer Multicenter-Studie wurden *S. aureus*-Stämme aus Patienten mit einer Bakteriämie isoliert und mit den Stämmen, die die Nasenschleimhaut der Patienten besiedelten, verglichen. Für die Mehrzahl der Patienten waren diese Stämme identisch (Eiff *et al.* 2001), was zeigt, dass auch die asymptomatische Besiedlung mit *S. aureus* ein erhöhtes Risiko für eine Infektion darstellt. Jedoch weisen Patienten, die nicht mit *S. aureus* besiedelt sind, in Bezug auf Bakteriämien eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate auf (Wertheim *et al.* 2004). Damit scheint der Besiedlungsstatus eines Menschen nicht nur ein Risikofaktor zu sein, sondern auch eine protektive Wirkung zu haben. Durch *S. aureus* ausgelöste Infektionen reichen von

leichten Hautinfektionen, wie Impetigo, Follikulitis oder oberflächlichen Abszessen, bis hin zu lebensbedrohlichen und invasiven Erkrankungen beispielsweise Pneumonie, Endokarditis oder Osteomyelitis (Lowy 1998). *S. aureus* gilt heutzutage als häufigste Ursache von infektiöser Endokarditis in der industrialisierten Welt (Fowler *et al.* 2005) und ist einer der häufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen weltweit. Dabei sind vor allem immungeschwächte Personen (z. B. HIV-Patienten) und Personen mit prädisponierenden Risikofaktoren, wie etwa einer Operation oder einem künstlichen Implantat, gefährdet (DeLeo *et al.* 2010; Wertheim *et al.* 2005). Die Aufnahme von *S. aureus* über kontaminierte Lebensmittel kann zudem zu Intoxikationen führen, wie z. B. die durch Enterotoxine ausgelöste Staphylokokken-Enterokolitis (Marrack & Kappler 1990). Weitere Toxin-bedingte Erkrankungen sind das durch das *toxic shock syndrome toxin* (TSST-1) ausgelöste Toxische Schocksyndrom und das durch die Staphylokokken-Toxine Exfoliatin A und Exfoliatin B ausgelöste *staphylococcal scalded skin syndrome* (Arbuthnott *et al.* 1990).

Aufgrund dieser Vielfalt der Krankheitsbilder wurde *S. aureus* in vielen Studien untersucht, um die Pathophysiologie und Virulenz des Bakteriums zu verstehen. Hierbei sind besonders die Mechanismen der Adaptation an den Wirt während der Kolonisierung, der Infektionsprozess sowie das Überleben der Bakterien und deren Replikation im Wirt von Interesse.

## 1.2 Virulenzregulatoren in *S. aureus*

Die genannten Prozesse werden in *S. aureus* durch komplexe regulatorische Netzwerke kontrolliert. Die Expression der meisten Adhärenz- und Virulenzfaktoren wird dabei direkt oder indirekt durch verschiedene regulatorische Systeme beeinflusst. Zu diesen zählen Zweikomponentensysteme, Transkriptionsfaktoren sowie der alternative Sigma-Faktor SigB und regulatorische RNAs.

Diese Regulatoren beeinflussen nicht nur die Expression der jeweiligen Zielgene, sondern können auch einen Einfluss auf andere Regulatoren ausüben (Abbildung 3).

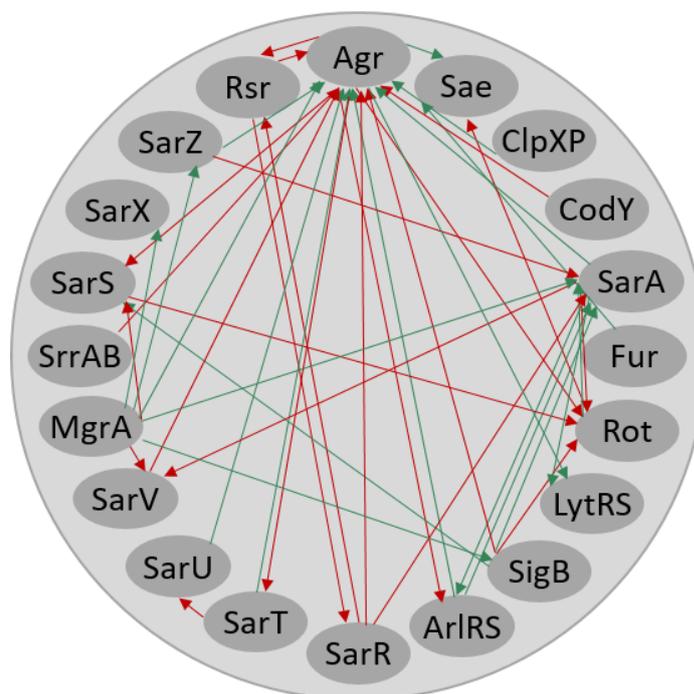


Abbildung 3 Netzwerk der Regulatoren von Virulenzgenen in *S. aureus*. Die roten Pfeile verweisen auf einen repressiven Effekt, während die grünen Pfeile eine Aktivierung markieren. Die Abbildung wurde nach Priest *et al.* (2012) abgewandelt.

### 1.2.1 Zweikomponentensysteme

Zweikomponentensysteme sind regulatorische Systeme, die aus zwei Proteinen bestehen: einer Sensorkinase und einem Responeregulator. Die Sensorkinase kann entweder auf intrazelluläre Stimuli reagieren, an einen spezifischen extrazellulären Liganden gebunden oder mit einem Rezeptor assoziiert sein (Barrett & Hoch 1998). Durch Autophosphorylierung setzt eine Signalkaskade ein, die mit der Bindung des Responeregulators an die spezifische DNA-Sequenz endet. Diese Bindung führt zur Aktivierung oder Repression der Zielgene. In *S. aureus* gibt es

verschiedene Zweikomponentensysteme, wie AgrAC, SaeRS, SrrAB, ArIRS und LytRS (Bronner *et al.* 2004).

### Agr-Regulon

Der *accessory gene regulator* (Agr)-Locus von *S. aureus* kodiert für das Quorum Sensing-System mit einem *auto inducing peptide* (AIP) über das die Genexpression des Zweikomponentensystems und weiterer Zielgene reguliert wird (Novick & Geisinger 2008). Der Locus besteht aus zwei divergenten Transkripten, die unter der Kontrolle von zwei Promotoren (P2 & P3) stehen. Ein Transkript umfasst die vier Gene *agrA*, *agrC*, *agrD* und *agrB* (Novick *et al.* 1995), während das andere Transkript eine 0,5 kb lange mRNA ist, die für die regulatorische RNAIII und das Gen *hld* kodiert (Novick *et al.* 1993; Janson *et al.* 1989). Zusätzlich wird das Gen *agrA* von dem schwachen konstitutiven Promotor P1 transkribiert (Peng *et al.* 1988).

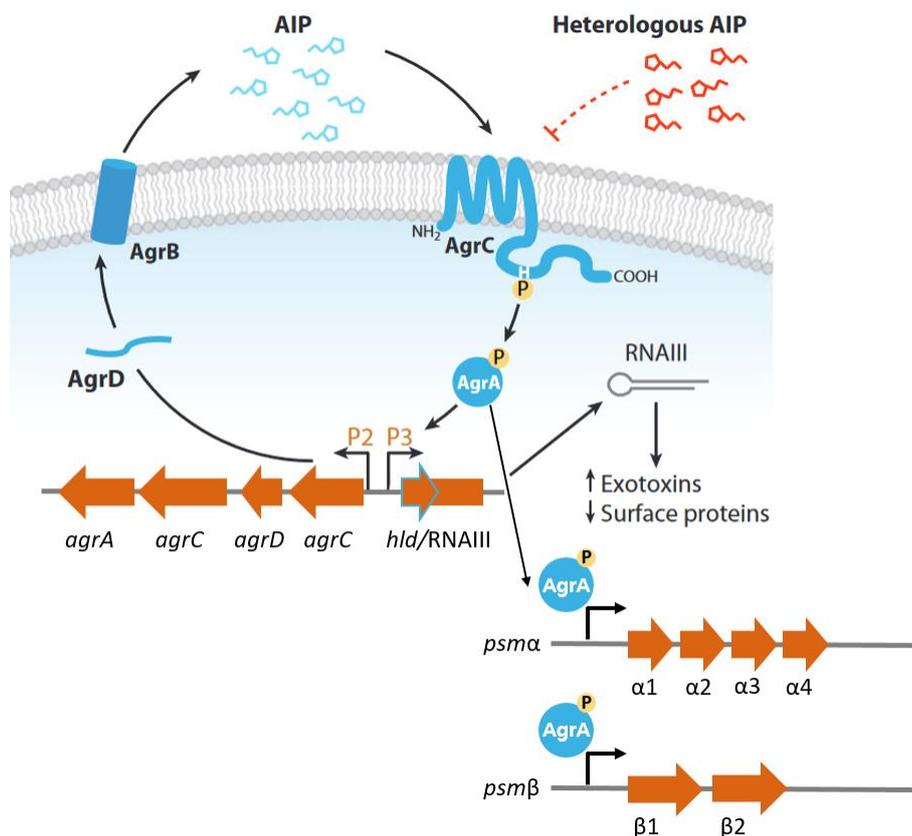


Abbildung 4 Zusammensetzung und Aktivierung des *agr*-Locus. Das *auto inducing peptid* (AIP) wird als Vorläuferprotein AgrD synthetisiert, durch AgrB gespalten und sezerniert. Die AIPs akkumulieren extrazellulär und aktivieren das Zweikomponentensystem, bestehend aus AgrC und AgrA, wodurch die Expression der RNAIII und des Operons selbst erhöht wird. AgrA aktiviert auch die Expression der *phenol-soluble modulins* (PSMs). Das Schema wurde nach Novick & Geisinger (2008) und Queck *et al.* (2008) modifiziert.

Das Gen *agrD* kodiert für einen Vorläufer des AIPs, welches durch die Formation eines Thiolactonrings zum reifen AIP prozessiert wird. Dieser Thiolactonring ist essentiell für die AIP-Aktivität und charakteristisch für diese Peptide (Mayville *et al.* 1999). AgrB ist eine Transmembran-Endopeptidase, die die C-terminale Region von AgrD spaltet und dadurch das reife AIP sekretiert (Qiu *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2002). Besonders beim Erreichen einer hohen Zelldichte in der post-exponentiellen Wachstumsphase kommt es zur Akkumulation der AIPs (Janzon *et al.* 1989). Durch diese extrazelluläre Akkumulation von AIPs wird das Zweikomponentensystem aktiviert, welches aus AgrC und AgrA besteht. AgrC ist ein Signalrezeptor mit einer N-terminalen Transmembran-Sensordomäne. Nach Bindung des AIP kommt es zur Autophosphorylierung der Sensor kinase (Lina *et al.* 1998). Anschließend wird das Phosphat auf den Responseregulator AgrA übertragen, wodurch das phosphorylierte AgrA an den Promotor P2 bindet, um die Expression des *agrBDCA*-Operons zu erhöhen, und an P3, um die RNAIII zu exprimieren (Koenig *et al.* 2004). Der Responseregulator aktiviert neben den Promotoren P2 und P3 auch die Promotoren der *phenol-soluble modulins* (PSMs) von *S. aureus* (Queck *et al.* 2008). Die regulatorische RNA RNAIII kontrolliert die Expression aller anderen Gene, die zum Agr-Regulon gehören, wobei Exotoxine positiv und Oberflächenproteine negativ beeinflusst werden (Boisset *et al.* 2007). Hierzu zählen beispielsweise die Gene *hla*, *spa* und *coa*. Die Aktivierung von AgrA durch die Bindung der AIPs an AgrC und die damit verbundene Regulation der Zielgene (Tabelle 1), ist sehr spezifisch. Es gibt vier *agr*-Typen, die sich durch Allelvariationen in den Genen *agrB*, *agrD* und *agrC* unterscheiden (Li *et al.* 1997). Ein AIP aus einer Gruppe kann an den Rezeptor einer anderen Gruppe binden, wodurch es jedoch zur Repression von *agr* in dieser Gruppe kommt (Li *et al.* 1997).

Tabelle 1 Gene und Proteine des Agr-Regulons<sup>1</sup>

Locus	Genname	Proteinname	Beschreibung
SAOUHSC_00069	<i>spa</i>	Spa	<i>protein A</i>
SAOUHSC_00110	SAOUHSC_00110		unbekannte Funktion
SAOUHSC_00192	<i>coa</i>	Coa	<i>coagulase</i>
SAOUHSC_00411.1	<i>psma4</i>	Psm $\alpha$ 4	<i>phenol-soluble modulin alpha 4 peptide</i>
SAOUHSC_00411.2	<i>psma3</i>	Psm $\alpha$ 3	<i>phenol-soluble modulin alpha 3 peptide</i>
SAOUHSC_00411.3	<i>psma2</i>	Psm $\alpha$ 2	<i>phenol-soluble modulin alpha 2 peptide</i>
SAOUHSC_00411.4	<i>psma1</i>	Psm $\alpha$ 1	<i>phenol-soluble modulin alpha 1 peptide</i>
SAOUHSC_01121	<i>hla</i>	Hla	<i>alpha-hemolysin</i>
SAOUHSC_01135	<i>psm<math>\beta</math>1</i>	Psm $\beta$ 1	<i>phenol-soluble modulin beta 1 peptide</i>
SAOUHSC_01136	<i>psm<math>\beta</math>2</i>	Psm $\beta$ 2	<i>phenol-soluble modulin beta 2 peptide</i>
SAOUHSC_01879	<i>rot</i>	Rot	<i>repressor of toxins Rot</i>
SAOUHSC_02260	<i>hld</i>	Hld	<i>delta-hemolysin</i>
SAOUHSC_02261	<i>agrB</i>	AgrB	<i>accessory gene regulator protein B</i>
SAOUHSC_02262	<i>agrD</i>	AgrD	<i>accessory gene regulator protein D</i>

Locus	Genname	Proteinname	Beschreibung
SAOUHSC_02264	<i>agrC</i>	AgrC	<i>accessory gene regulator protein C</i>
SAOUHSC_02265	<i>agrA</i>	AgrA	<i>accessory gene regulator protein A</i>
SAOUHSC_02706	<i>sbi</i>	Sbi	<i>second binding protein of immunoglobulin</i>
SAOUHSC_02883	SAOUHSC_02883		<i>secretory antigen precursor SsaA</i>

<sup>1</sup>Gene und Proteine wurden unter Nutzung der Datenbanken RegPrecise und AureoWiki zugeordnet.

### SaeR-Regulon

Ein weiterer wichtiger Regulator von Virulenzfaktoren in *S. aureus* ist das SaeRS-System (*S. aureus exoprotein expression system*). Dieses besteht aus der Membran-gebundenen Sensorkinase SaeS und dem DNA-bindenden Responseregulator SaeR (Giraud *et al.* 1999). Zu dem Sae-System gehören zwei weitere Proteine, das Lipoprotein SaeP und das Membranprotein SaeQ, welche die Aktivität der Sensorkinase SaeS regulieren (Jeong *et al.* 2012).

SaeS gehört zur sogenannten "intramembrane sensing kinase"-Familie, die eine N-terminale Domäne aus zwei Transmembranhelices mit einem kurzen extrazytoplasmatischen Linker besitzt, wobei keine spezifische extrazytoplasmatische sensorische Domäne vorliegt (Mascher 2014). Diese Sensorkinasen werden in der Regel durch Zellhüllenstress aktiviert und können auf zusätzliche Membranproteine zur Reizwahrnehmung angewiesen sein. Im Fall von SaeS findet die Signalübertragung von Molekülen, die externe Signale wahrnehmen, höchstwahrscheinlich durch Konformationsänderungen in der N-terminalen Domäne (induziert beispielsweise durch Protein-Protein-Wechselwirkungen) statt, die die Kinaseaktivität von SaeS verändern (Liu *et al.* 2015). Das *Linker*-Peptid von SaeS erwies sich als essentiell für die Reaktion auf aktivierende Wirtssignale sowie für die Kontrolle der niedrigen basalen Kinaseaktivität unter nicht-induzierten Bedingungen (Liu *et al.* 2015).

Das Sae-System wird über eine Vielzahl von Stimuli aktiviert (Liu *et al.* 2016) zu denen subinhibitorische Konzentrationen von *human neutrophil peptides* (HNPs; Geiger *et al.* 2008) gehören und das Protein Calprotectin, welches von Neutrophilen gebildet wird (Cho *et al.* 2015) sowie inhibitorische Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (Geiger *et al.* 2008). In weiteren Studien wurden mögliche Verbindungen mit anderen globalen Regulatoren von *S. aureus* untersucht, jedoch konnten bislang keine direkten regulatorischen Interaktionen nachgewiesen werden (Liu *et al.* 2016).

Durch das Sae-System werden ca. 40 Gene von *S. aureus* kontrolliert (Tabelle 2), von denen die meisten für Virulenzfaktoren, wie Adhäsine, Toxine und *immune evasion*-Proteine, kodieren.

Tabelle 2 Gene und Proteine des SaeR-Regulons

Locus	Genname	Proteinname	Beschreibung	Referenz
SAOUHSC_00182	SAOUHSC_00182		unbekannte Funktion	RegPrecise
SAOUHSC_00192	<i>coa</i>	Coa	<i>coagulase</i>	RegPrecise
SAOUHSC_00354	<i>selX</i>	SelX	<i>superantigen-like protein</i>	RegPrecise
SAOUHSC_00392	<i>ssl7</i>	Ssl7	<i>superantigen-like protein 7</i>	RegPrecise
SAOUHSC_00394	<i>ssl9</i>	Ssl9	<i>superantigen-like protein 9</i>	RegPrecise
SAOUHSC_00399	<i>ssl11</i>	Ssl11	<i>superantigen-like protein 11</i>	RegPrecise
SAOUHSC_00400	SAOUHSC_00400		unbekannte Funktion	RegPrecise
SAOUHSC_00402	<i>lpl3</i>	Lpl3	<i>lipoprotein-like protein</i>	RegPrecise
SAOUHSC_00714	<i>saeS</i>	SaeS	<i>sensor histidine kinase</i>	RegPrecise
SAOUHSC_00715	<i>saeR</i>	SaeR	<i>response regulator</i>	RegPrecise
SAOUHSC_00716	<i>saeQ</i>	SaeQ	<i>transmembrane protein SaeQ</i>	RegPrecise
SAOUHSC_00717	<i>saeP</i>	SaeP	<i>lipoprotein SaeP</i>	RegPrecise
SAOUHSC_00816	<i>emp</i>	Emp	<i>extracellular matrix and plasma binding protein</i>	(Harraghy et al. 2005)
SAOUHSC_00818	<i>nuc</i>	Nuc	<i>thermonuclease</i>	(Olson et al. 2013)
SAOUHSC_01110	<i>ecb</i>	Ecb	<i>fibrinogen-binding protein-like protein</i>	RegPrecise
SAOUHSC_01114	<i>efb</i>	Efb	<i>fibrinogen-binding protein</i>	RegPrecise
SAOUHSC_01115	<i>scc</i>	Scs	<i>fibrinogen-binding protein precursor-like protein</i>	RegPrecise
SAOUHSC_01121	<i>hla</i>	Hla	<i>alpha-hemolysin</i>	RegPrecise
SAOUHSC_01938	<i>splD</i>	SplD	<i>serine protease SplD</i>	RegPrecise
SAOUHSC_01939	<i>splC</i>	SplC	<i>serine protease SplC</i>	RegPrecise
SAOUHSC_01941	<i>splB</i>	SplB	<i>serine protease SplB</i>	RegPrecise
SAOUHSC_01942	<i>splA</i>	SplA	<i>serine protease SplA</i>	RegPrecise
SAOUHSC_01944	SAOUHSC_01944		unbekannte Funktion	RegPrecise
SAOUHSC_01954	<i>lukD</i>	LukD	<i>leukocidin f subunit LukD</i>	RegPrecise
SAOUHSC_01955	<i>lukE</i>	LukE	<i>leukocidin s subunit LukE</i>	RegPrecise
SAOUHSC_02160	<i>map2</i>	Map2	<i>truncated Map protein</i>	RegPrecise
SAOUHSC_02161	<i>eap/map</i>	Eap Map	<i>MHC class II analog protein</i>	RegPrecise
SAOUHSC_02163	<i>h1b-1</i>	H1b-1	<i>beta-hemolysin (truncated)</i>	(Liang et al. 2006)
SAOUHSC_02167	<i>scn</i>	SCIN	<i>staphylococcal complement inhibitor</i>	RegPrecise
SAOUHSC_02169	<i>chp</i>	CHIPS	<i>chemotaxis inhibitory protein of staphylococci</i>	(Rooijackers et al. 2006)
SAOUHSC_02171	<i>sak</i>	Sak	<i>staphylokinase</i>	RegPrecise
SAOUHSC_02241	<i>lukG</i>	LukG	<i>leukocidin f subunit LukG</i>	RegPrecise
SAOUHSC_02243	<i>lukH</i>	LukH	<i>leukocidin s subunit LukH</i>	RegPrecise
SAOUHSC_02706	<i>sbi</i>	Sbi	<i>second binding protein of immunoglobulin</i>	RegPrecise
SAOUHSC_02708	<i>HlgA</i>	HlgA	<i>gamma-hemolysin h-gamma-II subunit</i>	(Rogasch et al. 2006)
SAOUHSC_02709	<i>hlgC</i>	HlgC	<i>leukocidin s subunit</i>	RegPrecise
SAOUHSC_02710	<i>hlgB</i>	HlgB	<i>leukocidin f subunit</i>	RegPrecise
SAOUHSC_02802	<i>fnbB</i>	FnbB	<i>fibronectin-binding protein B</i>	(Steinhuber et al. 2003)
SAOUHSC_02803	<i>fnbA</i>	FnbA	<i>fibronectin-binding protein A</i>	(Steinhuber et al. 2003)

## 1.2.2 Transkriptionsfaktoren

### SarA-Regulon

Der *staphylococcal accessory regulator* (Sar) ist neben SaeR und Agr ein weiterer wichtiger Regulator von Virulenzgenen in *S. aureus* (Cheung & Projan 1994). Der *sarA*-Locus kodiert für drei überlappenden Transkripte. Das SarA Protein ist ein DNA-bindendes Protein und reguliert die Expression der Zielgene durch direkte Bindung an deren Promotoren oder indirekte Interaktion mit anderen Regulatoren wie Agr. SarA gehört zu einer Proteinfamilie, die 11 Proteine umfasst (SarA, SarR, SarS, SarT, SarU, SarV, SarX, SarY, SarZ, MgrA und Rot) und deren Mitglieder homolog zu SarA sind (Manna & Cheung 2006; Liu *et al.* 2006). Die durch SarA regulierten Proteine sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Proteine Hla sowie die FnbAB werden durch SarA positiv reguliert, während Spa, SspA und Aur negativ beeinflusst werden (Karlsson *et al.* 2001).

Tabelle 3 Gene und Proteine des SarA-Regulons<sup>2</sup>

Locus	Genname	Proteinname	Beschreibung
SAOUHSC_00069	<i>spa</i>	Spa	<i>protein A</i>
SAOUHSC_00988	<i>sspA</i>	SspA	<i>ataphylococcal serine protease A</i>
SAOUHSC_01121	<i>hla</i>	Hla	<i>alpha-hemolysin</i>
SAOUHSC_02802	<i>fnbB</i>	FnbB	<i>fibronectin-binding protein B</i>
SAOUHSC_02803	<i>fnbA</i>	FnbA	<i>fibronectin-binding protein A</i>
SAOUHSC_02971	<i>aur</i>	Aur	<i>zinc metalloproteinase aureolysin</i>

<sup>2</sup>Gene und Proteine wurden unter Nutzung der Datenbanken RegPrecise und AureoWiki zugeordnet.

### CodY-Regulon

Der globale Transkriptionsregulator CodY besitzt Homologe in vielen Gram-positiven Bakterien (Sonenshein 2005). In *S. aureus* werden ca. 150 Gene durch CodY reguliert (Tabelle A1). Zu diesen gehören viele Gene, die für Proteine kodieren, die am Metabolismus beteiligt sind, aber auch Virulenzgene (Majerczyk *et al.* 2010). CodY ist ein DNA-bindendes Protein, das an eine konservierte Sequenz bindet, die sich in den meisten Fällen in der Promotorregion des Zielgens befindet. Die Bindung von CodY verhindert somit die Transkriptionsinitiation durch die RNA-Polymerase (RNAP), wodurch CodY als Repressor wirkt. Die Aktivierung des CodY-Regulons erfolgt bei niedrigen intrazellulären Konzentrationen von GTP und der verzweigt-kettigen Aminosäuren (*branched-chain amino acid*, BCAA) Isoleucin, Leucin und Valin. Die Effektoren wirken unabhängig und additiv, um die Affinität von CodY für seine DNA-Zielsequenzen zu beeinflussen. Eine Derepression der CodY-abhängigen Gene erfolgt auch im Zuge der *stringent response*, da diese mit einer Erniedrigung der zellulären GTP-Konzentration verbunden ist (Geiger & Wolz 2014).

### 1.2.3 Alternative RNA-Polymerase-Sigma-Faktoren

#### SigB-Regulon

Alternative RNAP-Sigma-Faktoren spielen in Bakterien eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression und der Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen. In *S. aureus* sind vier verschiedene Sigma-Faktoren bekannt. SigA ist insbesondere für die Transkription von Genen verantwortlich, die mit grundlegenden zellulären Funktionen verbunden sind (Deora & Misra 1996). Die Funktionen der alternativen Sigma-Faktoren SigH und SigS sind bisher weniger gut charakterisiert. SigH spielt eine Rolle bei der Expression von Genen, die mit der genetischen Kompetenz von *S. aureus* assoziiert sind, und ist homolog zu SigH von *Bacillus subtilis* (Morikawa *et al.* 2003). SigS ist an der Stressadaptation beteiligt (Shaw *et al.* 2008).

Der wichtigste alternative Sigma-Faktor von *S. aureus* ist SigB. Während SigB in *B. subtilis* als Regulator der generellen Stressantwort fungiert, ist er in *S. aureus* in die Regulation verschiedener zellulärer Prozesse involviert, wie beispielsweise Zellwandsynthese, Intermediärstoffwechsel und Membrantransport (Hecker *et al.* 2007). Darüber hinaus hat SigB auch einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Expression von Virulenzfaktoren wie Koagulase und Fibronektin-Bindeprotein (Bischoff *et al.* 2004). Durch SigB werden etwa 250 Gene in *S. aureus* reguliert (Tabelle A1).

Das *sigB*-Operon setzt sich aus vier Genen zusammen, *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB*, die eine hohe Sequenzidentität zu den entsprechenden Genen von *B. subtilis* aufweisen (Wu *et al.* 1996). Die Aktivierung von SigB in *S. aureus* ist ähnlich wie bei *B. subtilis* durch einen Wechsel von Protein-Interaktionspartnern charakterisiert. Der Anti-Sigmafaktor RsbW hält SigB in einem inhibitorischen Komplex fest und verhindert somit dessen Interaktion mit der RNAP. Erst wenn RsbV unphosphoryliert vorliegt, bildet sich ein Komplex aus RsbV und RsbW, wodurch SigB frei wird. Die zweistufigen Regulationskaskaden von *B. subtilis*, die unter Energiestress über die Phosphatase RsbP und unter Umweltstress über die Phosphatase RsbU die Dephosphorylierung von RsbV regulieren, sind in *S. aureus* nicht konserviert. Weder RsbP noch das Stressosom, welches die RsbU-Aktivität steuert, werden im Genom von *S. aureus* kodiert (Hecker *et al.* 2007). Wie und ob die Aktivität von SigB in *S. aureus* reguliert ist, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Eine konstitutive Aktivität von RsbU könnte zu einer erhöhten Aktivität von SigB führen, wodurch die Möglichkeit der Bindung an das Core-Enzym der RNAP verbessert wäre, wenn die Expression von *Housekeeping*-Genen reduziert ist, wie z. B. in der stationären Wachstumsphase (Pané-Farré *et al.* 2006).

Bei *S. aureus* wird SigB beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase aktiviert, aber auch unter Stressbedingungen, wie Hitzestress bei 48 °C oder Salzstress (Pané-Farré

*et al.* 2006) bzw. nach Internalisierung in Wirtszellen (Pförtner *et al.* 2014). Außerdem spielt SigB eine Rolle bei der Bildung von *small colony variants* (SCVs; Mitchell *et al.* 2010; Tuscherr *et al.* 2015). SCVs sind Phänotypen von *S. aureus*-Zellen, die langsam wachsen, eine reduzierte Toxinproduktion aufweisen und mit einer langen intrazellulären Persistenz assoziiert sind.

Neben dem alternativen Sigma-Faktor SigB haben auch kleine regulatorische RNAs einen wichtigen Einfluss auf die Genexpression von *S. aureus*.

## 1.2.4 Regulatorische RNAs

### RNAIII

Regulatorische RNAs spielen bei *S. aureus* eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation der Genexpression (Tomasini *et al.* 2014). Bisher wurde für drei regulatorische RNAs von *S. aureus* gezeigt, dass sie direkt die Expression von Virulenzgenen beeinflussen. Bei diesen handelt es sich um RNAIII, SprD und RsaA.

RNAIII ist der regulatorische Effektor des Agr-Systems und wird infolge der Bindung von phosphoryliertem AgrA an den Promotor P3 synthetisiert (Novick *et al.* 1993). RNAIII erhöht die Expression von Exotoxinen und verringert die Expression von Oberflächenproteinen über Bindung der entsprechenden mRNAs (Boisset *et al.* 2007). So interagiert RNAIII unter anderem mit der *rot*-mRNA (*repressor of toxins*) und hemmt deren Translation. Dadurch werden neben *hla*, das unter direkter positiver Kontrolle durch RNAIII steht, weitere Exotoxine von *S. aureus* infolge der Aktivierung des Agr-Systems in erhöhter Menge synthetisiert. Die Gene, die durch RNAIII reguliert werden, sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 Gene und Proteine, die durch RNAIII reguliert werden<sup>3</sup>

Locus	Genname	Proteinname	Beschreibung
SAOUHSC_00069	<i>spa</i>	Spa	<i>protein A</i>
SAOUHSC_00110	SAOUHSC_00110		unbekannte Funktion
SAOUHSC_00192	<i>coa</i>	Coa	<i>coagulase</i>
SAOUHSC_01121	<i>hla</i>	Hla	<i>alpha-hemolysin</i>
SAOUHSC_01879	<i>rot</i>	Rot	<i>repressor of toxins</i> Rot
SAOUHSC_02706	<i>sbi</i>	Sbi	<i>second binding protein of immunoglobulin</i>
SAOUHSC_02883	SAOUHSC_02883		<i>secretory antigen precursor SsaA</i>

<sup>3</sup>Gene und Proteine wurden unter Nutzung der Datenbanken RegPrecise und AureoWiki zugeordnet.

## 1.3 Transkriptionstermination

Bei der Kontrolle der Genexpression spielt neben der Transkriptionsinitiation, die insbesondere durch Transkriptionsfaktoren und RNAP-Sigma-Faktoren beeinflusst wird, auch die Transkriptionstermination eine wichtige Rolle. In Bakterien wird zwischen zwei Mechanismen unterschieden: der intrinsischen Termination und der Rho-abhängigen Termination.

Das Verständnis der Mechanismen der Transkriptionstermination und der damit verbundenen Interaktionen der RNAP spielt eine wichtige Rolle bei der Untersuchung der Genregulation in Bakterien. Transkriptionstermination (I) verhindert unerwünschte Expression von *Downstream*-Genen und *Antisense*-Transkripten, (II) definiert RNA-3'-Enden für die Ausbildung spezifischer RNA-Strukturen (z. B. bei kleinen nicht-kodierenden RNAs) oder für regulatorische Funktionen, (III) bewirkt eine Wiederverwendung der RNAP für eine effiziente Genexpression und (IV) minimiert Interaktionen mit Replikationskomplexen, um Doppelstrangbrüche im Chromosom zu verhindern (Ray-Soni *et al.* 2016).

### 1.3.1 Rho-unabhängige Transkriptionstermination

Die Rho-unabhängige oder auch intrinsische Transkriptionstermination beruht auf der Dissoziation des Transkriptions-Elongations-Komplexes (EC, *elongation complex*) durch Wechselwirkungen von DNA und RNA mit der RNAP. Eine typische Terminatorsequenz besteht aus einem GC-reichem *inverted repeat*, das eine Haarnadelstruktur ausbildet, gefolgt von einer Poly-Adenin-Sequenz. Bei dieser Form der Transkriptionstermination werden keine zusätzlichen Proteinfaktoren benötigt (Ray-Soni *et al.* 2016).

Die intrinsische Termination beginnt mit einer transkriptionellen Pause (Abbildung 5A), die durch die 7 bis 8 Nukleotide lange Poly-Uracil-Sequenz ausgelöst wird. Diese transkriptionelle Pause ermöglicht die Bildung einer GC-reichen Haarnadelstruktur im *exit channel* des EC (Abbildung 5B). Sowohl die Poly-Uracil-Sequenz als auch die GC-reiche Haarnadelstruktur sind entscheidend für eine effiziente Transkriptionstermination (Penno *et al.* 2015). Die gebildete Haarnadelstruktur führt daraufhin zur Destabilisierung des EC, wobei der zugrundeliegende Mechanismus nicht vollständig geklärt ist und zwei verschiedene Modelle existieren: *Hybrid-shearing* oder *Hypertranslocation* (Ray-Soni *et al.* 2016). Im letzten Schritt kommt es zur Dissoziation des ECs (Abbildung 5D), hervorgerufen durch die Destabilisierung des RNA-DNA-Hybrids sowie Konformationsänderungen der RNAP.

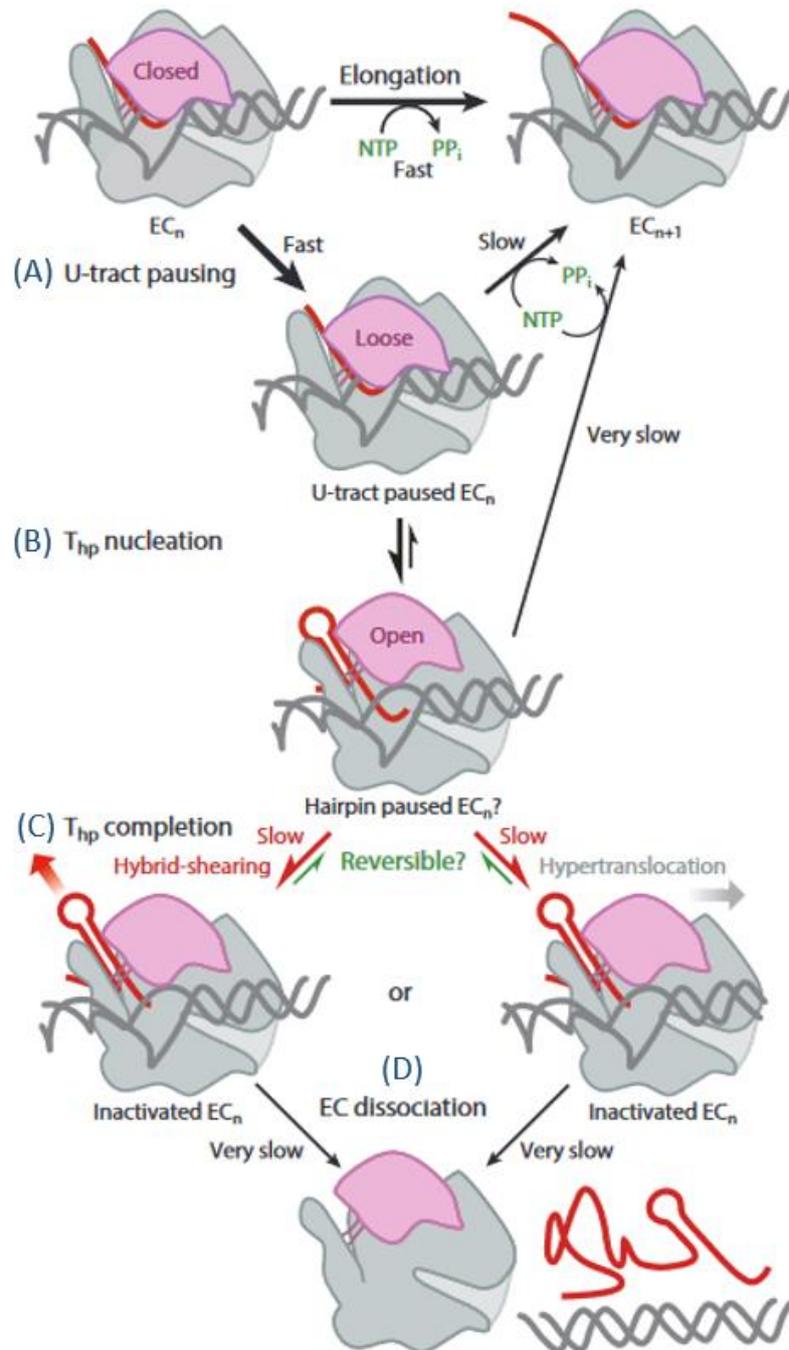


Abbildung 5 Mechanismus der intrinsischen Transkriptionstermination. **(A)** Entstehung einer transkriptionellen Pause am 3'-Ende der Uracil-Sequenz, gefolgt von **(B)** der Bildung der Haarnadelstruktur. **(C)** Die Destabilisierung des ECs kann daraufhin über zwei verschiedene Modelle erfolgen: *Hybrid-shearing* oder *Hypertranslocation*. Diese führen dann zur Dissoziation des ECs **(D)**. Die Abbildung stammt aus Ray-Soni *et al.* (2016).

### 1.3.2 Rho-abhängige Transkriptionstermination

Die Rho-abhängige Transkriptionstermination wird durch den Terminationsfaktor Rho vermittelt. Rho ist ein homohexameres Ringprotein, welches an die naszierende RNA bindet und ATP nutzt, um auf der RNA in 5'-3' Richtung zu translozieren. Rho besitzt neben der ATP-vermittelten Translokase-Aktivität auch eine RNA-DNA-Helikase-Aktivität (Ray-Soni *et al.* 2016).

Die Rho-abhängige Transkriptionstermination wird durch spezifische Sequenzen innerhalb der Matrizen-DNA und der naszierenden RNA reguliert. Im ersten Schritt kommt es zur Bindung von Rho an *rut* (*Rho utilization*), einen Cytosin-reichen Abschnitt, der ca. 80 Nukleotide *upstream* vom eigentlichen Terminationspunkt liegt und geringe Sekundärstrukturen aufweist (Abbildung 6A). Diese Bindung ist entscheidend für die Translokase-Aktivität von Rho sowie den vollständigen Ringschluss des Rho-Hexamers (Thomsen & Berger 2009). Durch die Hydrolyse von ATP wird Energie frei, die Rho nutzt, um entlang der RNA zu translozieren, bis der Transkriptions-Elongations-Komplex erreicht wird (Abbildung 6B). Dadurch kommt es zur Destabilisierung der RNA-DNA-Hybridhelix über eins der obengenannten Modelle (*Hybrid-shearing* oder *Hypertranslocation*) (Ray-Soni *et al.* 2016).

Während des *Hybrid-shearing* transloziert Rho an der RNA entlang unter fortgesetzter ATP-Hydrolyse bis die RNA den *exit channel* erreicht. Die so entstehenden Kräfte führen zu einer Scherung des RNA-DNA-Hybrids (Richardson 2002). Bei der *Hypertranslocation* wird die RNAP durch Rho entlang der DNA bewegt, ohne eine Nukleotidanlagerung, wodurch die Transkriptionsblase destabilisiert und die RNA freigesetzt wird (Park & Roberts 2006). In beiden Fällen kommt es anschließend zur Dissoziation des ECs (Ray-Soni *et al.* 2016).

Neben der beschriebenen Bindung von Rho an *rut* wird auch ein alternativer Mechanismus diskutiert, bei dem Rho während der Transkriptionselongation unspezifisch an die RNAP bindet (Abbildung 6C). Die Bindung von Rho bewirkt eine Konformationsänderung der RNAP, die entscheidend für die effiziente Termination ist (Epshtein *et al.* 2010).

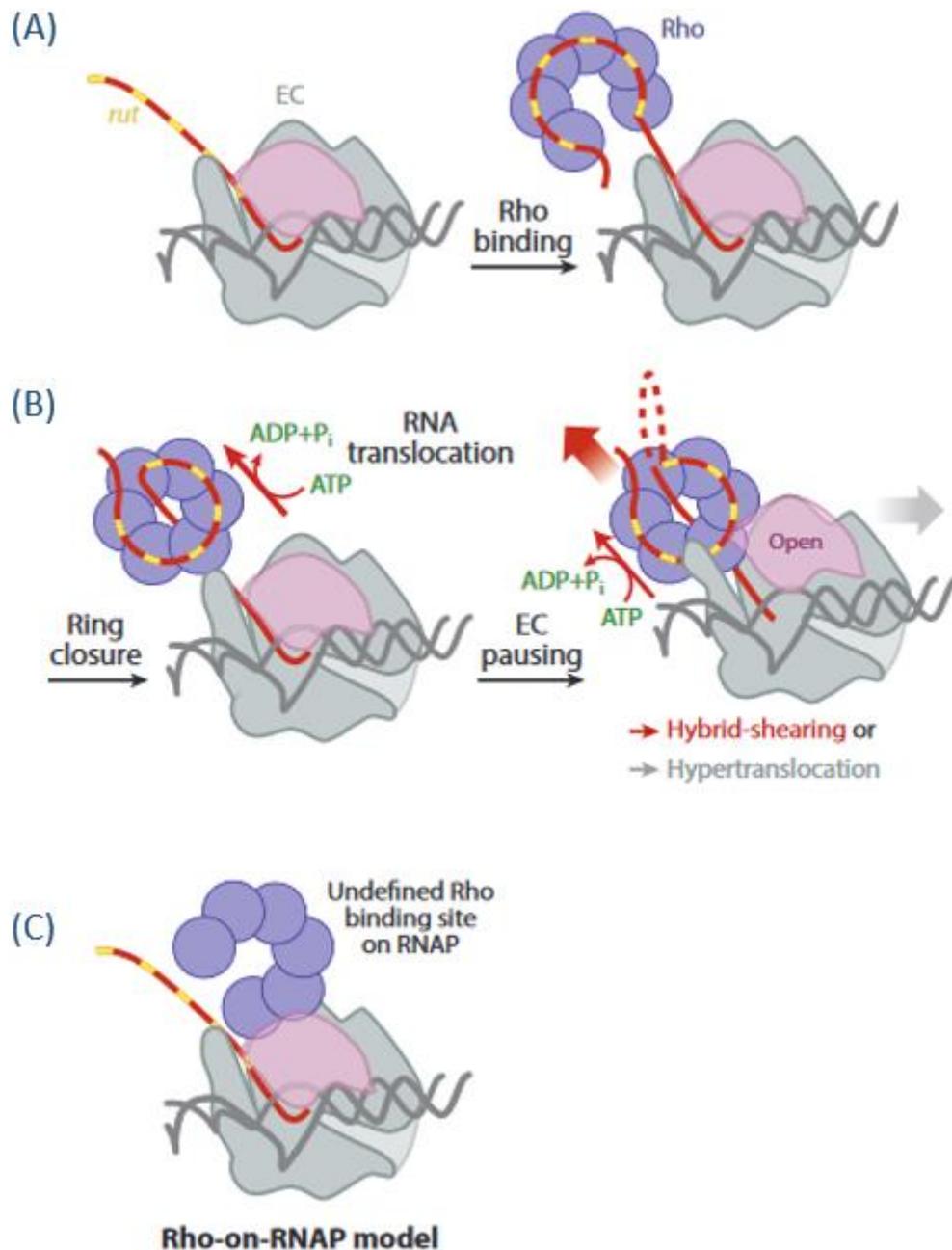


Abbildung 6 Mechanismus der Rho-abhängigen Transkriptionstermination. Nachdem Rho an die RNA gebunden und eine vollständige Ringstruktur ausgebildet hat, kommt es anschließend zur ATP-abhängigen Translokation von Rho entlang der RNA, bis der EC erreicht wird. Dies führt zur Dissoziation des ECs. Die Abbildung stammt aus Ray-Soni *et al.* (2016).

Die Rho-abhängige Transkriptionstermination spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen in Bakterien (Ray-Soni *et al.* 2016). Eine primäre Funktion ist das Verhindern und Entfernen von persistierenden RNA-DNA-Hybriden (*R-Loops*), die sich häufig *upstream* von aktiven ECs bilden (Leela *et al.* 2013). Diese Strukturen treten auf, wenn ein naszierendes RNA-Transkript an den vorübergehend exponierten DNA-Matrizenstrang *upstream* des ECs bindet, wodurch es zu Doppelstrangbrüchen kommen kann. Rho spielt auch eine wichtige

Rolle bei der Unterdrückung von *Antisense*-Transkription in verschiedenen Bakterien (Peters *et al.* 2012; Nicolas *et al.* 2012; Botella *et al.* 2017). Eine weitere Funktion von Rho ist das *Silencing* von fremder DNA (z. B. kryptische Prophagen oder durch horizontalen Gentransfer erworbene DNA-Elemente). Besonders die suboptimale *codon usage* dieser exogenen DNA-Regionen führt zu einer verminderten Kopplung des ECs an Ribosomen, wodurch die *rut*-Bindestelle stärker exponiert ist und Rho schneller rekrutiert werden kann (Cardinale *et al.* 2008). Schließlich führt die Termination von untranslatierten RNA-Transkripten zu polaren Effekten. Dabei wird die verminderte Expression eines distalen Gens in einem Operon durch ein frühzeitiges Stop-Codon oder die ineffiziente Translation eines *upstream* gelegenen Gens verursacht (Peters *et al.* 2011).

### 1.3.3 Studien zur Rho-abhängigen Transkriptionstermination in Bakterien

In Studien, die die Rho-abhängige Transkriptionstermination in Gram-negativen Bakterien, vor allem in *Escherichia coli* (*E. coli*), untersucht haben, konnten keine *Knockout*-Mutanten verwendet werden, da Rho in diesen Bakterien essentiell ist (Das *et al.* 1976). In diesen Untersuchungen wurde deshalb das Antibiotikum Bicyclomycin (BCM) genutzt. BCM wird auch als Bicozamycin bezeichnet und inhibiert spezifisch den Transkriptionsterminationsfaktor Rho. Es wurde 1972 aus *Streptomyces sapporonensis* isoliert (Miyoshi *et al.* 1972) und wird auch von zwei weiteren *Streptomyces*-Arten gebildet (Miyamura *et al.* 1973; Ochi *et al.* 1984). Die spezifische Inhibition von Rho durch BCM wird dabei über die Bindung von BCM an Rho und eine damit verbundene Interferenz mit der Bewegung von Rho entlang der RNA vermittelt (Zwiefka *et al.* 1993; Kohn & Widger 2005). In einem *in vivo*-Infektionsexperiment konnten protektive Effekte von BCM nach Infektion von Mäusen mit klinischen *E. coli*-Isolaten gezeigt werden (Nishida *et al.* 1972). BCM fand in den 1980er Jahren klinische Anwendung bei der Behandlung von Reise-Diarrhö (Ericsson *et al.* 1983) und wird aktuell in der Veterinärmedizin eingesetzt (Liste der wichtigen Antibiotika der *World Organisation for Animal Health*, 2015), um Infektionen des Gastrointestinaltrakts zu behandeln (Kohn & Widger 2005). Das Problem der zunehmenden Antibiotikaresistenz führte zu Studien, die das bakterizide Potential von BCM in *in vitro*-Experimenten mit Gram-negativen Bakterien überprüft haben. In einer Studie von Malik *et al.* (2014) wurde BCM mit Inhibitoren der Proteinbiosynthese kombiniert und anschließend das Überleben verschiedener Bakterienspezies analysiert. Die Kombination von Inhibitoren der Transkription (Rifampicin) bzw. Translation (Tetracyclin & Chloramphenicol) mit BCM hatte eine bakterizide Wirkung auf *E. coli*. Ähnliche Ergebnisse zeigten diese Antibiotika-Kombinationen bei der Behandlung von *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella enterica* Typhimurium (Malik *et al.* 2014).

### ***Escherichia coli***

Mit Hilfe des Antibiotikums BCM konnten die Effekte der Hemmung von Rho auf das Transkriptom von *E. coli* studiert werden. Dabei wurden Konzentrationen eingesetzt, die eine signifikante Reduktion der Rho-Funktion zeigten, ohne die Wachstumsrate zu beeinflussen (Ederth *et al.* 2006). In einer Tiling Array-Studie von Peters *et al.* (2012) konnten 1264 Transkripte des *E. coli* K-12 Wildtypstammes identifiziert werden, die nach Zugabe von BCM einen signifikanten Anstieg der Transkriptmengen oder der Länge der Transkripte zeigten. Von 2054 Genen am Ende von Transkriptionseinheiten (*transcription units*, TUs) wurde für 725 (35 %) eine Rho-abhängige Termination gefunden. Die Rho-abhängigen Transkriptregionen, die auf verlängerte Transkripte über das unter Kontrollbedingungen detektierte 3'-Ende hinaus zurückzuführen sind, konnten in drei Kategorien unterteilt werden: (I) *Antisense*-Transkripte, (II) *Sense*-Transkripte und (III) intergenische Transkripte. Der größte Anteil (88 %) der Rho-abhängigen Terminatoren sind dabei solche, die *Antisense*-Transkription kontrollieren (Peters *et al.* 2012). Insgesamt zeigten nach Zugabe von BCM 1555 *E. coli*-Gene signifikant erhöhte *Antisense*-Transkriptlevel (34 % aller Gene), wohingegen nur 416 Gene erhöhte *Sense*-Transkription aufwiesen. Ein erstaunliches Ergebnis der Studie von Peters *et al.* (2012) war, dass die verstärkte *Antisense*-Transkription in Abwesenheit von Rho keine signifikanten Effekte auf die Mengen der jeweiligen *Sense*-Transkripte hat.

### ***Mycobacterium tuberculosis***

Untersuchungen der Transkriptionstermination von *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) wurden durch die potentielle Nutzung des Antibiotikums BCM zur Behandlung von Tuberkulose motiviert (Botella *et al.* 2017). Tuberkulose gehört zu den bakteriellen Erkrankungen mit einer sehr hohen Mortalitätsrate. Die Therapie dieser Erkrankung besteht dabei aus einer zweimonatigen Gabe von Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamid und Ethambutol gefolgt von weiteren vier Monaten mit Rifampicin und Isoniazid. Aufgrund der stark steigenden Zahl an multiresistenten Tuberkulose-Erregern werden neue Therapieoptionen immer bedeutender. Rifampicin hemmt die Transkriptioninitiation der Bakterien durch Inhibition der RNA-Polymerase. Da Rho in *M. tuberculosis* ein essentielles Protein ist (Sasseti & Rubin 2003), wird der Einsatz von Hemmstoffen der Transkriptionstermination als potentielle Alternative zu Rifampicin diskutiert. Botella *et al.* (2017) untersuchten deshalb den Einfluss der Depletion von Rho auf das Transkriptom sowie das Überleben von *M. tuberculosis* *in vitro* und *in vivo*. Es wurden 303 chromosomale Regionen und 80 Gene mittels RNA-Seq identifiziert, die durch die Abwesenheit von Rho in *M. tuberculosis* beeinflusst werden. Ähnlich wie in der Studie von Peters *et al.* (2012)

konnten auch hier keine Effekte der erhöhten *Antisense*-Transkription auf die *Sense*-Transkription gefunden werden. Die andauernde Unterdrückung der *rho*-Expression führte zu einer verringerten Virulenz in Mäusen.

### ***Bacillus subtilis***

In einer Studie von Nicolas *et al.* (2012) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine wesentliche Funktion von Rho die Unterdrückung von *Antisense*-Transkription ist. In *B. subtilis* (Quirk *et al.* 1993), *S. aureus* und anderen Gram-positiven Bakterien (Washburn *et al.* 2001) ist Rho nicht essentiell. Um die Effekte von Rho auf das Transkriptom zu studieren, wurden Tiling Array-Transkriptionsprofile einer *B. subtilis*  $\Delta rho$ -Mutante und des zugehörigen Wildtypstammes in der exponentiellen Wachstumsphase im Vollmedium verglichen. Die Datenanalyse ergab, dass 93 chromosomale Regionen, welche 367 Gene umfassen, einen signifikanten Anstieg der Menge von *Antisense*-Transkripten bei Abwesenheit von Rho aufwiesen (Nicolas *et al.* 2012). Dieser Anstieg resultiert vornehmlich aus der Verlängerung von TUs über das im Wildtypstamm detektierte 3'-Ende hinaus, wobei für die meisten dieser TUs aufgrund der DNA-Sequenz kein starker intrinsischer Terminator vorhergesagt wurde. Auch im *B. subtilis*-Wildtypstamm sind einige TUs infolge unvollständiger Transkriptionstermination über die kodierende Region hinaus verlängert (bis zu 3,4 kb) und bilden so *Antisense*-Transkripte zu *downstream* auf dem Gegenstrang gelegenen Genen (Abbildung 7, asRNA S1144). In der  $\Delta rho$ -Mutante waren diese 3'-Regionen bis zu 12 kb lang. Diese Ergebnisse zeigten, dass Rho ein genereller Inhibitor von *Antisense*-Transkription bei *B. subtilis* ist.

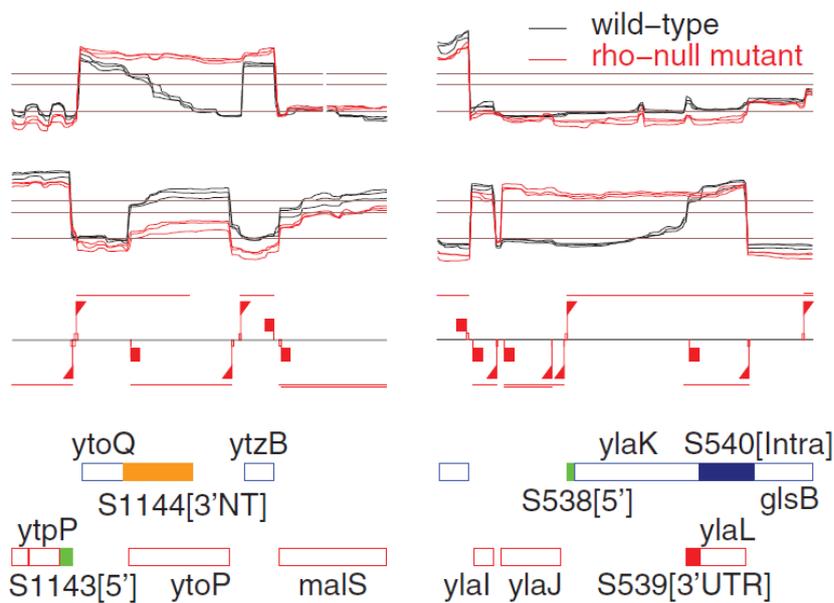


Abbildung 7 Expressionsprofile des *B. subtilis* Wildtyps und einer  $\Delta\rho$ -Mutante für die Gene *ytoQ* und *ylaL*. *ytoQ* besitzt keinen intrinsischen Terminator und ist durch das Fehlen eines definierten 3'-Endes im Wildtyp gekennzeichnet, wodurch es zur Bildung der *Antisense*-RNA S1144 kommt. Bei *ylaL* erfolgt in der  $\Delta\rho$ -Mutante am Ende des Gens keine Termination, wodurch das Transkript bis zum nächsten Terminator verlängert wird. Die Abbildung stammt aus Nicolas *et al.* (2012)

### *Staphylococcus aureus*

Um die Rho-abhängige Transkriptionstermination in *S. aureus* genomweit zu untersuchen, wurden in einer Tiling Array-Studie von Mäder *et al.* (2016) die Transkriptom einer *S. aureus*  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 und des Wildtypstamms HG001 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen miteinander verglichen. Dazu wurden Proben während des Wachstums im *tryptic soy broth*-Medium (TSB) und im Zellkulturmedium RPMI in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase gewonnen. Die  $\Delta\rho$ -Mutante zeigte dabei ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum.

Es konnten insgesamt 416 chromosomale Regionen identifiziert werden, deren Transkriptmengen in einer der vier Bedingungen in der  $\Delta\rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp wenigstens 4-fach erhöht waren. Von diesen Regionen ließen sich nur 11 % annotierten Genen zuordnen, während eine massive Erhöhung der Menge solcher Transkripte festgestellt wurde, die vom Gegenstrang kodierender Gene stammen. Die Transkripte, die höhere Level in der  $\Delta\rho$ -Mutante aufwiesen, konnten drei Gruppen zugeordnet werden: (I) Verlängerung von TUs über das im Wildtypstamm detektierte 3'-Ende hinaus (Abbildung 8A), (II) erhöhte Expression von Protein-kodierenden Genen (Abbildung 8B) und (III) *Antisense*-Transkripte, die nicht im Wildtyp, sondern nur in der  $\Delta\rho$ -Mutante detektiert werden konnten (Abbildung 8C). Mehr als zwei Drittel der 416 Regionen wurden dabei der dritten Gruppe zugeordnet, wohingegen verhältnismäßig wenige TUs eine 3'-

Verlängerung in der  $\Delta rho$ -Mutante aufwiesen. Dieser Befund war ungewöhnlich, da erwartet wurde, dass eine Verlängerung von TUs infolge des Durchlesens von (partiell) Rho-abhängigen Terminatoren der wesentliche Mechanismus ist, durch den in Abwesenheit von Rho zusätzliche *Antisense*-Transkripte entstehen.

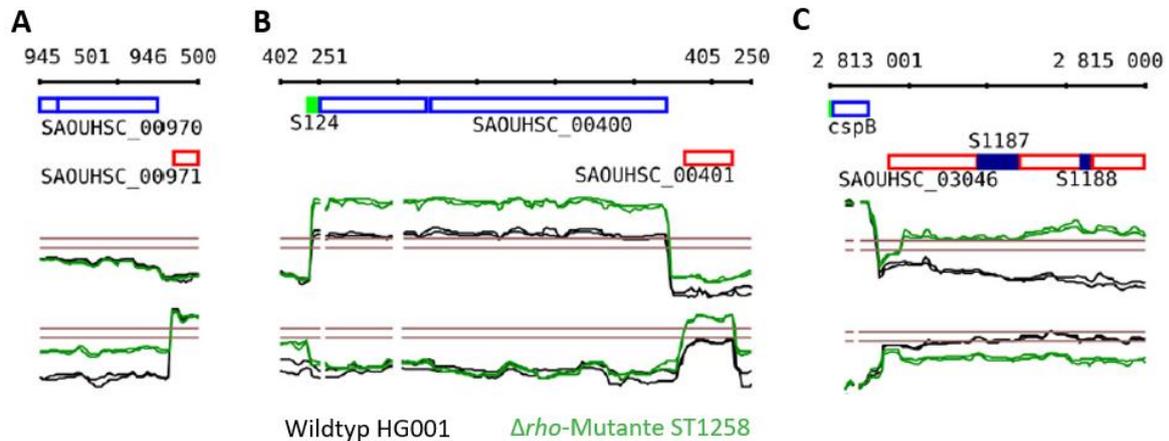


Abbildung 8 Expressionsprofile des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 in der exponentiellen Wachstumsphase in RPMI-Medium. (A) Verlängerung von TUs über das im Wildtypstamm detektierte 3'-Ende hinaus, (B) erhöhte Expression von Protein-kodierenden Genen und (C) *Antisense*-Transkripte, die nicht im Wildtyp, sondern nur in der  $\Delta rho$ -Mutante detektiert werden konnten. Die Abbildung stammt aus Mäder *et al.* (2016).

Die erhöhte *Antisense*-Transkription in der *S. aureus*  $\Delta rho$ -Mutante hatte dabei auch einen Effekt auf die Menge der entsprechenden *Sense*-Transkripte. Für die Mehrzahl der Gene, die in der  $\Delta rho$ -Mutante niedrigere mRNA-Level aufwiesen, konnte eine *Antisense*-RNA (asRNA) auf dem Gegenstrang detektiert werden. Unter der Bedingung des exponentiellen Wachstums in RPMI-Medium waren es beispielsweise 153 von 167 (92 %) Genen.

## 1.4 *Antisense*-RNA in Bakterien

In bakteriellen Genomen kodiert eine Vielzahl von Regionen für regulatorische RNAs – sogenannte *small regulatory RNAs* (sRNAs). Diese regulatorischen RNAs können sowohl die Genexpression (sRNA-mRNA-Interaktion) als auch die Funktion von Proteinen (sRNA-Protein-Interaktion) beeinflussen (Thomason & Storz 2010). Bei der Interaktion von sRNAs mit Proteinen bindet die sRNA direkt an ihr Zielprotein und steuert so dessen Aktivität (Thomason & Storz 2010). Die Regulation der Genexpression erfolgt in der Regel über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Nukleotiden der sRNA mit Nukleotiden im Bereich der Ribosomen-Bindestelle der mRNA. Im Gegensatz zu diesen *trans*-kodierten regulatorischen RNAs werden die *cis*-kodierten RNAs als asRNAs bezeichnet. *Trans*-kodierte sRNAs sind zu den Ziel-RNAs nur unvollständig komplementär und haben in den meisten Fällen mehrere Targets. *Cis*-kodierte asRNAs werden hingegen vom DNA-Gegenstrang des kodierenden Gens transkribiert und sind damit vollständig komplementär zur Ziel-RNA. Sie können die Expression des Zielgens über verschiedene Mechanismen regulieren, zu denen auch die Blockierung der Ribosomen-Bindestelle gehört (Thomason & Storz 2010). Einige asRNAs besitzen eine spezifische regulatorische Funktion, andere sind dagegen das Ergebnis von „*transcriptional noise*“ durch unspezifische Transkriptionsinitiation (Struhl 2007) oder auf unvollständige Transkriptionstermination zurückzuführen. Zu den bekannten Funktionen von asRNAs gehören beispielsweise die Kontrolle der Synthese spezifischer Toxine (Typ I Toxin-Antitoxin-Systeme; Kawano *et al.* 2007; Silvaggi *et al.* 2005; Durand *et al.* 2012) und die Regulation der Synthese von Transkriptionsregulatoren. Es wurde außerdem gezeigt, dass asRNAs die Level von Enzymen und Virulenzfaktoren beeinflussen können (Thomason & Storz 2010), wie beispielsweise im Fall der Urease B-Untereinheit von *Helicobacter pylori* (Wen *et al.* 2013).

Das gemeinsame Auftreten von *Sense*- und *Antisense*-RNA in einer genomischen Region, also von überlappenden Transkripten, kann auf vier unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden (Abbildung 9): (I) „echte“ *Antisense*-RNA, d. h. RNA, die für kein Protein kodiert und komplementär zum gesamten Gen oder Teilen des Gens ist, (II) Überlappung eines Gens durch die 5'-UTR oder (III) die 3'-UTR eines benachbarten Gens auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang und (IV) in überlappenden Operons, d. h. wenn zwei Gene eine TU bilden, zwischen denen auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang ein Gen lokalisiert ist, das in entgegengesetzter Richtung transkribiert wird (Lasa *et al.* 2012).

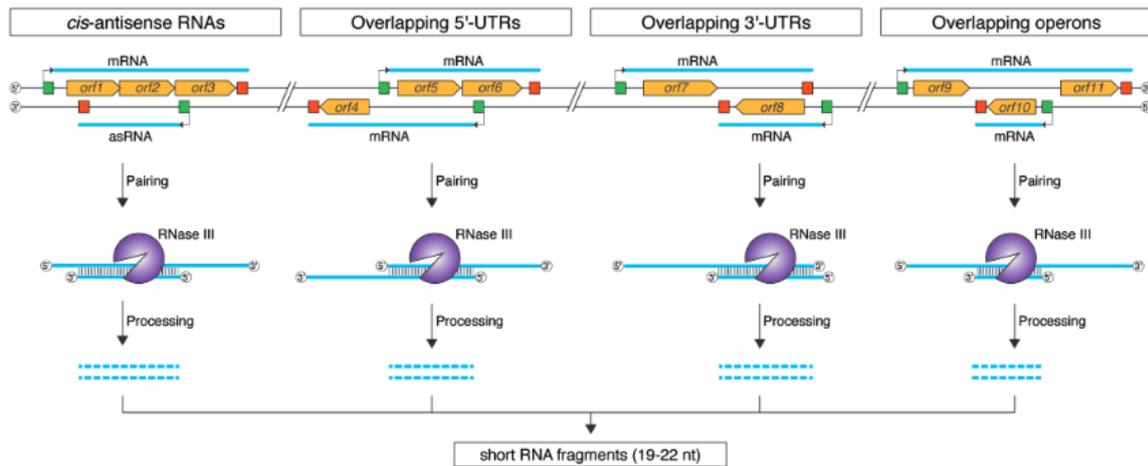


Abbildung 9 Schematische Übersicht der Mechanismen zur Entstehung von *Antisense*-Transkripten. Die abgebildeten Typen von überlappenden Transkripten entstehen durch die Synthese eigenständiger asRNA, überlappende 5'- oder 3'-UTRs oder überlappende Operons. Die *Sense-Antisense*-RNA-Duplex wird durch RNaseIII in kurze RNA Fragmente prozessiert. Die Abbildung stammt aus Lasa *et al.* (2012).

Es gibt unterschiedliche Mechanismen, wie die Genexpression durch asRNAs beeinflusst werden kann (Thomason & Storz 2010). Zum einen kann die Transkription eines Gens durch eine asRNA blockiert werden, und zwar durch Transkriptions-Interferenz oder durch Transkriptions-Attenuierung. Bei der Transkriptions-Interferenz wird die Bindung der RNAP an den Promotor auf dem *Sense*-Strang durch die Synthese der asRNA blockiert (Abbildung 10a). Bei der Transkriptions-Attenuierung bewirkt die Doppelstrangbildung zwischen *Sense*- und *Antisense*-RNA durch Veränderung der mRNA-Struktur die vorzeitige Termination der Transkription (Abbildung 10b). Die Bindung von asRNA an die *Sense*-RNA kann aber auch zu einer Veränderung der mRNA-Stabilität führen, wobei die Degradation der mRNA durch Endonukleasen oder Exonukleasen begünstigt wird oder es zu einer Stabilisierung kommt, wenn der Abbau der mRNA verhindert wird (Abbildung 10c, d). Ein weiterer Mechanismus ist die Hemmung der Translation. Diese kann direkt erfolgen, wenn durch die gebundene asRNA die Bindungsstelle für die Ribosomen nicht zugänglich ist (Abbildung 10e) oder indirekt, indem die Basenpaarung zwischen *Sense*- und *Antisense*-RNA außerhalb der Ribosomen-Bindungsstelle durch Strukturveränderung der mRNA die Ribosomenbindung positiv oder negativ beeinflusst wird (Abbildung 10f).

Die Prozessierung dieser *Sense-Antisense*-Transkripte erfolgt durch die Endonuklease RNaseIII, die auch doppelsträngige Regionen von Transkripten spalten kann. In einer Studie von Lasa *et al.* (2012) wurde in einer Transkriptomanalyse von *S. aureus* gezeigt, dass die dabei entstehenden RNA-Fragmente ca. 20 Nucleotide lang sind, deren Menge für beide Stränge gleich und auch proportional zur Menge an doppelsträngiger RNA ist.

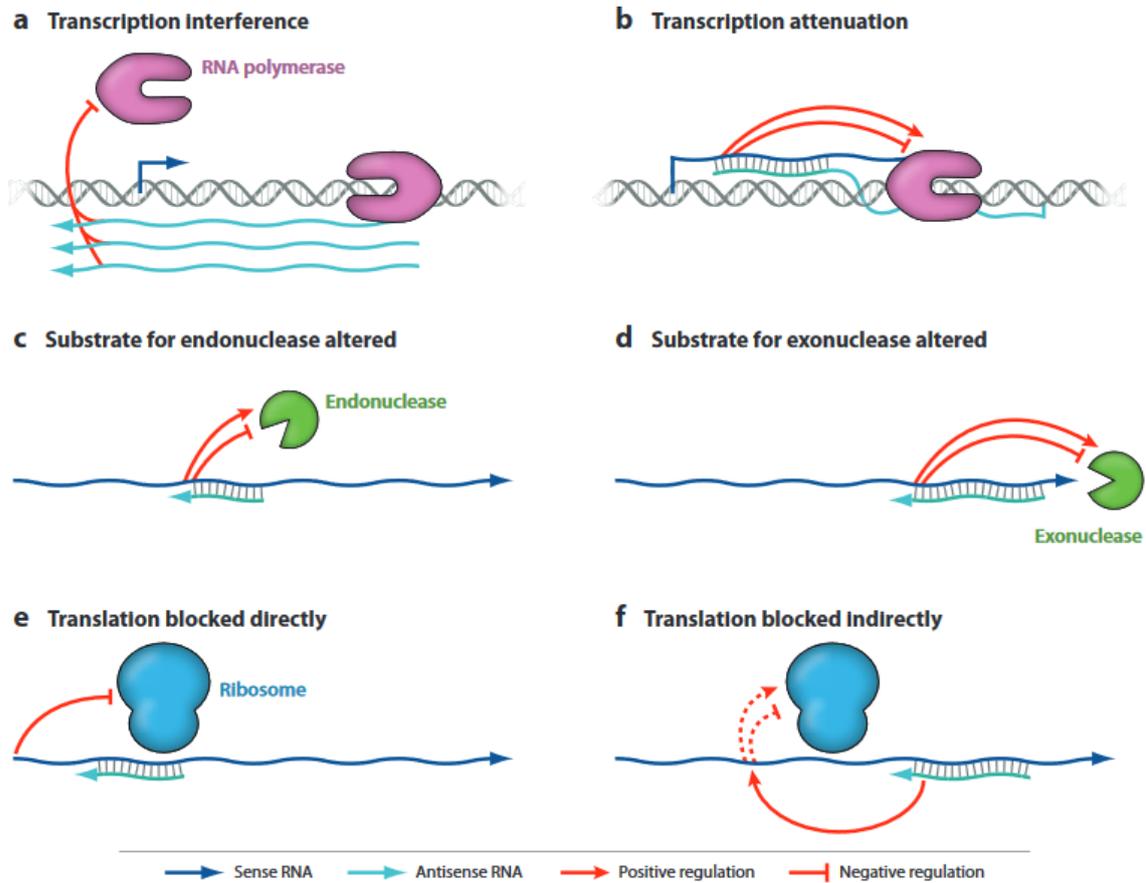


Abbildung 10 Schematische Übersicht der Mechanismen, wie asRNA Transkription und Translation beeinflussen kann. **(a)** Bei der Transkriptions-Interferenz kommt es zur Blockade der Bindung der RNAP an den Promotor auf dem *Sense*-Strang durch die Synthese der asRNA. **(b)** Bei der Transkriptions-Attenuierung führt eine Doppelstrangbildung zwischen *Sense*- und *Antisense*-RNA zur vorzeitigen Termination. **(c)** Die Bindung von asRNA an *Sense*-RNA kann eine RNA-Stabilisierung oder verstärkte Degradation durch Endonukleasen oder Exonukleasen **(d)** bewirken. **(e)** Eine direkte Blockade der Translation ist möglich, wenn durch die gebundene asRNA die Ribosomen-Bindungsstelle nicht zugänglich ist. **(f)** Eine indirekte positive oder negative Regulation der Translation kann durch Bindung der asRNA außerhalb der Ribosomen-Bindungsstelle erfolgen. Die Abbildung stammt aus Thomason & Storz (2010).

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

*S. aureus* zählt zu den häufigsten Erregern von nosokomialen Infektionen weltweit und kann lebensbedrohliche Erkrankungen hervorrufen. Diese Erkrankungen werden durch eine Reihe von Virulenzfaktoren hervorgerufen, deren Synthese in *S. aureus* einem komplexen regulatorischen Netzwerk unterliegt. Bei der Kontrolle der Genexpression dieser Virulenzfaktoren spielen insbesondere die beschriebenen Transkriptionsfaktoren und alternativen Sigma-Faktoren eine Rolle, da diese die Transkriptionsinitiation beeinflussen. Welchen Einfluss jedoch die Transkriptionstermination auf die Expression von Virulenzfaktoren hat, ist bisher nur wenig untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, ausgehend von den weitreichenden Veränderungen des *S. aureus*-Transkriptomts infolge einer Inaktivierung des Transkriptionsterminationsfaktors Rho (Mäder *et al.* 2016) die physiologische Rolle von Rho in *S. aureus* näher zu untersuchen. Dazu sollte zunächst eine vergleichende Analyse des zellulären und extrazellulären Proteoms des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 durchgeführt werden. Die Unterschiede in der Proteinmenge zwischen beiden Stämmen sollten relativ in einem Daten-unabhängigen Analyseverfahren quantifiziert und die Ergebnisse mit den Befunden der Tiling Array-Studie von Mäder *et al.* (2016) verglichen werden. Es sollte außerdem geprüft werden, ob veränderte Mengen von Virulenzfaktoren in der  $\Delta rho$ -Mutante einen Einfluss auf das Überleben von Mäusen in einem Bakteriämie-Infektionsmodell haben. Zusätzlich sollte die Internalisierungs- und Überlebensrate des *S. aureus*-Wildtyps und einer isogenen  $\Delta rho$ -Mutante in einem *in vitro*-Infektionsexperiment mit humanen Lungenepithelzellen vergleichend untersucht werden. Ebenfalls sollte die Hemmung von Rho durch das Antibiotikum Bicyclomycin und die daraus resultierenden Effekte auf Transkriptom- und Proteomebene analysiert werden.

Zusammengefasst sollten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse dazu beitragen, den Zusammenhang zwischen Rho-abhängiger Transkriptionstermination und der Virulenz von *S. aureus* besser zu verstehen und die pathophysiologischen Konsequenzen dieser neuen Ebene der Kontrolle der Virulenz-Genexpression zu beleuchten.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Bakterienstämme und Zelllinien

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Die Proteomanalysen und Infektionsversuche wurden mit den *S. aureus* Stämmen HG001 (Wildtyp, WT) und einer isogenen *rho*-Mutante ST1258 ( $\Delta\rho$ -Mutante,  $\Delta\rho$ ) durchgeführt. Der Stamm HG001 ist ein Derivat des Stammes NCTC 8325-4, welcher 1960 aus einem Sepsispatienten isoliert wurde. Dieser Stamm besitzt eine 11 bp-Deletion im *rsbU*-Gen, während im Stamm HG001 das *rsbU*-Gen wiederhergestellt wurde (Herbert *et al.* 2010). Bei der isogenen  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 handelt es sich um den Stamm HG001 mit einer markerlosen Deletion des *rho*-Gens (Mäder *et al.* 2016). Zudem wurden von Dr. Michel Debarbouille (Institut Pasteur, Paris) die  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 mit dem Leerplasmid pMKX versehen und ein Komplementationsstamm ST1258 pMKX::*rho* konstruiert. Das Plasmid pMKX ist ein Derivat des Plasmids pMK4 (Sullivan *et al.* 1984) und trägt einen Xylose-induzierbaren Promotor des *Staphylococcus xylosus* *xylA*-Gens zur Genexpression. Für die Konstruktion wurde in einem ersten Schritt ein 1,7 kb *HindIII*-*Bam*HI DNA-Fragment, welches die *S. xylosus* Gene *xylR* (Repressorgen) und *xylA* (Promotor) trägt (Sizemore *et al.* 1991), aus dem Plasmid pRB473-XylR isoliert. Dieses DNA-Fragment wurde anschließend zwischen die korrespondierenden Restriktionsstellen des Plasmids pUC18 kloniert, wodurch das Plasmid pUCXyl entstand. Nach einer Sequenzierung wurde dieses Plasmid genutzt, um das 1,7 kb *xylR*-*xylA*-Fragment zu amplifizieren. Dieses Fragment wurde dann in das Plasmid pMK4 kloniert, welches als Selektionsmarker eine Chloramphenicol-Kassette (CM) trägt. Die Expression des *rho*-Gens von *S. aureus* unter Kontrolle des *xylA*-Promotor im Stamm ST1258 pMKX::*rho* wurde in RPMI- und BHI-Medium überprüft (Abbildung A1). Es konnten keine Unterschiede in der Expression des Gens mit und ohne Zugabe von 1 % Xylose festgestellt werden. Zudem waren die Expressionslevel des *rho*-Gens zwischen dem Wildtyp HG001 und dem Komplementationsstamm ST1258 pMKX::*rho* vergleichbar.

Für *in vitro*-Infektionsversuche wurden der Wildtyp HG001 und die  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 mit Plasmiden versehen, welche für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodieren und zudem eine Erythromycin-Kassette (Ery) als Selektionsmarker tragen. Dabei wurden zunächst verschiedene GFP-Varianten in die Staphylokokken eingebracht und anschließend charakterisiert. Ausgangspunkt war dabei das Plasmid pJL-sar-GFP, welches GFP unter dem konstitutiv aktiven Promotor *sarA* P1 exprimiert (Liese *et al.* 2013). Die Gensequenz dieses GFPs wurde in einem ersten Schritt durch Dr. Henrike Pförtner (Universitätsmedizin Greifswald) mittels der webbasierten Anwendung OPTIMIZER (Puigbò *et al.* 2007) an die Codon-Nutzung von *S. aureus* angepasst. In einem zweiten Optimierungsschritt erfolgte eine Anpassung der Sequenz des GFPs zusätzlich an die tatsächlich kodierten tRNAs von *S. aureus* durch Dr. Alexander Reder (Universitätsmedizin Greifswald). Das *gfp*-Gen wurde dabei mittels Gensynthese durch die Firma GenScript hergestellt und in das Plasmid pJL-sar unter Kontrolle des *sarA* P1 Promotors kloniert. Als Kontrolle wurde ebenfalls das Leerplasmid pJL-sar in den Wildtyp und die  $\Delta rho$ -Mutante transformiert. Die so konstruierten *S. aureus*-Stämme sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 Bakterienstämme

Bezeichnung der <i>S. aureus</i> Stämme	Genotyp	Abkürzung des Plasmids	Referenz
HG001	<i>rsbU+</i>	–	Herbert <i>et al.</i> (2010)
HG001 pJL-sar	pJL-sarA P1- $\Delta gfpmut2$	+p [-]	diese Arbeit
HG001 pJL-sar-GFP	pJL-sarA P1- <i>gfpmut2</i>	+p [G]	Liese <i>et al.</i> (2013)
HG001 pJL-sar-GFPopt	pJL-sarA P1- <i>gfpmut2opt</i>	+p [Go]	Dr. Henrike Pförtner
HG001 pJL-sar-GFPpredopt	pJL-sarA P1- <i>gfp</i>	+p [Gro]	diese Arbeit
ST1258	$\Delta rho$	–	Mäder <i>et al.</i> (2016)
ST1258 pJL-sar	$\Delta rho$ , pJL-sarA P1- $\Delta gfpmut2$	+p [-]	diese Arbeit
ST1258 pJL-sar-GFPopt	$\Delta rho$ , pJL-sarA P1- <i>gfpmut2opt</i>	+p [Go]	diese Arbeit
ST1258 pJL-sar-GFPpredopt	$\Delta rho$ , pJL-sarA P1- <i>gfp</i>	+p [Gro]	diese Arbeit
ST1258 pMKX	$\Delta rho$ , pMKX	pMKX	Dr. Michel Debarbouille
ST1258 pMKX:: <i>rho</i>	$\Delta rho$ , pMKX:: <i>rho</i>	pMKX:: <i>rho</i>	Dr. Michel Debarbouille

### 2.1.2 Humane Zelllinien

Die humane alveoläre Epithelzelllinie A549 (ATCC number CCL-185) und die humane bronchiale Epithelzelllinie 16HBE14o- wurden als Modell für *in vitro*-Infektionsexperimente mit *S. aureus* genutzt.

A549-Zellen wurden aus einem Lungenkarzinom eines 58 Jahre alten Patienten isoliert. Sie weisen ähnliche Eigenschaften wie Typ-II-Alveolarepithelzellen mit zahlreichen kleinen zytoplasmatischen Granula auf. Die Zelllinie ist hypotriploid mit einem hohen Auftreten einer Chromosomenzahl zwischen 64 und 67 (Lieber *et al.* 1976).

16HBE14o- Zellen wurden erstmals 1992 beschrieben und zur Untersuchung von Transmembranregulatoren, die mit cystischer Fibrose assoziiert sind, genutzt (Cozens *et al.* 1992; Cozens *et al.* 1994). Es handelt sich hierbei um bronchiale Epithelzellen, die in der Lage sind, ein differenziertes polarisiertes Epithelium zu formen. Zwischen den Zellen kommt es zur Ausbildung von *tight junctions* sowie der Expression von Ionen-Transportern, wodurch sie starke Ähnlichkeit zu primären Zellen aufweisen (Forbes *et al.* 2003).

## 2.2 Chemikalien, Enzyme, Farbstoffe & Kits

Tabelle 6 Chemikalien, Enzyme, Farbstoffe & Kits

Chemikalien	Hersteller
2,2'-Bipyridyl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Acetonitril	J.T. Baker, Inc., Deventer, Niederlande
Actinomycin D	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Agarose Electrophoresis Grade	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Antibiotic Medium 3	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Bicyclomycin	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Blocking Reagent	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Brain heart infusion Medium (BHI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Calcium-D(+)-Panthothensäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Citrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chlorwasserstoffsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cobalt-(II)-Chlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Cy3	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Cy5	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Cyanocobalamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
D-(+)-Biotin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DAKO fluorescence mounting medium	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Diamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Diethanolamin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DNase	QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eisen-(III)-Chlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Erythromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FairPlay III Microarray Labeling Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Fetales Bovines Serum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
GoTaq® G2 Green Master Mix	Promega, Madison, WI, USA
Guanidin-Thiocyanat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Guava Easy Check Kit	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Hoechst 33258	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
HPLC-Wasser	J.T. Baker Inc., Avantor, Arnhem, Niederlande
HRM Calibration Kit	Biognosys AG, Schlieren, Schweiz
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IRDye® 800CW Streptavidin	LI-COR®, Lincoln, NE, USA
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kupfer-(II)-Chlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
LB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Alanin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Arginin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Aspartat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Cystein	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin, 200 mM	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
L-Glutamat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Histidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Leucin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
L-Methionin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Prolin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Serin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Threonin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Valin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lysostaphin, >3000 U/mg	AMBI Products LLC, Lawrence, NY, USA
MEGAscript T7 Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Maleinsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mangan-(III)-Chlorid-Tetrahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MEM (1x)	Biochrom, Berlin, Deutschland
MEM (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Methylenblau Hydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methylviologen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Micro BCA™ Protein Assay Kits	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MOPS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mupirocin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat-trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat-dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NEAA	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Nickel-(II)-Chlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nicotinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
N-Lauroylsarcosinat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NucleoSpin® Gel and PCR clean up Kit Orange G	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düre, Deutschland
p-Aminobenzoessäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phalloidin konjugiert an Alexafluor 568	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RDD-Puffer	QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland
Pyridoxamindihydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Riboflavin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
RNA clean up and concentration Kit	Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, USA
RNase-freies Wasser	Ambion®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Chemikalien	Hersteller
Roti-Aqua-(Phenol-Chloroform-Isoamyl Alkohol; 25:24:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Select Agar	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
StrataClean™ Resin <i>Beads</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Sucrose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Thiaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Thiourea	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trypsin	Promega, Madison, WI, USA
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02) in PBS	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Trypsin/EDTA XXL (0,25 %/0,02) in PBS	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
TSB	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Urea	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Vancomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vancomycin-BODIPY FL	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Xylose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Zinkchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## 2.3 Primer

Tabelle 7 Primer

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3') <sup>4</sup>
SA_00974_AS_for	TTAGCTATTGAAAAGATTTA
SA_00974_AS_T7rev	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATGTAGAAAATATTTTCAC</u>
SA_01432_AS_for	TTAATTTATTAATTTATTTTC
SA_01432_AS_T7rev	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGACGTATCTCTTTGCTCATCGT</u>
SA_02888_for	CAATTAACAATTACACCC
SA_02888_T7rev	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAATACCTATCGCAAAGGC</u>
SA_03046_AS_for	ATAGAAAGCGCATTGTGCATCGTAT
SA_03046_AS_T7rev	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTATGTCAAAACATTTAGTC</u>
SA_butA_for	ATGACAAACAACAAGTAGC
SA_butA_T7rev	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGATTTACCTGCTTCTTCGGCTG</u>
SA_chp_for	ATGAAAAAGAAATTAGCAACAACAG
SA_chp_T7rev	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGATTAGTATGCATATTCATTAG</u>
SA_coa_for	ATGAAAAAGCAAATAATTTTCGCTAG
SA_coa_T7rev	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCTGTAGTTCATTGTATTC</u>
SA_saeP_for	ATGAATACAAAATATTTTTAGCAG
SA_saeP_T7rev	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGATTATTTAATTTAGCGCCGC</u>

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3') <sup>4</sup>
SA_serA_for	ATGAAGCAATTTAATGTACT
SA_serA_T7rev	<u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGTAATGTAACGAAATCAG</u>
SA_rho_for	ATGCCTGAAAGAGAACGTAC
SA_rho_T7rev	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGACGCTATTTCTTTAATAACG</u>

<sup>4</sup>Nukleotide der T7-Promotorsequenz sind unterstrichen

## 2.4 Spezifische Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8 Spezifische Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
µC18-Säulen, ZipTip®	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Acclaim™ PepMap 100-C18 (2 cm x 75 µm, 3 µm, 100 Å), Vorsäule	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Accucore 150-C18 (25 cm x 75 µm, 2,6 µm, 150 Å), Analytische Säule	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Countess™ Cell Counting Chamber Slides	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Elektroporationsküvette, 2 mm	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Gasket Slide (8 Microarrays)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Glass Beads (unwashed, ≤ 106 µm)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glasreaktionsgefäß 1,5 ml + Mikroeinsatz 0,1 ml mit Septum oder Schraubdeckel 8 mm	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen, <i>low protein binding</i> (epT.I.P.S. 10 µl/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, <i>low protein binding</i> (stack pack 100 µl)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Präzisionsdeckglas, Ø 18 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäß, <i>low protein binding</i> (0,65 ml, 1,7 ml)	Sorensen™ BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
RNA Nano Chip	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
S-Pak Filters (0,22 µm)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Steritop-GP Filtereinheit (0,22 µm)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturplatte (Ø 10 cm, 6-Well, 12-Well)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

## 2.5 Instrumente

Tabelle 9 Instrumente

Instrument/Zubehör	Hersteller
Agilent G2505C Microarray Scanner System	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Blaulichttisch Flu-0-Blu	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Chip Priming Station	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Countess® Automated Cell Counter	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dionex UltiMate 3000 RSLC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FACSAria™ IIIu	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FastPrep® FP120	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gene Pulser Xcell™ Electroporation System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Guava easyCyte™	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Hybrisisierungssofen Hybaid Shake'n stack	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hybridierungssofen SHO1	Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA
ImagerM2 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Lyophilisator	Christ, Osterode, Deutschland
Microarray-Slideholder	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Mikro-Dismembrator S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Nano Drop™ 8000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nanospray Flex™ Ion source	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Odyssey® CLx Imaging System	LI-COR®, Lincoln, NE, USA
PicoTip® Emitter	New Objective Inc., Woburn, MA, USA
Q Exactive™ Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Q Exactive™ Plus Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spectrophotometer V-1200	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Stratalinker® UV Crosslinker 1800	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Thermocycler TGradient	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
TriVersa NanoMate	Advion Inc., Ithaca, NY, USA
Ultra Rocker Rocking Platform	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
VacuGene XL Vacuum blotting system	Pharmacia Biotech AG, Dübendorf, Deutschland
Varioskan™ Flash multimode reader	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Wasserbad Grant OLS 200	Grant Instruments, Cambridge, England

## 2.6 Medien, Puffer und Lösungen

### 2.6.1 Medien

Tabelle 10 Medien

Medium	Zusammensetzung
BHI (1 l)	37 g BHI 1 l <i>A. dest.</i> Autoklaviert
CDM <sup>5</sup>	<p><u>Grundmedium</u></p> <p>10,000 mM di-Natriumhydrogenphosphat 10,000 mM Kaliumhydrogenphosphat 0,811 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat 9,348 mM Ammoniumchlorid 8,556 mM Natriumchlorid</p> <p><u>Aminosäuren</u></p> <p>2 mM jeweils von L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Aspartat, L-Cystein, L-Glutamin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Valin,</p> <p><u>Vitamine</u></p> <p>0,036 µM Cyanocobalamin 0,290 µM p-Aminobenzoessäure 0,040 µM D-(+)-Biotin 0,810 µM Nicotinsäure 0,210 µM Calcium-D(+)-Panthothensäure 0,620 µM Pyridoxamindihydrochlorid 0,290 µM Thiaminhydrochlorid 0,260 µM Riboflavin</p> <p><u>Spurenelemente</u></p> <p>0,510 µM Zinkchlorid 0,500 µM Mangan-(III)-Chlorid-Tetrahydrat 0,097 µM Borsäure 1,460 µM Cobalt-(II)-Chlorid-Hexahydrat 0,015 µM Kupfer-(II)-Chlorid 0,100 µM Nickel-(II)-Chlorid-Hexahydrat 0,148 µM Natriummolybdat-Dihydrat</p> <p><u>Supplemente</u></p> <p>0,14200 mM Citrat 7,50000 mM Glucose 0,00075 mM Eisen-(III)-Chlorid-Hexahydrat 0,00300 mM Natriumhydroxid pH 7,4 filtriert mit Steritop-GP Filtereinheit (0,22 µm)</p>

MATERIAL

Medium	Zusammensetzung	
eMEM (100 ml)	100 ml	MEM (1x) 10 ml FCS 2 ml L-Glutamin (200 mM) 1 ml NEAA (100x)
LB (1 l)	20 g 1 l	LB <i>A. dest.</i> autoklaviert
LB-Agar (1 l)	20 g 15 g 1 l	LB Select Agar <i>A. dest.</i> autoklaviert
PAB (4x, 100 ml)	7 g	Antibiotic Medium 3 <i>ad</i> 100 ml <i>A. dest.</i> autoklaviert
pMEM (100 ml)	10 ml 1 ml 1 ml 2 ml 8 ml 4 ml 4 ml 4 ml 4 ml 62 ml	MEM (10x) NEAA (100x) HEPES (1 M) L-Glutamin (200 mM) Tryptophan (25 mM) AA Mix 1 (Ala, Val, Leu, Ile, je 50 mM) AA Mix 2 (Asp, Glu, je 50 mM) AA Mix 3 (Ser, Thr, Cys, je 50 mM) AA Mix 4 (Pro, Phe, His, je 50 mM) HPLC-Wasser pH 7,4 filtriert mit Steritop-GP Filtereinheit (0,22 µm)
RPMI 1640 Medium		mit L-Glutamin und Natriumbicarbonat (2 g/l) ohne Phenolrot und HEPES (Gibco®)
SMM (2x, 100 ml)	34,2 g 0,81 g 0,46 g	Sucrose Magnesiumchlorid Maleinsäure pH 6,5 <i>ad</i> 100 ml <i>A. dest.</i> autoklaviert
SMMP (10 ml)	5,5 ml 4 ml 0,5 ml	SMM (2x) PAB (4x) BSA (10 %) 1 ml Aliquots, Lagerung bei - 20°C
Sucroselösung (500 mM, 1 l)	171,2 g	Sucrose <i>ad</i> 1 l HPLC-Wasser
TSB (1 l)	30 g 1 l	TSB <i>A. dest.</i> autoklaviert

Medium	Zusammensetzung
TSB-Agar (1 l)	30 g TSB 15 g Select Agar 1 l A. dest. autoklaviert

<sup>5</sup>Das verwendete chemisch definierte Medium (CDM) ist eine Modifikation des Mediums von Gertz *et al.* (1999). Von allen Komponenten des Mediums (mit Ausnahme von L-Cystein) wurden jeweils Stammlösungen hergestellt, die steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt wurden. Für jede Kultivierung wurde L-Cystein frisch gelöst und anschließend das Medium aus den Stammlösungen angesetzt.

## 2.6.2 Puffer und Lösungen für Transkriptomanalysen

Tabelle 11 Puffer und Lösungen für Transkriptomanalysen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
<i>Blocking Reagent</i>	20 g <i>Blocking Reagent</i> 20 ml Puffer 1 (10x) <i>ad</i> 200 ml A. dest. autoklaviert
Chloroform/ Isoamylalkohol (100 ml)	96 ml Chloroform 4 ml Isoamylalkohol
Denaturierungs- lösung (1 l)	2 g Natriumhydroxid 0,5844 g Natriumchlorid
Hybridisierungs- lösung	250 ml 20x SSC 10 ml 10 % N-Lauroylsarcosinat 2 ml 10 % SDS 200 ml 10 % <i>Blocking Reagent</i> 500 ml Formamid <i>ad</i> 1 l A. dest. 50 ml Aliquots, Lagerung bei - 20°C
<i>Killing buffer</i>	10 ml Tris-HCl, (1 M, pH 7,5) 2,5 ml Magnesiumchlorid-Hexahydrat (1 M) 5 ml Natriumazid (2 M) <i>ad</i> 500 ml A. dest.
<i>Lysis solution</i>	118,16 g Guanidin-Thiocyanat 2,03 ml Natriumacetat (0,025 M, pH 5,2) 12,5 ml 10 % N-Lauroylsarcosinat <i>ad</i> 500 ml A. dest.
Methylenblau- Lösung	100 mg Methylenblau 2 ml Essigsäure (99 %) 13,5 ml Natriumacetat (3 M, 5,2 %) <i>ad</i> 100 ml A. dest.

## MATERIAL

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
MOPS-Puffer (10x, 1 l)	41,85 g 6,8 g 3,72 g	MOPS Natriumacetat-trihydrat EDTA pH 7,0 filtriert mit Steritop-GP Filtereinheit (0,22 µm)
Neutralisierungs- lösung (1 l)	12,114 g	Tris-HCl pH 7,4
Puffer 1 (10x, 1 l)	116,07 g 87,66 g	Maleinsäure Natriumchlorid pH 7,5 <i>ad 1 l A. dest.</i> autoklaviert
RNA Probenpuffer B (4x, 10 ml)	4,8 ml 2,4 ml 2,0 ml 0,8 ml 60 mg	Formamid Formaldehyd 20 x MOPS Puffer 50 % Sucrose Orange G
SSC (20x, 1 l)	88,23 g 175,32 g	Natriumcitrat-Dihydrat Natriumchlorid pH 7,0 <i>ad 1 l A. dest.</i> autoklaviert
Waschlösung 1 (1 l)	100 ml 10 ml	20x SSC 10 % SDS <i>ad 1 l A. dest:</i>
Waschlösung 2 (1 l)	10 ml 10 ml	20x SSC 10 % SDS <i>ad 1 l A. dest:</i>
Waschpuffer	1 ml 1 x	Tween 20 (0,1 %, v/v) PBS, pH 7,4

### 2.6.3 Puffer und Lösungen für Proteomanalysen

Tabelle 12 Puffer und Lösungen für Proteomanalysen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
ABC Puffer (10x, 250 mM, 10 ml)	0,1976 g	Ammoniumbicarbonat <i>ad 10 ml HPLC-Wasser</i>
Dithiothreitol (25 mM, 10 ml)	0,375 g 20 ml	Dithiothreitol Ammoniumbicarbonat (20 mM in HPLC-Wasser)
Iodacetamid (100 mM, 1 ml)	0,018 g 1 ml	Iodacetamid Ammoniumbicarbonat (20 mM in HPLC-Wasser)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
LC-Puffer A1	2 % Acetonitril 0,1 % Essigsäure in HPLC-Wasser
LC-Puffer A2	5 % Acetonitril 0,1 % Essigsäure in HPLC-Wasser
LC-Puffer B	0,1 % Essigsäure in 100 % Acetonitril
Tris-Puffer (50 mM, pH 7)	6,06 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ad 1 l HPLC-Wasser
UT-Puffer (1x, 4 ml)	1,92 g Urea 0,61 g Thiourea 2 ml HPLC-Wasser

## 2.7 Software

Tabelle 13 Software

Software	Hersteller
2100 Expert Software B.02.09.SI725	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Aureowiki	<a href="http://aureowiki.med.uni-greifswald.de/Main_Page">http://aureowiki.med.uni-greifswald.de/Main_Page</a>
Citavi 5	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
Comet 2017.02rev0	<a href="http://www.comet-initiative.org/">http://www.comet-initiative.org/</a> ; (Eng <i>et al.</i> 2013)
Countess™ Software 2.03	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
FACSDiva Software 8.0	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Feature Extraction Software 11.5.1.1	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Genedata Analyst 11.0	Genedata AG, Basel, Schweiz
Geneious 9.1.2	Biomatters, Auckland, Neuseeland
GIMP 2.8	<a href="https://www.gimp.org/">https://www.gimp.org/</a>
guavaSoft 3.1.1	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Image Studio™ Software 5.2	Li-COR®, Lincoln, NE, USA
MAYU 1.07	<a href="http://proteomics.ethz.ch/muellelu/web/LukasReiter/Mayu/">http://proteomics.ethz.ch/muellelu/web/LukasReiter/Mayu/</a> ; (Reiter <i>et al.</i> 2009)
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA
NCBI/PubMed	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
NanoDrop™ 8000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
PSORTb 3.0.2	<a href="http://www.psort.org/">http://www.psort.org/</a> ; Brinkman Gruppe, Simon Fraser University, Burnaby, Kanada
RegPrecise	<a href="http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/">http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/</a>
RStudio 3.4.3	RStudio Inc., Boston, MA, USA
<i>S. aureus</i> Expression Data Browser	<a href="http://genome.jouy.inra.fr/cgi-bin/aeb/index.py">http://genome.jouy.inra.fr/cgi-bin/aeb/index.py</a>
ScanIt RE for Varioskan Flash 2.4.5	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

---

MATERIAL

---

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Spectronaut™ 11.0.15038.14.27660	Biognosys AG, Schlieren, Schweiz
TheSEED	<a href="http://www.theseed.org">http://www.theseed.org</a> ; (Overbeek <i>et al.</i> 2005)
Trans-Proteomics Pipeline (TPP) 4.8.0	<a href="http://tools.proteomecenter.org/software.php">http://tools.proteomecenter.org/software.php</a> ; Seattle Proteome Center
Xcalibur™ Software	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
ZEN 2011	Carl Zeiss Mikroskopsysteme

---

## 3 METHODEN

### 3.1 Kultivierung von *S. aureus*

#### 3.1.1 Kultivierung von *S. aureus* für Proteomanalysen

Um bakterielle Stämme über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurde eine Kryokonservierung vorgenommen. Hierfür wurden die Stämme in *tryptic soy broth*-Medium (TSB; Tabelle 10) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,5-2,0 kultiviert. Die Kultur wurde anschließend mit Glycerin (Endkonz. = 20 % (v/v)) versetzt, intensiv vermischt und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei - 80 °C gelagert.

Für die Analyse intra- und extrazellulärer Proteine wurden die *S. aureus* Stämme HG001 und ST1258 (Tabelle 5) in RPMI- und TSB-Medium kultiviert. Hierzu wurde jeweils eine TSB-Vorkultur in serieller Verdünnung über Nacht angesetzt. Aus einer exponentiell wachsenden Kultur wurde die Hauptkultur in TSB auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 inokuliert. Für die Kultivierung in RPMI-Medium wurde aus der TSB-Vorkultur eine RPMI-Vorkultur (OD<sub>600nm</sub> 0,075) inokuliert, wobei die entsprechende Menge Bakterien 1 min bei Raumtemperatur (RT) und 8.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im RPMI-Medium aufgenommen wurde. Wenn die RPMI-Vorkultur eine OD<sub>600nm</sub> von 0,5 erreicht hatte, wurde die RPMI-Hauptkultur auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 inokuliert. Das Wachstum wurde spektralphotometrisch verfolgt und in der exponentiellen (exp) und der stationären (stat) Wachstumsphase wurden Proben von drei biologischen Replikaten entnommen.

Für die Proteomanalysen des Wildtyps HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 wurden zusätzlich Proben zur Erweiterung der Spektrenbibliothek des *S. aureus* HG001 generiert (Tabelle A3). Hierfür wurden zum einen die Proben des Wildtyps und der  $\Delta\rho$ -Mutante genutzt, die wie oben beschrieben für die Analyse des intra- und extrazellulären Proteoms genutzt wurden. Nach dem gleichen Versuchsaufbau wurden auch die *S. aureus* Stämme ST158 pMKX und ST1258 pMKX::*rho*

in RPMI- und TSB-Medium kultiviert und in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase Zellen von drei biologischen Replikaten gewonnen.

Die Spektrenbibliothek wurde zusätzlich durch Proben aus Experimenten erweitert, in denen der Wildtyp HG001 verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt wurde. Hierfür wurde der Wildtyp in CDM kultiviert und aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur eine Hauptkultur auf eine  $OD_{500nm}$  von 0,05 inokuliert und das Wachstum verfolgt. Bei einer  $OD_{500nm}$  von 0,4 wurde die Kultur auf zwei Kolben aufgeteilt und ein Kolben dem jeweiligen Stressor ausgesetzt, während der andere Kolben als Kontrolle diente. Das Wachstum wurde für 1 h verfolgt und anschließend die Zellen für Proteomanalysen gewonnen. Zu den untersuchten Stressbedingungen gehörten: Hitzestress bei 42 °C und 48 °C, Zugabe von Antibiotika (0,12 µM Mupirocin und 0,3 µg/ml Vancomycin), Eisenlimitation (hervorgerufen durch 300 µM 2,2'-Bipyridyl) sowie oxidativer Stress (hervorgerufen durch 2 mM Diamid, 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 10 mM Methylviologen).

Ebenfalls in die Erweiterung der Spektrenbibliothek sind weitere Proben von Zellkulturüberständen von *S. aureus* HG001 in RPMI-Medium in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  0,4) eingeflossen. Bei diesen erfolgte die Anreicherung der extrazellulären Proteine nicht durch Zentrifugation und Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung), sondern nach einer Filtration mittels StrataClean™ Resin *Beads* (siehe Abschnitt 3.2.2)

### **3.1.2 Kultivierung von *S. aureus* unter Zugabe von Bicyclomycin**

Die Experimente mit BCM wurden nach dem experimentellen Design von Ederth *et al.* (2006) durchgeführt. Die Kultivierung des Wildtyp-Stammes HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 erfolgte in RPMI. In der frühen exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  0,2) wurden Zellen und Überstand für die Analysen gewonnen. Im Falle des Wildtyps wurde die Kultur auf zwei Kolben aufgeteilt: einer diente als Kontrolle und der andere wurde mit BCM versetzt. Nach 70 min wurden erneut Zellen und Überstand vom Wildtyp und der unbehandelten Mutante entnommen. Von den Kulturen des Wildtyps und der Mutante wurden jeweils ein Kolben bis in die stationäre Wachstumsphase kultiviert und ebenfalls Proben entnommen. BCM wurde in Konzentrationen von 20, 40 und 80 µg/ml eingesetzt.

### 3.1.3 Kultivierung GFP-markierter *S. aureus*-Stämme

Um das Wachstumsverhalten von *S. aureus*-Stämmen mit verschiedenen GFP-Varianten charakterisieren zu können, wurden die Bakterien in *prokaryotic minimum essential medium* (pMEM, Tabelle 10) und TSB kultiviert.

Für die pMEM-Kultivierung wurde eine serielle Verdünnung der Bakterien in pMEM hergestellt, wobei der Vorkultur Hefeextrakt (Endkonz. = 0,01 %) und 10 µg/ml Ery (ausgenommen Kontrollstämme ohne GFP-Markierung) zugesetzt wurden. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur wurde die Hauptkultur auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 inokuliert und im Wasserbad bei 37 °C unter linearem Schütteln bei 300 rpm kultiviert.

Für die Kultivierung in TSB wurde ebenfalls eine serielle Verdünnung der *S. aureus* Stämme vorgenommen und zu den Plasmid-tragenden Stämme 10 µg/ml Ery zugegeben. Die Inkubation der Vorkultur erfolgte über Nacht im Luftschüttler und die der Hauptkultur im Wasserbad wie für die Kultivierung in pMEM beschrieben.

## 3.2 Proteomanalysen bakterieller Proben

### 3.2.1 Gewinnung zellulärer Proteine

Zur Analyse der zellulären Proteine wurden die Bakterien 10 min bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 1 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes bei - 80 °C eingefroren. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mechanisch mit der FastPrep® FP120. Hierfür wurden die Zellpellets jeweils in 500 µl Ammoniumbicarbonat-Puffer (25 mM) resuspendiert und mit 200-250 µl Glasperlen ( $\varnothing \leq 106 \mu\text{m}$ ) gemischt. Der Aufschluss erfolgte in vier Zyklen bei 4 °C für 30 s unter Verwendung der Geschwindigkeitsstufe 6,5. Zwischen den Aufschlusszyklen wurden die Proben jeweils 5 min auf Eis gekühlt. Um die Proteinextrakte von Glasperlen und Zelltrümmern zu trennen, wurden zwei Zentrifugationsschritte bei 4 °C und 16.000 x g durchgeführt, zuerst für 10 min und danach für 60 min. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinextrakte anschließend bei - 80 °C gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach den Angaben des Micro BCA™ Protein Assay Kits. Für jede 96-Well Platte wurde eine individuelle Eichreihe in dreifacher Ausführung angefertigt. Von allen Proben wurden Verdünnungen von 1:20 bis 1:160 vorgenommen, wobei jeweils zwei technische Replikate angefertigt wurden. Die Messung erfolgte mittels NanoDrop™ 8000. Hierbei handelt es sich um ein UV-Vis Spektralphotometer, welches die Absorption im Bereich von 220 nm bis 750 nm aufzeichnet. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 562 nm mit einem Probenvolumen von 2 µl zweifach vermessen.

### 3.2.2 Gewinnung extrazellulärer Proteine

#### Anreicherung extrazellulärer Proteine mittels Trichloressigsäure-Fällung

Für die Analyse der extrazellulären Proteine wurden die Bakterien 10 min bei 4 °C und 10.000 x g pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µg/ml *bovines serum albumin* (BSA; Endkonz., m/v) versetzt. Anschließend wurde TCA in einer Endkonz. von 10 % (v/v) zugegeben. Die Fällung der Proteine erfolgte bei 4 °C für 36 h. Die präzipitierten Proteine wurden 1 h bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden mehrere Waschschrte mit 70 % Ethanol in *A. dest.* durchgeführt, bis die Proteinpellets eine weiße Farbe annahmen. Danach wurden diese in UT-Puffer (Tabelle 12) gelöst, für 3 min mit Ultraschall behandelt und anschließend für 20 min bei RT gelöst. Die nicht gelösten Bestandteile

wurden im Anschluss mittels Zentrifugation für 10 min bei RT und 10.000 x *g* von der Proteinlösung getrennt.

Proteinkonzentrationen wurden mit einem kolorimetrischen Assay nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Für diese Analyse wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:10 in UT-Puffer verdünnt. Anschließend wurden 10 µl der Verdünnung mit 790 µl HPLC-Wasser gemischt und 200 µl Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Bradford-Reagenz) zugegeben. Als Leerprobe dienen 10 µl des 1x UT-Puffers. Die Absorption der Probe wurde in drei Replikaten bei 595 nm innerhalb von 15 min photometrisch vermessen. Die Proteinkonzentrationen wurden unter Verwendung der mittleren Extinktion basierend auf einer Kalibrierungskurve mit Rinderserumalbumin in einem linearen Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 12 µg/ml berechnet.

#### **Anreicherung extrazellulärer Proteine mittels StrataClean™ Resin Beads**

Im Fall der BCM-Experimente erfolgte die Gewinnung der Proben für die Transkriptom- und Proteomanalysen mit Hilfe einer Filtrationsapparatur. Hierbei wurden die Kulturen auf einen Filter (0,22 µm) gegeben und durch Anlegen eines Vakuums der Überstand hindurchgesogen. Die Kulturüberstände wurden direkt in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und auf Eis gekühlt.

Für die Anreicherung der Proteine aus den Zellkulturüberständen der mit BCM behandelten Staphylokokken wurden StrataClean™ Resin Beads (Agilent) genutzt, deren Hydroxylgruppen mit den Proteinen interagieren (Bonn *et al.* 2014). Für die Aktivierung der Beads, wurden 40 µl Beads je Probe zweimal mit 500 µl Tris-Puffer (50 mM, pH 7) gewaschen (2 min, 8.000 x *g*, RT) und anschließend 200 µl 12 M HCl hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde bei 100 °C für 5-6 h inkubiert. Die Beads wurden durch erneute Zentrifugation sedimentiert und zwei weitere Waschschrte folgten. Im Anschluss wurden die Beads zum Zellkulturüberstand (35 ml) zugegeben und über Nacht bei 4 °C in einem Überkopf-Rotator inkubiert, sodass die Bindung der Proteine an die Beads erfolgen konnte. Danach wurden der Zellkulturüberstand/Bead-Mix für 20 min bei 4 °C und 10.000 x *g* zentrifugiert und die Beads erneut wie oben beschrieben zweimal mit Tris-Puffer gewaschen.

Für die Reduzierung und Alkylierung der Proteine wurden die Beads mit den gebundenen Proteinen in 90 µl Tris-Puffer aufgenommen, mit 10 µl Dithiothreitol (25 mM) versetzt und 1 h bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden 30 µl Tris-Puffer und 14 µl Iodacetamid (100 mM) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C im Überkopf-Rotator. Nach einem erneuten Zentrifugations- und Waschschrte wurden die Proteine nun an den Beads tryptisch verdaut. Hierfür wurde Trypsin im Verhältnis 1:25 (Protease zu Protein; m/m) zugegeben und die

Proben über 16 h bei 37 °C im Überkopf-Rotator inkubiert. Daraufhin wurden die *Beads* für 5 min bei 10.000 x *g* und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, welcher die Peptide enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die Menge der Peptide bestimmen zu können, wurde der Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay nach Herstellerangaben genutzt und ein Varioskan™ Flash *multimode reader* für die Messung verwendet. Im Anschluss daran wurde der Verdau mit Essigsäure (Endkonz. = 1 %) abgestoppt und es erfolgte die Aufreinigung der Peptide wie in 3.2.3 beschrieben.

### 3.2.3 Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse

Für die massenspektrometrischen (MS) Analysen wurden je 4 µg Protein proteolytisch mit Trypsin verdaut. Trypsin ist eine Endopeptidase, die durch Hydrolyse die Peptidbindung nach Arginin oder Lysin spaltet. Es wurde den Proben im Verhältnis von 1:25 (Protease zu Protein, m/m) zugesetzt. Die Ansätze wurden für 16 h bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Um den tryptischen Verdau zu stoppen, wurde Essigsäure (Endkonz. = 1 %) zugegeben. Anschließend wurden die Peptidlösungen von Verunreinigungen und Salzen befreit, indem sie mit ZipTip®-Spitzen gereinigt wurden. Hierbei binden die hydrophoben Bestandteile der Lösung (wie z. B. die enthaltenen Peptide) an das C18-Material der ZipTip®-Spitze. Die hydrophilen Bestandteile werden hingegen ausgewaschen, wodurch die gereinigten Peptide zum Schluss aus der Spitze eluiert werden können. Zur Entsalzung der Proben wurde zunächst das C18-Material in den Spitzen dreimal mit 100 %igem Acetonitril (ACN) und anschließend nacheinander jeweils mit fünfmal 80 % ACN, 50 % ACN und 30 % ACN (Tabelle 14) aktiviert. Nach drei Waschschritten mit 1 %iger Essigsäure erfolgte die Bindung der Peptide an das Trägermaterial der ZipTip®-Spitze durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Verunreinigungen wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit 1 % Essigsäure aus der ZipTip®-Spitze entfernt. Die Elution erfolgte mit 50 % ACN und 80 % ACN in 1 % Essigsäure, wobei beide Eluate in einem Microvial vereinigt wurden.

Tabelle 14 Lösungen zur Äquilibrierung von C18 ZipTip® Spitzen

	<b>80 % ACN</b>	<b>50 % ACN</b>	<b>30 % ACN</b>	<b>1 % Essigsäure</b>
100 % ACN	1200 µl	750 µl	450 µl	-
HPLC-Wasser	-	450 µl	750 µl	1200 µl
5 % Essigsäure	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

Die Proben wurden anschließend eingefroren und lyophilisiert. Für die MS-Analysen wurden Peptide des *HRM Peptid Mix* des *HRM Calibration Kits* in einem Verhältnis von 1:100 (HRM Peptid Mix:Probe) zum LC-Puffer A1 bzw. A2 (Tabelle 12) zugegeben. Der *HRM Peptid Mix* besteht aus

synthetisch hergestellten Peptiden, die als interner Standard dienen. Die Nutzung des *HRM Calibration Kits* ermöglicht eine spezifische Normalisierung der Daten mittels Spectronaut™ Software. Bis zur Messung wurden die Proben bei - 20 °C gelagert.

### 3.2.4 Massenspektrometrische Analyse

Die Analyse der Proben mittels Massenspektrometrie wurde von Annette Murr und Dr. Manuela Gesell Salazar durchgeführt. Für die massenspektrometrische Datenerfassung wurde ein Q Exactive™ bzw. Q Exactive™ Plus Massenspektrometer verwendet, das mit einem UltiMate 3000-Nano-HPLC-System gekoppelt war. Für die Nanospray-Ionisation wurde eine TriVersa NanoMate Nanoquelle (Q Exactive™) bzw. eine Nanospray Flex™ Ionenquelle (Q Exactive™ Plus) eingesetzt.

#### Flüssigchromatographie

Unter Verwendung des UltiMate 3000-Nano-HPLC-Systems wurden die Peptide auf eine Acclaim PepMap 100-C18 Vorsäule (2 cm x 75 µm Säule, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße,) geladen und anschließend mit einer Accucore 150-C18 analytischen Säule (25 cm x 75 µm Säule, 2,6 µm Partikelgröße, 150 Å Porengröße) separiert. Dabei wurde ein binäres Puffersystem bestehend aus dem LC-Puffer A1 und LC-Puffer B (Tabelle 12) genutzt. Die Peptide wurden über einen linearen Gradienten mit LC-Puffer B über 120 min bzw. 180 min (Tabelle 15) eluiert.

Tabelle 15 LC-Gradient über 120 min und 180 min zur Peptidseparation für MS-Messungen mittels Q Exactive™ bzw. Q Exactive™ Plus Massenspektrometer

LC-Puffer B [%]	120 min Gradient	180 min Gradient
2	0	0
2	10	10
25	130	190
40	135	195
90	137	197
90	142	202
2	146	205
2	160	215

### Daten-abhängiges Analyseverfahren

Die massenspektrometrische Analyse der Proben, die zur Erweiterung der Spektrenbibliothek des *S. aureus* Stammes HG001 erfolgte mit einer daten-abhängigen Analyseverfahren (*data dependent acquisition*, DDA).

Bei der DDA-Methode werden die höchst abundanten Ionen aus dem MS1-Spektrum ausgewählt, die sogenannte „TopN“-Auswahl. In dieser Arbeit wurden die 10 höchst abundanten Ionen isoliert und anschließend fragmentiert. Die Parameter für die massenspektrometrischen Messungen wurden in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16 Parameter der massenspektrometrischen Analyse von Proben im DDA-Modus

Parameter	Einstellung
<b>MS1</b>	
MS-Scan Auflösung	70.000
Zielintensität ( <i>automatic gain control</i> , AGC)	$3 \times 10^6$
Maximale Injektionszeit der Ionen für MS-Scans	120 ms
Scan-Bereich	300 bis 1650 m/z
Spectra-Datentyp	profile
<b>MS2</b>	
Auflösung	17.500
MS/MS Zielintensität (AGC)	$2 \times 10^5$
Maximale Injektionszeit der Ionen für MS/MS-Scans	120 ms
Spectra-Datentyp	centroid
Auswahl für MS/MS	die 10 höchst abundanten Isotopen-Spektren mit einer Ladung $\geq 2$ aus dem MS1-Scan
Isolationsfenster	3 m/z
Fixierte erste Masse	100 m/z
Dissoziationsmodus	HCD ( <i>high energy collisional dissociation</i> )
Normalisierte Kollisionsenergie	27,5 %
Dynamischer Ausschluss	30 s
Ladungsausschluss	1; > 6

Mit Hilfe dieser Daten wurde die Spektrenbibliothek des *S. aureus* HG001, wie in Michalik *et al.* (2017) beschrieben, erweitert (siehe Abschnitt 3.2.5). Die entstandene Spektrenbibliothek wurde anschließend für die Messung der Proteinproben dieser Arbeit in einem daten-unabhängigen Analyseverfahren (*data independent acquisition*, DIA) genutzt. In die Spektrenbibliothek fließen nicht-redundante, qualitativ hochwertige Daten von Peptiden und entsprechenden Fragmentationen ein, die bei der Analyse von DIA-Daten als Vorlage für die Peptididentifikation dienen.

Detaillierte Angaben zu den Proben, die zur Erweiterung der Spektrenbibliothek genutzt wurden, sind in Tabelle A3 dargestellt. Es wurden Proben von Zellen des *S. aureus* Wildtyps HG001, der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258, der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 mit dem Leerplasmid pMKX und des Komplementationsstamms ST1258 pMKX::*rho* analysiert. Dies waren die einzigen Proben, die mit einem linearen Gradienten über 180 min in der MS separiert wurden, um möglichst viele Spektrendaten für die Spektrenbibliothek zu erhalten. Zusätzlich wurden Proben von Kulturüberständen des Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante untersucht. Für beide Datensätze wurden Proben aus RPMI- und TSB-Medium in exponentieller und stationärer Wachstumsphase genutzt. Die Spektrenbibliothek wurde zudem mit Proben aus Stressexperimenten des Wildtyps HG001 sowie aus Kulturüberständen mit TCA-Fällung oder StrataClean™ Resin *Beads* erweitert.

#### **Daten-unabhängiges Analyseverfahren**

Um mögliche Unterschiede im Proteom des Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 zu untersuchen, wurde ein daten-unabhängiges Analyseverfahren (*data independent acquisition*, DIA) verwendet.

In dieser Messmethode werden alle Vorläufer-Peptid-Ionen in definierten m/z-Fenstern, die den gesamten Massenbereich abdecken, für eine Fragmentierung selektiert. Die Vielzahl der so detektierten Fragmentationen wird dann mit Hilfe der Spektrenbibliothek identifiziert. Der Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Identifikationsrate, der erhöhten Abdeckung der Proteinsequenz und der verbesserten qualitativen Quantifizierung auf MS2-Ebene.

Die spezifischen Geräteeinstellungen der Massenspektrometer wurden leicht modifiziert einer DIA-Methode von Bruderer *et al.* (2015) angelehnt, die zugehörigen Parameter sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Es wurden insgesamt 19 überlappende m/z-Isolationsfenster verwendet.

Tabelle 17 Parameter der massenspektrometrischen Analyse von Proben mit der DIA-Methode

Parameter	Einstellung																																																												
<b>MS1</b>																																																													
MS-Scan Auflösung	35.000																																																												
Zielintensität ( <i>automatic gain control</i> , AGC)	5 x 10 <sup>6</sup>																																																												
Maximale Injektionszeit der Ionen für MS-Scans	120 ms																																																												
Scan-Bereich	400 bis 1220 m/z																																																												
Spectra-Datentyp	profile																																																												
<b>MS2</b>																																																													
Auflösung	35.000																																																												
MS/MS Zielintensität (AGC)	3 x 10 <sup>6</sup>																																																												
Maximale Injektionszeit der Ionen für MS/MS-Scans	auto																																																												
Spectra-Datentyp	profile																																																												
Auswahl für MS/MS	1																																																												
Isolationsfenster	19																																																												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Fensternummer</th> <th>m/z Bereich</th> <th>Fenstergröße [m/z]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>400-430</td><td>30</td></tr> <tr><td>2</td><td>428-459</td><td>31</td></tr> <tr><td>3</td><td>457-483</td><td>26</td></tr> <tr><td>4</td><td>481-506</td><td>25</td></tr> <tr><td>5</td><td>504-531</td><td>27</td></tr> <tr><td>6</td><td>529-554</td><td>25</td></tr> <tr><td>7</td><td>552-576</td><td>24</td></tr> <tr><td>8</td><td>574-600</td><td>26</td></tr> <tr><td>9</td><td>598-624</td><td>26</td></tr> <tr><td>10</td><td>622-650</td><td>28</td></tr> <tr><td>11</td><td>648-676</td><td>28</td></tr> <tr><td>12</td><td>674-704</td><td>30</td></tr> <tr><td>13</td><td>702-735</td><td>33</td></tr> <tr><td>14</td><td>733-771</td><td>38</td></tr> <tr><td>15</td><td>769-810</td><td>41</td></tr> <tr><td>16</td><td>808-856</td><td>48</td></tr> <tr><td>17</td><td>854-914</td><td>60</td></tr> <tr><td>18</td><td>912-1000</td><td>88</td></tr> <tr><td>19</td><td>998-1220</td><td>222</td></tr> </tbody> </table>	Fensternummer	m/z Bereich	Fenstergröße [m/z]	1	400-430	30	2	428-459	31	3	457-483	26	4	481-506	25	5	504-531	27	6	529-554	25	7	552-576	24	8	574-600	26	9	598-624	26	10	622-650	28	11	648-676	28	12	674-704	30	13	702-735	33	14	733-771	38	15	769-810	41	16	808-856	48	17	854-914	60	18	912-1000	88	19	998-1220	222
Fensternummer	m/z Bereich	Fenstergröße [m/z]																																																											
1	400-430	30																																																											
2	428-459	31																																																											
3	457-483	26																																																											
4	481-506	25																																																											
5	504-531	27																																																											
6	529-554	25																																																											
7	552-576	24																																																											
8	574-600	26																																																											
9	598-624	26																																																											
10	622-650	28																																																											
11	648-676	28																																																											
12	674-704	30																																																											
13	702-735	33																																																											
14	733-771	38																																																											
15	769-810	41																																																											
16	808-856	48																																																											
17	854-914	60																																																											
18	912-1000	88																																																											
19	998-1220	222																																																											
Fixierte erste Masse	–																																																												
Dissoziationsmodus	HCD ( <i>high energy collisional dissociation</i> )																																																												
Normalisierte Kollisionsenergie	27,5 %																																																												

Für die MS-Analyse wurden Proben vom Wildtyp und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 in exponentieller und stationärer Wachstumsphase im RPMI- und TSB-Medium analysiert. Dabei wurden sowohl die Zellen selbst als auch der Kulturüberstand untersucht. Zusätzlich wurden die Proteine der Kulturüberstände des Wildtyps vor und nach Zugabe von BCM in RPMI-Medium und der unbehandelten  $\Delta\rho$ -Mutante analysiert. Alle Proben wurden am Q Exactive™ Massenspektrometer vermessen, ausgenommen das zweite biologische Replikat des BCM-Experiments. Für diese Analyse wurde ein Q Exactive™ Plus Massenspektrometer genutzt.

### 3.2.5 Analyse der Proteomdaten

Die Erweiterung der Spektrenbibliothek des *S. aureus* HG001 wurde von Dr. Stephan Michalik durchgeführt.

#### Erweiterung der Spektrenbibliothek

Die Erweiterung der Spektrenbibliothek des *S. aureus* HG001 erfolgte wie in Michalik *et al.* (2017) beschrieben. Die MS/MS-Spektren wurden mit der Comet-Suchmaschine (Eng *et al.* 2013) und einer *S. aureus* HG001 spezifischen Proteindatenbank von Fuchs *et al.* (2017) annotiert. Es wurde ein *Target-Decoy*-Ansatz mit Trypsin/P als Enzym (mit maximal zwei *missed cleavage sites*) verwendet sowie  $\pm 30$  ppm Massentoleranz auf MS1-Ebene und 0,01 Da Fragmentmassentoleranz als auch Proben-bezogene statische (Carbamidomethylation; +57.021464) und variable Modifikationen (Methionin-Oxidation; +15.9949) als weitere Parameter genutzt. Die Spektrenbibliothek von Michalik *et al.* (2017) wurde durch die neu generierten Datensätzen (Tabelle A3) erweitert.

Die Prozessierung der Daten wurde mit der Trans-Proteomics-Pipeline (TPP; Deutsch *et al.* 2010) durchgeführt. Dabei wurden die *Peptide-Spectrum-Matches* (PSM) der Comet-Suche der mittels PeptideProphet und iProphet (Shteynberg *et al.* 2011; Keller *et al.* 2002) bewertet (min. Peptidlänge 7 Aminosäuren). Unter Nutzung der MAYU-Software (Reiter *et al.* 2009) wurde die globale Protein-FDR (*false discovery rate*) auf 1 % gesetzt. Die gefilterten *Peptide-Spectrum-Matches* wurden mit R in einem *Biognosys generic format* (BGS) zusammengeführt. Die Spektrenbibliothek wurde abschließend im Spectronaut™ mit folgenden Einstellungen generiert: m/z Massenbereich von 300-2000, 6-10 Fragmente pro Ion, Fragmente mit weniger als 3 Aminosäuren wurden ausgeschlossen. Es wurde keine segmentierte Regression durchgeführt und die Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme von 0,5 angenommen. Die erstellte Bibliothek umfasst 2148 Proteine mit 38570 tryptischen Peptiden.

### DIA Analysen

Die Proben der intra- und extrazellulären Proteine vom *S. aureus* Wildtyp HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 in RPMI- und TSB-Medium in exponentieller und stationärer Wachstumsphase sowie die Kulturüberstände beider Stämme aus dem BCM-Experiment wurden im DIA-Modus mit dem Q Exactive™ bzw. Q Exactive™ Plus Massenspektrometer vermessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Spectronaut™ Software (11.0.15038.14.27660 (Asimov) Biognosys AG) und den in Tabelle 18 abgebildeten Parametern.

Tabelle 18 Einstellungen für DIA-Suchen in der Spectronaut™ Software 11.0.15038.14.27660

Parameter-Gruppe	Parameter	Einstellung
Calibration	Calibration Mode	Automatic
	IRT Calibration Strategy	Non-linear iRT calibration
Identification	Pvalue Estimator	Kernel density estimator
	Precursor Qvalue Cutoff	0.001
Workflow	Profiling Strategy	iRT profiling
	Profiling Row Selection	Minimum Qvalue Row Selection
	Profiling Row Selection – Qvalue Threshold	0.001
	Profiling Target Selection	Profile only non-identified Precursor
	Profiling Target Selection – Identification Criterion	Qvalue
	Profiling Target Selection – Threshold	0.0001
	Carry-over exact Peak Boundaries	TRUE
Quantification	Unify Peptide Peaks	FALSE
	Inference Correction	TRUE
	Quantity MS-Level	MS2
	Quantity Type	Area
	Data Filtering	Qvalue percentile
	Percentile	Biological replicate coverage depending (e. g. 3vs3 = 0.5; 3vs3vs3vs3 = 0.125)
XIC Extraktion	Cross Run Normalization	FALSE
	XIC RT Extraction Window	Dynamic
	Correction Factor	1

Die folgende Analyse der Daten erfolgte in RStudio (Version 3.4.3) nach Team *et al.* (2014). Die Intensitäten der Ionen wurden Median-Median normalisiert, wobei mindestens zwei Assays pro Ion detektiert werden mussten, um in die Analyse eingeschlossen zu werden. Die Verhältnisse für jeden Assay wurden berechnet indem die paarweisen Verhältnisse der experimentellen

Bedingungen zur Kontrollbedingung (z. B.  $\Delta\rho$ -Mutante gegen den Wildtyp) in allen Kombinationen (basierend auf den biologischen Replikaten in jedem Experiment) erzeugt wurden. Die so erhaltenen Verhältnisse pro Protein wurden unter Verwendung des Wilcoxon-Rangsummentests gegen eine absolute Änderung von  $\geq 2$  getestet. Die p-Werte wurden anschließend einer multiplen Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg 1995) unterzogen, wobei ein p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant verändert definiert wurde. Die für die Analyse genutzten R-Programm-Pakete sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19 R-Pakete zur Daten-Analyse

<b>Pakete</b>	<b>Autor</b>	<b>Titel</b>	<b>Version</b>
data.table	Matt Dowle [aut, cre], Arun Srinivasan [aut], Jan Gorecki [ctb], Tom Short [ctb], Steve Lianoglou [ctb], Eduard Antonyan [ctb]	Extension of 'data.frame'	10.10.4-1
dplyr	Hadley Wickham[aut, cre], Romain Francois [aut], Lionel Henry [aut], Kirill Müller [aut], RStudio [cph, fnd]	A Grammar of Data Manipulation	0.7.4
factoextra	Alboukadel Kassambara [aut, cre], Fabian Mundt [aut]	Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses	1.0.5
factoMineR	Francois Husson, Julie Josse, Sebastien Le, RStudio [cph]	Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining	1.38
ggplot2	Hadley Wickham[aut, cre], Winston Chang [aut], RStudio [cph]	Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics	2.2.1.9000
ggrepel	Kamil Slowikowski [aut, cre], Jean-Oliver Irisson [ctb], Saulius Lukauskas [ctb], Alicia Schep [ctb], Zhian N Kamvar [ctb], Sean Hughes [ctb], Pierre Gramme [ctb]	Replusive Text and Label Geoms for 'ggplot2'	0.7.0
reshape	Hadley Wickham[aut, cre]	Flexibly Reshape Data	0.8.7
stringr	Hadley Wickham[aut, cre, cph], RStudio [cph]	Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations	1.2.0

### 3.3 Northern Blot- und Transkriptomanalysen von *S. aureus*

#### 3.3.1 Zellernte und RNA-Präparation

##### **Zellernte von *S. aureus* nach Zugabe von Bicyclomycin**

Die Bakterien, die nach der unter 3.2.2 beschriebenen Filtration auf dem Filter verblieben, wurden für Analyse spezifischer Transkripte bzw. des gesamten Transkriptoms genutzt. Hierzu wurden die Filter in Reaktionsgefäße mit 5 ml eiskaltem *Killing Buffer* überführt, in flüssigem Stickstoff gekühlt und stark geschüttelt. Das Kühlen und Schütteln wurde mehrfach wiederholt, um möglichst alle Bakterien vom Filter zu spülen. Anschließend wurde der Filter aus dem Reaktionsgefäß entnommen und die Zellsuspension für 5 min bei 4 °C und 10.000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in flüssigem Stickstoff gefroren und bei - 80 °C gelagert.

##### **Zellernte von GFP-markierten *S. aureus*-Stämmen**

Für die Charakterisierung von GFP-markierten *S. aureus* Stämmen wurden die Bakterien in pMEM bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 kultiviert. Ein Teil der Kultur (35 ml) wurde mit 15 ml *Killing Buffer* versetzt und anschließend für 5 min bei 4 °C und 10.000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff gefroren.

##### **Mechanischer Zellaufschluss**

Für den Aufschluss der bakteriellen Zellen wurden die bei - 80 °C gelagerten Zellpellets in 200 µl *Killing buffer* resuspendiert und in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes und gefülltes Teflongefäß überführt. Anschließend wurde das Teflongefäß gut verschlossen, erneut in flüssigem Stickstoff gekühlt und in den Mikro-Dismembrator S von Sartorius eingespannt. Es erfolgte ein mechanischer Zellaufschluss für 2 min bei einer Schüttelfrequenz von 2.600 rpm/min. Das entstandene Pulver wurde in 3 ml *Lysis solution* (auf 50 °C vorgewärmt, Tabelle 11) aufgenommen. Das Zelllysate wurde anschließend in drei Aliquots à 1 ml in Reaktionsgefäße überführt und erneut in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei - 80 °C sofern sich die Extraktion der Gesamt-RNA nicht unmittelbar anschloss.

##### **RNA-Extraktion mit der Sauren-Phenol-Methode**

Die Extraktion der RNA mit saurem Phenol beruht auf der Methode von Chomczynski & Sacchi (1987). Hierbei wurden die mechanisch aufgeschlossenen, lysierten Zellen mit dem gleichen Volumen an saurem Phenol versetzt und mit Hilfe eines Thermomixers für 10 min bei 1.400 rpm und 23 °C geschüttelt. Durch den niedrigen pH-Wert werden die negativ geladenen Phosphatreste

der DNA protoniert. Aufgrund der daraus resultierenden Hydrophobizität reichert sich die DNA zusammen mit Proteinen und Zellbestandteilen in der organischen Phase an. Die einzelsträngige RNA befindet sich dagegen in der wässrigen Phase, da die Protonierung der Stickstoffatome der Nukleotide zu einer positiven Nettoladung führt. Durch die anschließende Zentrifugation bei 12.000 x *g* für 5 min erfolgte eine Trennung dieser beiden Phasen. Die obere wässrige Phase mit der enthaltenen RNA wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Um eine mögliche Verunreinigung mit DNA zu vermeiden, wurde erneut saures Phenol in gleichem Volumen zugegeben und für 5 min bei 1.400 rpm geschüttelt. Die anschließende Zentrifugation (12.000 x *g*, 5 min) führte erneut zur Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde wieder in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis: 24:1, Tabelle 11) vermischt (5 min, 1.400 rpm) und anschließend zentrifugiert (12.000 x *g*, 5 min). Für die Fällung der RNA wurde die wässrige Phase abgenommen und Natriumacetat (3 M, pH 5,2) im Verhältnis der Volumina 1:10 (Natriumacetat:Probe) zugegeben. Nach der Zugabe von 1 ml Isopropanol wurde der Ansatz mehrfach invertiert und es erfolgte die Präzipitation der RNA bei - 20 °C über Nacht.

Die Natriumacetat-RNA-Präzipitate wurden am nächsten Tag 15 min bei 4 °C und 12.000 x *g* pelletiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend zentrifugiert (15 min, 4 °C, 12.000 x *g*). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet für 1 min im Vakuum zentrifugiert, um Reste an Ethanol und Phenol aus der Probe zu entfernen. Die RNA-Pellets wurden in Nuklease-freiem Wasser gelöst, wobei die Menge sich nach der Größe der Pellets richtete. Das Lösen erfolgte für 3 h auf Eis und anschließend 30 min bei RT.

#### **Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration**

Zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen wurde der NanoDrop™ 8000-Spektralphotometer genutzt. Für die Messung wurden jeweils 1,3 µl der Probe aufgetragen. In Abhängigkeit der jeweiligen Nukleinsäure wird aufgrund des gemessenen A260 nm-Wertes die Konzentration in ng/µl angegeben. Außerdem kann eine Aussage über die Reinheit der Probe getroffen werden. Hierfür werden durch die Software zum einen der A260/A280 nm- und zum anderen der A260/A230 nm-Quotient ausgegeben. Das Verhältnis A260/A280 nm gibt Auskunft über Verunreinigungen der Probe mit Proteinen, Phenol und anderen Substanzen, welche ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen. Bei reiner RNA und DNA liegt dieses Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0. Mit dem A260/A230 nm-Verhältnis lässt sich eine Aussage über

Verunreinigungen mit Phenolationen, Thiocyanaten und anderen Substanzen treffen. Dieser Wert liegt zwischen 1,8 und 2,2, wenn es sich um eine reine RNA-bzw. DNA-Probe handelt.

### 3.3.2 Northern-Blot-Analysen

#### Herstellung Biotin-markierter RNA-Sonden

Für die Herstellung Biotin-markierter RNA-Sonden wurde zunächst eine doppelsträngige DNA-Matrize mittels PCR hergestellt. Hierfür wurden die lyophilisierten Primer (Tabelle 3) in 1x TE-Puffer aufgenommen und anschließend für 30 min bei 50 °C gelöst. Danach wurden die Primer 15 min bei RT inkubiert und bei - 20 °C aufbewahrt. Für die folgende *Touchdown*-PCR (Tabelle 21) wurde ein 100 µl-Ansatz (Tabelle 20) verwendet, wobei chromosomale DNA von *S. aureus* HG001 als Matrize diente.

Tabelle 20 PCR-Ansatz für die cDNA-Matrizen-Herstellung

Substanz	Menge
GoTaq® G2 Green Master Mix, 2x	50 µl
<i>Forward</i> -Primer (100 pmol)	2 µl
<i>Reverse</i> -Primer (100 pmol)	2 µl
chromosomale DNA <i>S.aureus</i> HG001	500 µg
RNase-freies Wasser	ad 100 µl

Tabelle 21 Touchdown-PCR für die cDNA-Matrizen-Herstellung

Temperatur	Zeit	Reaktion	Anzahl der Zyklen
95 °C	5 min	Denaturierung der DNA-Stränge	
95 °C	30 s	Denaturierung der DNA-Stränge	
51 °C	30 s	Primerhybridisierung	10 Zyklen
72 °C	1 min	Elongation	
95 °C	30 s	Denaturierung der DNA-Stränge	
48 °C	30 s	Primerhybridisierung	10 Zyklen
72 °C	1 min	Elongation	
95 °C	30 s	Denaturierung der DNA-Stränge	
45°C	30 s	Primerhybridisierung	10 Zyklen
72 °C	1 min	Elongation	
72 °C	5 min	Elongation	
4 °C	∞		

Die entstandenen PCR-Produkte wurden während der Elongation mit einer T7-Promotor Sequenz versehen, welche am 5'-Ende des *Reverse*-Primers enthalten ist. Die nachfolgende Kontrolle der PCR erfolgte mittels einer Agarosegelelektrophorese. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit

der erwarteten Fragmentlänge aus dem Gel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des NucleoSpin® Gel and PCR clean up Kit aufgereinigt. Im Anschluss an die Aufreinigung wurde die Qualität und Menge der PCR-Produkte erneut mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese überprüft. Für die Herstellung der Biotin-markierten RNA-Sonden wurden die gereinigten PCR-Fragmente in einer *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA Polymerase mit dem MEGAscript T7 Transcription Kit umgeschrieben (Tabelle 22). Die Ansätze wurden für 1,5 h bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert.

Tabelle 22 PCR-Ansatz für die Biotin-markierte RNA-Sonden-Herstellung

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
cDNA-Matrize	5 µl (1,5 µg)
ATP (75 mM)	1,5 µl
GTP (75 mM)	1,5 µl
CTP (75 mM)	1,5 µl
UTP (75 mM)	1 µl
Biotin-16-UTP (10mM)	4 µl
10x Transkriptions-Puffer	2 µl
T7-RNA-Polymerase	2 µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	1,5 µl

Anschließend wurde den Ansätzen jeweils 2 µl TURBO™ DNase Puffer und 1 µl TURBO™ DNase hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Biotin-markierten RNA-Sonden bei - 20 °C für 2 h in 100 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 800 µl 100 % Ethanol gefällt. Die Natriumacetat-RNA-Präzipitate wurden bei 4 °C für 10 min und 17.000 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (4 °C, 12.000 x g, 10 min). Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgenommen und das Pellet durch Vakuumzentrifugation von Ethanol befreit. Die RNA wurde in 100 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und 1 µl RNase-Inhibitor hinzugegeben. Abschließend wurden die RNA-Konzentration der Biotin-markierten RNA-Sonde mittels NanoDrop™ 8000 bestimmt und die Sonde bei - 80 °C gelagert.

Die Synthese- und Markierungseffizienz wurde mit dem LI-COR Odyssey® CLx Imaging System überprüft. Dabei wurde jeweils 1 µl verschiedener Verdünnungsstufen ( $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$ ) der generierten Biotin-markierten RNA-Sonden auf eine Nylonmembran aufgetragen. Nach der Vernetzung der Nukleinsäure mit der Membran durch UV-Licht erfolgte ein Inkubationsschritt für 30 min bei RT mit 20 ml LI-COR® Odyssey® Blocking Puffer (PBS) mit 1 % SDS. Anschließend wurde der Puffer verworfen und durch 15 ml LI-COR® Odyssey® Blocking Puffer (PBS) mit 0,5 % SDS und 0,6 µl CW 800 Streptavidin (1:30.000) ersetzt. Nach einer erneuten Inkubation für 30 min bei RT wurde der Puffer verworfen und es erfolgten drei Waschschrte mit 50 ml PBS/0,1 % Tween®20

für 20 min bei RT. Die Detektion erfolgte wie im Abschnitt „Fluoreszenzdetektion membrangebundener RNA-Moleküle“ beschrieben.

### **Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA-Proben**

Die denaturierende Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von RNA-Molekülen entsprechend ihrer Größe. Dabei wurden für ein 1,2 %iges Agarosegel 2,4 g Agarose eingewogen und mit 145 ml *A. dest.* sowie 20 ml 10x MOPS-Puffer (Tabelle 11) versetzt. Danach wurde die Agarose in der Mikrowelle zur vollständigen Quellung gebracht und für 30 min bei 65 °C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 35 ml Formaldehyd, die Lösung wurde gründlich durchmischt und erneut für 30 min bei 65 °C inkubiert. Jeweils 35 ml der Lösung wurden in eine Gelkammer gegossen. Nach 1 h bei RT wurden die erstarrten Agarosegele in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1x MOPS-Puffer überschichtet. Mittels NanoDrop™ 8000 wurde die Konzentration der RNA-Proben bestimmt und die gewünschte RNA-Menge in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und mit der entsprechenden Menge RNA-Probenpuffer B (Tabelle 11) versetzt. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei 70 °C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 110 min. Der Vakuum-Blot schloss sich unmittelbar an die Auftrennung der RNA an.

### **Northern Blotting**

Beim Northern-Blotting-Verfahren wird die zuvor durch denaturierende Agarosegelelektrophorese aufgetrennte RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Dazu wurde das VacuGene XL Vacuum blotting system verwendet. Die Membran wurde zunächst 1 min in *A. dest.* äquilibriert und die poröse Trägerplatte mit *A. dest.* gut durchfeuchtet. Die Nylonmembran wurde auf die Trägerplatte aufgelegt und eine entsprechende Plastikmaske, die Aussparungen für die Nylonmembran aufwies, darübergelegt. Das Agarosegel wurde mittig auf die Membran gelegt, sodass ein luftdichter Abschluss der Plastikmaske entstand. Im Anschluss daran erfolgte der Vakuum-Blot bei 80 mbar über 2 h. Währenddessen wurde das Agarosegel zuerst für 5 min mit Denaturierungslösung (Tabelle 11) überschichtet. Die Reste der Lösung wurden nach der Inkubation vorsichtig entfernt und das Agarosegel für 5 min mit Neutralisierungslösung (Tabelle 11) überschichtet. Die Lösungsreste wurden erneut entfernt und das Agarosegel im letzten Schritt mit 20x SSC überschichtet. Während des Transfers der RNA auf die Nylonmembran wurden die Gele mehrfach mit 20x SSC beschichtet, um deren Austrocknen zu verhindern. Nach Abschluss des Blotting-Prozesses erfolgte eine UV-Fixierung der RNA auf der Nylonmembran mit der automatischen „crosslink-Funktion“ des Stratalinker® UV Crosslinkers

1800. Anschließend erfolgte die Hybridisierung membrangebundener RNA mit Biotin-markierten RNA-Sonden.

#### **Hybridisierung membrangebundener RNA mit Biotin-markierten RNA-Sonden**

Für die Hybridisierung membrangebundener RNA mit Biotin-markierten RNA-Sonden wurden die Nylonmembran in eine Hybridisierungsschale überführt und mit 20 ml vortemperierter Hybridisierungslösung (68 °C, Tabelle 11) überschichtet und für 1 h bei 68 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Währenddessen wurde 1 µg der Biotin-markierten RNA-Sonde mit 15 ml Hybridisierungslösung versetzt. Anschließend wurde die Sondenlösung bei 65 °C für 15 min denaturiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Prähybridisierung wurde die Lösung verworfen und durch die hergestellte Sondenlösung ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C im Hybridisierungssofen.

Um unspezifische Bindungen zu eliminieren, wurde die Membran zweimal mit 50 ml Waschlösung I (Tabelle 11) für 5 min bei RT auf einem Taumelschüttler gewaschen. Anschließend erfolgten drei weitere Waschschrte bei 68 °C für jeweils 15 min mit vortemperierter Waschlösung II (Tabelle 11) im Hybridisierungssofen. Anschließend wurde die Waschlösung II durch 20 ml Odyssey® Blocking Puffer (PBS) mit 1 % SDS ersetzt und für 30 min bei RT und 50 rpm auf der Schüttelplattform geschwenkt. Die Lösung wurde anschließend verworfen, durch 15 ml Odyssey® Blocking Puffer (PBS) mit 0,5 % SDS und 0,6 µl IRDye® 800CW Streptavidin (1:25000) ersetzt und erneut für 30 min bei RT und 30 rpm geschwenkt. Anschließend erfolgten drei Waschschrte bei RT für jeweils 20 min mit 50 ml PBS/0,1 % Tween®20. Dann wurde die Membran für 20 min bei 68 °C inkubiert, um diese vollständig zu trocknen. Die Fluoreszenzdetektion der Membran-gebundenen RNA-Moleküle erfolgte im Anschluss.

#### **Fluoreszenzdetektion membrangebundener RNA-Moleküle**

Der Nachweis membrangebundener RNA-Moleküle beruht auf der hochaffinen Bindung der Biotin-16-UTP-markierten RNA-Sonden und des Streptavidin-gekoppelten IRDye® 800CW Infrarotfarbstoffs. Die Detektion erfolgte dabei mit dem Odyssey® CLx Infrared Imaging System, wobei die Membran gescannt und deren Fluoreszenzsignale detektiert werden. Die Größe der RNA-Moleküle konnte durch einen Vergleich mit RNA-Molekülen bekannter Größe (RNA-Marker) bestimmt werden. Die Detektion des Markers erfolgt bei einer Wellenlänge von 700 nm und die der spezifischen Transkripte bei 800 nm. Die relative Menge des jeweiligen nachgewiesenen Transkripts wird anhand der Intensität des Fluoreszenzsignals quantifiziert.

Danach erfolgte eine Methylenblaufärbung der Membran mit Methylenblaulösung (Tabelle 11). Es dient der optischen Beladungskontrolle, indem durch Färbung der RNA die 23S und die 16S rRNA auf der Membran sichtbar gemacht werden. Aufgrund der Essigsäure in der Methylenblaulösung wird der pH-Wert abgesenkt und der Thiazinfarbstoff kann mit den Phosphorgruppen der RNA interagieren. Überschüssiger Farbstoff wurde mit reichlich *A. dest.* und mehrfachem Wasserwechsel entfernt.

### 3.3.3 Microarray-Analysen

Für die Microarray-Analysen wurde ein Expressionsarray genutzt, auf dem 14.434 Sonden enthalten sind, die 2.816 Gene von *S. aureus* und 896 neue RNA-Segmente abdecken. Die wie unter Punkt 3.3.1 beschrieben präparierte RNA wurde anschließend einem DNase-Verdau unterzogen. Dabei wurden 35 µg RNA (in einem Volumen von 87,5 µl RNase-freiem Wasser) mit 10 µl RDD-Puffer und 2,5 µl DNase (2,7 *kunitz-units*/µl) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Aufreinigung dieser RNA wurde mit dem *RNA clean up and concentration* Kit von Norgen Biotek nach Herstellerangaben durchgeführt. 5 µg der gereinigten RNA wurden für die cDNA-Synthese genutzt. Die cDNA-Synthese und strangspezifische Fluoreszenzmarkierung der cDNA erfolgte nach den Angaben des *FairPlay III Microarray Labeling Kits* und der Nutzung von Actinomycin D, um eine ungewollte Synthese des Zweitstranges während der cDNA-Synthese zu verhindern (Perocchi *et al.* 2007). Die Proben wurden dabei mit dem Farbstoff Cy5 markiert, wohingegen die Referenzprobe, eine Mischung aus gleichen Mengen der einzelnen Proben, mit Cy3 markiert wurde. Anschließend wurden je 75 ng Cy5-markierter und Cy3-markierter cDNA auf dem Microarray hybridisiert. Die Hybridisierungs-, Wasch- und Detektionsschritte folgten dem Agilent-Protokoll (*Two-Color Microarray-based Gene Expression Analysis*, Version 5.5). Die Extraktion und Prozessierung der Daten erfolgte mit der Feature Extraction-Software von Agilent Technologies. Die relativen Expressionswerte wurden berechnet, indem für jedes Gen der Median der Ratios (Probe versus Referenzprobe) der einzelnen Sonden kalkuliert wurde. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Genedata Analyst™ Software.

### 3.4 *In vivo*-Infektionsversuch

Die *in vivo*-Infektionsexperimente wurden an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg am Institut für Molekulare Infektionsbiologie unter der Leitung von PD Dr. Knut Ohlsen und Dr. Tobias Hertlein durchgeführt.

Die Tierversuche wurden von der Gemeinde Franken, Deutschland (Zulassungsnummer 55.2-2532-2-155) genehmigt und unter strikter Einhaltung der Richtlinien zur Tierpflege und Erprobung des deutschen Tierschutzgesetzes und der Richtlinie 2010/63/EU der Europäischen Union durchgeführt.

#### 3.4.1 Infektionsinokulum

Für den *in vivo*-Infektionsversuch wurden Übernachtskulturen des *S. aureus*-Wildtyps HG001, der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 und des Komplementationsstamms ST1258 pMKX::*rho* in *brain heart infusion* Medium (BHI) angesetzt. Mit der Übernachtskultur wurde die Hauptkultur auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 in 50 ml BHI-Medium inokuliert und diese für 3,5 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Medium getrennt, das Pellet in BHI mit 20 % Glycerin (v/v) resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Um die Infektionsinokula herzustellen, wurden Aliquots aufgetaut, zweimal mit PBS gewaschen und basierend auf ihrer OD<sub>600nm</sub> auf  $8 \times 10^7$  Bakterien/100  $\mu$ l eingestellt. Ein Teil der Infektionsinokula wurde auf TSB-Agarplatten ausplattiert, um die Infektionsdosis mittels koloniebildender Einheiten (KBE) zu kontrollieren.

#### 3.4.2 Bakteriämie-Infektionsmodell

Für das Infektionsmodell wurden weibliche BALB/c Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) genutzt, die intravenös mit  $8 \times 10^7$  Bakterien in die Schwanzvene infiziert wurden. Die Mäuse wurden in einzeln belüfteten Käfigen in Gruppen von fünf Tieren gehalten und hatten während des Experiments *ad libitum* Zugang zu Nahrung und Wasser. Während der Infektion wurden die Mäuse zweimal am Tag bewertet, um die Schwere der Infektion zu bestimmen (Tabelle 23). Dabei ergibt die Summe der Punkte aus den verschiedenen Kategorien Auskunft über den Schweregrad der Infektion. Eine erreichte Gesamtpunktzahl von 20 entsprach dabei dem definierten humanen Endpunkt, wodurch die Mäuse aus dem Experiment ausgeschlossen und getötet wurden. Diese Mäuse wurden dann als „tot“ zum jeweiligen Zeitpunkt klassifiziert. Um signifikante Unterschiede im Überleben der Mäuse zwischen den Gruppen zu untersuchen, wurde der Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test genutzt. Es wurden jeweils acht Tiere pro Gruppe mit dem Wildtyp, der  $\Delta\rho$ -Mutante und dem Komplementationsstamm infiziert.

Tabelle 23 Klinische Kriterien zur Bewertung der Schwere der Infektion

<b>Beobachtung</b>		<b>Punktzahl</b>
Körpergewicht	- keine Änderung	0
	- Gewichtsverlust in % = Punktzahl	1-20
	- Gewichtsverlust $\geq 20$ %	20
Genereller Zustand	Fell	
	- glänzend	0
	- matt	2
	- zerzaust	4
	Augen	
	- klar und sauber	0
	- trüb und verklebt, geschlossen oder halbgeschlossen	3
	Körperhaltung	
	- normal	0
	- gekrümmte Haltung	10
	- massiv gekrümmte Haltung	20
	klinische Komplikationen	
	- Tension, Paralyse, Tremor	20
- Atemgeräusche	20	
- Tier fühlt Kälte	20	
Beweglichkeit	- instinktiv (normales Verhalten, soziale Interaktion)	0
	- instinktiv, aber reduziert	1
	- moderat bis reduzierte Aktivität	2
	- Bewegung nur nach Stimulation	5
	- Isolation, Lethargie, Koordinationsstörungen	10
	- Selbstamputation, Aggression	20
Respiration	- Atmung normal	0
	- Atmung leicht verändert	1
	- Atmung beschleunigt (+30 %; Tachypnoe)	10
	- Atmung stark beschleunigt (+50 %)	20
<b>Schweregrad</b>		
Level 0	- keine Belastung des Tieres, gesundes Tier	0-3
Level 1	- geringe Belastung des Tieres	4-9
	- leichte Erkrankung, unter Beobachtung	
Level 2	- moderate Belastung des Tieres	10-15
	- moderate Erkrankung, unter sorgfältiger Beobachtung	
Level 3	- moderate bis schwere Belastung des Tieres	16-20
	- moderate bis schwere Erkrankung	
	- unter sorgfältiger Beobachtung	
	- Abbruch des Experiments, wenn nötig	
Level 4	- schwere Belastung des Tiere	$\geq 20$
	- Tier moribund	
	- Durchsetzung des humanen Endpunktes	
	- Abbruch des Experiments	

## 3.5 *In vitro*-Infektionsversuche

### 3.5.1 Genetische Manipulation von *S. aureus*

#### Herstellung elektrokompenter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompenter bakterieller Zellen wurde über Nacht eine Kultur in TSB angesetzt. Aus dieser wurde am folgenden Tag eine Hauptkultur (200 ml) in TSB auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,05 inokuliert. Die Bakterien wurden im Wasserbad bei 37 °C und 150 rpm bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,65 kultiviert. Die Kultur wurde anschließend für 10 min bei 8.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 100 ml eiskalter Sucroselösung (Tabelle 10) gewaschen. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert, anschließend mit 50 ml eiskalter Sucroselösung gewaschen und 2 h auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt gefolgt von einem Waschschrift mit 25 ml eiskalter Sucroselösung, der anschließend wiederholt wurde mit 12,5 ml eiskalter Sucroselösung. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 800 µl 20 % Glycerol (v/v) resuspendiert, in 50 µl-Aliquots aufgeteilt und direkt für die anschließende Elektroporation genutzt.

Es wurden elektrokompente Zellen des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 hergestellt.

#### Einbringen von DNA in Bakterien durch Elektroporation

Elektroporation beruht auf einem kurzen elektrischen Puls, wodurch die Membran der Zellen permeabel wird und DNA in die Zelle gelangen kann. Die Methode wurde erstmals 1982 zum Transfer von Thymidin-Kinasen in murine Zellen genutzt (Neumann *et al.* 1982).

Für die Transformation von bakteriellen Zellen wurden 500 ng der gereinigten Plasmid-DNA zu 50 µl elektrokompenten Zellen gegeben und 30 min bei RT inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite: 2 mm) überführt und der Elektroporator auf 2 kV, 100 Ω und 25 µF eingestellt. Danach wurden die Zellen mit 1 ml vorgewärmtem SMMP-Medium (Tabelle 10) gemischt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 h bei 37 °C und 700 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf Antibiotika-haltigen TSB-Agarplatten ausplattiert und für 1-2 Tage bei 37 °C inkubiert.

### ***In vitro*-Stabilitätstest des Plasmids pJL-sarA-GFPpredopt**

Um die Stabilität des Plasmides pJL-sar-GFPpredopt *S. aureus* in HG001 zu überprüfen, wurden die Bakterien in TSB ohne Antibiotikum kultiviert und sieben Tage lang alle 24 h ein Aliquot der Kultur in einen neuen Kolben mit frischem TSB überimpft. Zu jedem Zeitpunkt des Überimpfens wurden 500 µl Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt, mit Formaldehyd (Endkonz. = 2 %) fixiert und bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in PBS aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit dem FACSAria™ IIIu, wobei das GFP der Staphylokokken mit einem blauen Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wurde und das emittierte Fluoreszenzsignal zwischen 515-545 nm detektiert wurde. Die Festlegung der *Gates* für die Analyse erfolgte dabei durch die Darstellung der Fluoreszenzintensität gegen den *side scatter* (SSC) der Zellen in einem Dot-Plot (Abbildung 11). Als Kontrolle dienten *S. aureus* HG001 Zellen ohne Plasmid, um nicht fluoreszierende Bakterien im Dot-Plot zu lokalisieren.

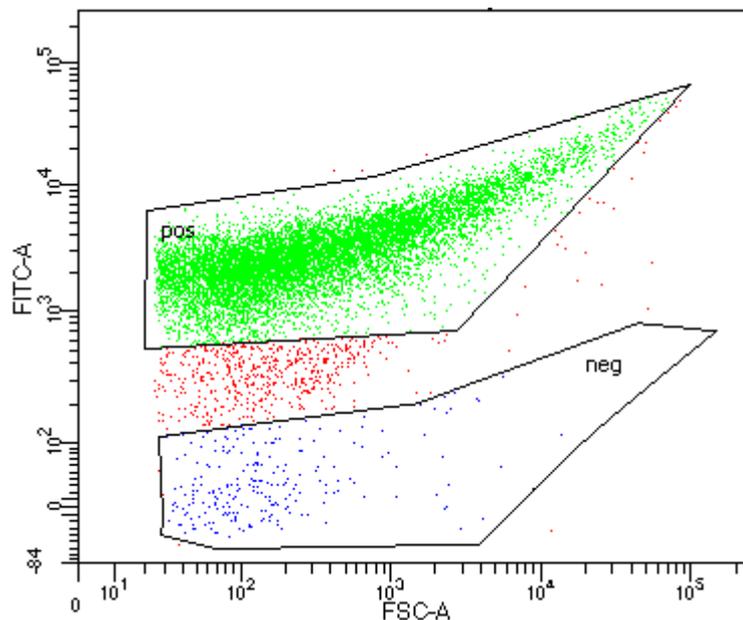


Abbildung 11 Dot-Plot GFP-positiver und GFP-negativer *S. aureus*-Zellen. Dargestellt ist die GFP-Fluoreszenzintensität gegen den SSC. GFP-positive *S. aureus*-Zellen wurden im *Gate pos* detektiert und GFP-negativa Zellen im *Gate neg* gezählt.

Neben der Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde *S. aureus* HG001 mit dem Plasmid pJL-sar-GFPpredopt ebenfalls alle 24 h über einen Zeitraum von sieben Tagen auf TSB-Agarplatten ohne Antibiotikum ausplattiert. Nachdem die Zellen 24 h bei 37 °C inkubiert wurden, erfolgte mit Hilfe eines Blaulichttisches und Filterfolien die Bestimmung der Zahl fluoreszierender und nicht-fluoreszierender *S. aureus*-Zellen.

### 3.5.2 Kultivierung von humanen Epithelzellen

Für die *in vitro*-Infektionsexperimente wurden A549 und 16HBE14o- Zellen in *eukaryotic minimum essential medium* (eMEM; Tabelle 10) in Ø 10 cm-Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank unter humiden Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage jeweils nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens, passagiert. Hierfür wurden sie zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, 1 ml Trypsin/ETDA bei A549 und 1 ml Trypsin/ETDA XXL bei 16HBE14o- (Tabelle 6) auf die Zellen gegeben und bei 37 °C inkubiert (5 min A549, 8 min 16HBE14o-). Nach der Inkubation erfolgte das Abstoppen der Trypsinreaktion durch die Zugabe von 3 ml eMEM und das Resuspendieren der Zellen. Von der Zellsuspension wurde jeweils 1 ml in eine neue Zellkulturschale mit 9 ml frischem eMEM überführt und bei 37 °C im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert.

Die Zellzahlbestimmung humaner Epithelzellen erfolgte mit dem automatisierten Zellzähler Countess™. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt, intensiv vermischt und in die Zählkammer des Countess™ Objektträgers transferiert. Die Berechnung der Konzentration der Zellen erfolgte automatisiert und wurde in Zellen/ml von der Software angegeben. Durch die Trypanblau-Färbung der Zellen, konnte den Countess Daten zusätzlich Informationen zur Viabilität entnommen werden.

### 3.5.3 Bestimmung der Zellkonzentration von prokaryotischen Zellen

Für die Bestimmung der bakteriellen Zellzahl wurde das Guava® easyCyte Durchflusszytometer genutzt. Dieses wurde mit dem Guava® Easy Check Kit vor der Messung kalibriert. Für die Zählung wurde die Bakteriensuspension seriell in PBS verdünnt, bis eine Konzentration von 200-800 Bakterien pro µl erreicht wurde.

Bakterien, die kein GFP exprimieren, wurden für die Analyse mit Vancomycin BODIPY FL (VMB, Endkonz. = 0,2 µg/ml) nach Hildebrandt *et al.* (2016) angefärbt. Hierbei handelt es sich um ein Glykopeptid-Antibiotikum, welches den Aufbau der Zellwand Gram-positiver Bakterien hemmt, indem es an das Murein bindet und so die Quervernetzung der Zellwand verhindert. Vancomycin ist an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, wodurch die Zellwand der Bakterien angefärbt wird. Das Antibiotikum wurde in subinhibitorischen Konzentrationen für die Färbung eingesetzt.

Die Detektion der mit VMB gefärbten und der GFP-exprimierenden *S. aureus*-Zellen erfolgte mit einem Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm und einem grünen Filter (530 nm für FITC/GFP).

Die Festlegung der *Gates* für Quantifizierung der Bakterien erfolgte dabei durch die Darstellung der GFP- oder VMB-Intensität gegen den SSC der Zellen in einem Dot-Plot (Abbildung 12). Für die

grüne Fluoreszenz wurde dabei ein Schwellenwert von  $10^2$  festgelegt, sodass alle nicht-fluoreszierenden Partikel unter diesem lagen und positive Bakterien darüber. Die Zellkonzentration wurde pro ml kalkuliert, wobei die Verdünnung der Zellsuspension einbezogen wurde.

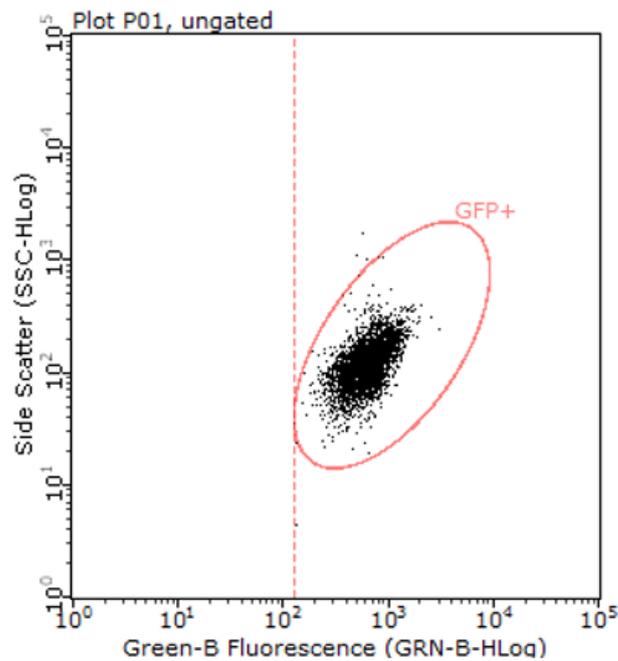


Abbildung 12 Dot-Plot GFP-markierter *S. aureus*-Zellen. Dargestellt ist die GFP-Fluoreszenzintensität gegen den SSC. GFP-positive *S. aureus*-Zellen wurden im Gate **GFP+** detektiert und gezählt.

### 3.5.4 Infektion humaner Epithelzellen mit *S. aureus*

#### Durchführung

Für die Infektion humaner Epithelzellen mit Staphylokokken wurden die Zellen drei Tage vor Beginn des Experiments in die Zellkulturplatten ausgesät, sodass am Tag der Infektion ein konfluenter Zellrasen vorlag. Für die verschiedenen Infektionsexperimente wurde der Versuchsaufbau individuell angepasst. Die jeweiligen Parameter sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24 Parameter der verschiedenen Infektionsexperimente

Experiment	Art der Zellkulturplatte	Zelllinien	Ausgesäte Zellkonzentration pro Well	Volumen an zugegebenem Mastermix
Analyse des Langzeit-Überlebens des Wildtyps und der $\Delta rho$ -Mutante	12-Well	16HBE14o-	$1,8 \times 10^5$	2 ml
Analyse von Internalisierungs- und Replikationsverhalten des Wildtyps und der $\Delta rho$ -Mutante	6-Well	A549	$3,6 \times 10^5$	3 ml
Analyse des Internalisierungsverhaltens des Wildtyps in verschiedenen Zellkulturschalen	12-Well		$1,8 \times 10^5$	2 ml
	6-Well	A549	$3,6 \times 10^5$	3 ml
	10 cm $\emptyset$		$\sim 2 \times 10^6$	10 ml

Einen Tag vor dem Infektionsexperiment wurden serielle Verdünnungen von den *S. aureus*-Stämmen in pMEM mit Hefeextrakt (Endkonz. = 0,01 %) und 10  $\mu\text{g/ml}$  Ery im Falle der GFP-exprimierenden Staphylokokken vorgenommen und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm im Luftschüttler inkubiert. Aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur wurde die Hauptkultur auf eine  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,05 inokuliert. Die Bakterien wurden im Wasserbad bei 37 °C unter linearem Schütteln bei 300 rpm bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,4 kultiviert. Die Staphylokokken wurden entsprechend der ermittelten Zellzahl (Abschnitt 3.5.3) in eMEM verdünnt, um eine *multiplicity of infection* (MOI) von 25, d. h. 25 Staphylokokken pro humane Epithelzelle, zu erreichen. Hierfür wurde zuvor die Konzentration der Epithelzellen pro Well mit der Countess™ bestimmt (Abschnitt 3.5.2). Um den pH-Wert des Mediums während der Infektion zu stabilisieren, wurde Natriumhydrogencarbonat (Endkonz. = 2,2 g/l) zu der verdünnten Bakteriensuspension zugegeben (Mastermix).

Um die humanen Epithelzellen mit den Staphylokokken zu infizieren, wurde der Überstand der Zellen abgesaugt und jeweils 3 ml des Mastermixes pro Well hinzugegeben. Die Zellen wurden zusammen mit den Bakterien für 1 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank unter humiden Bedingungen inkubiert. Während dieser Zeit internalisieren die Staphylokokken in die Epithelzellen. Eine Stunde nach Infektion wurde der Überstand erneut abgesaugt und durch eMEM mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Lysostaphin ersetzt, um nicht internalisierte Bakterien zu lysieren. Bis zur

Entnahme der ersten Proben nach der Infektion wurden die Zellen erneut im Brutschrank inkubiert.

### Probennahme bei der Infektion von 16HBE14o- Zellen

Die Probenentnahme bei der Infektion von 16HBE14o- Zellen erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wie in Abbildung 13 dargestellt.

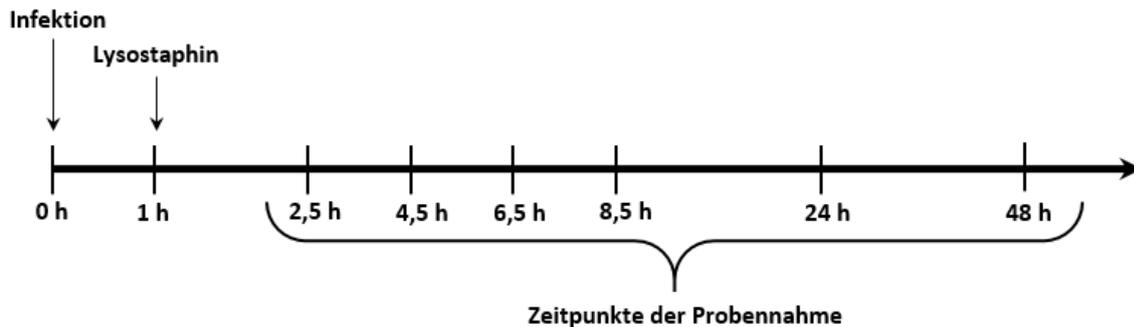


Abbildung 13 Zeitpunkte der Probennahme nach Infektion von 16HBE14o- Zellen mit *S. aureus* Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258.

Zur Zählung der Epithelzellen wurde zunächst der Überstand von zwei Wells abgesaugt, mit 1 ml PBS gewaschen und 500  $\mu$ l Trypsin/EDTA XXL zugegeben. Die Zellkulturplatte wurde für 8 min bei 37 °C im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert, die Zellen anschließend resuspendiert und nach Zugabe von 500  $\mu$ l eMEM je Well in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben mit der Countess™. Anschließend wurden zu zwei weiteren Wells 500  $\mu$ l SDS (Endkonz. = 0,05 %) zugegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die durch die Lyse der eukaryotischen Zellen mit SDS freiwerdenden Staphylokokken wurden anschließend mit dem Guava® easyCyte Durchflusszytometer quantifiziert (siehe Abschnitt 3.5.3).

Die Bakterien wurden hierfür mit VMB (Endkonz. = 0,2  $\mu$ g/ml) gefärbt und seriell in PBS verdünnt, sodass zwischen 400 und 800 Ereignisse pro  $\mu$ l detektiert werden konnten.

### Probennahme bei der Infektion von A549-Zellen

Bei der Infektion von A549-Zellen wurde vor der Zugabe des Lysostaphins aus jeweils drei Wells der Überstand der Zellen entnommen, in Reaktionsgefäße überführt und auf Eis inkubiert. Die Proben dienen der Analyse von nicht-internalisierten und nicht-adhären Bakterien. Nach der Infektion erfolgte die Entnahme der Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wie in Abbildung 14 dargestellt.

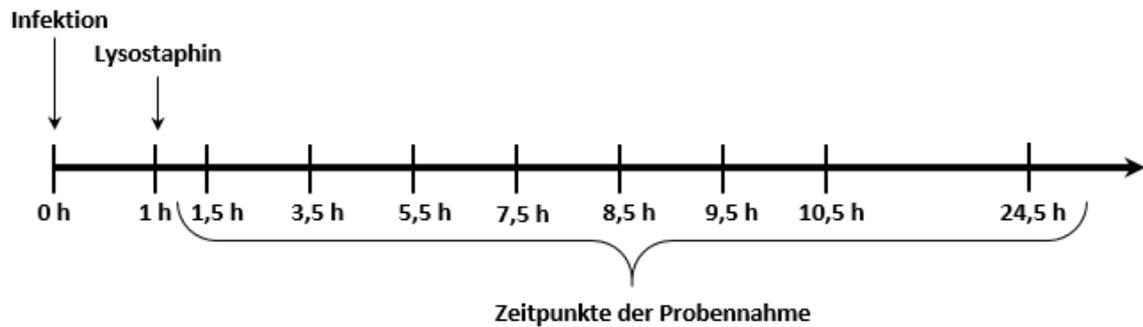


Abbildung 14 Zeitpunkte der Probennahme nach Infektion von A549-Zellen mit *S. aureus* Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258.

Für die Zählung der Epithelzellen wurde zunächst der Überstand von zwei Wells abgesaugt, mit 1 ml PBS gewaschen und 500  $\mu$ l Trypsin/EDTA zugegeben. Die Zellkulturplatte wurde für 5 min bei 37 °C im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert und die Zellen anschließend resuspendiert. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l eMEM je Well wurden die Zellen in je ein Reaktionsgefäß überführt, auf Eis inkubiert und anschließend im Guava® easyCyte Durchflusszytometer analysiert.

Die gewonnenen Proben wurden in zwei Aliquots geteilt: ein Aliquot diente der Analyse der humanen Zellen und das zweite der Zählung intrazellulärer Staphylokokken. Für die Analyse der A549-Zellen wurden die Proben seriell mit PBS verdünnt, sodass zwischen 400 und 800 Ereignisse pro  $\mu$ l detektiert werden konnten. Der quantitative Nachweis von A549-Zellen erfolgte dabei ebenfalls mittels Fluoreszenzintensität. Bei der Darstellung der GFP-Fluoreszenzintensität gegen den *forward scatter* (FSC) zeigten Zellen, die mit Staphylokokken infiziert waren, ein deutliches Fluoreszenzsignal, wodurch im Dot-Plot zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen unterschieden werden konnte (Abbildung 15). Das zweite Aliquot wurde mit gleichem Volumen SDS (Endkonz. = 0,05 %) versetzt und 5 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Dieser Schritt diente der Lyse der Wirtszellen und ermöglicht im Anschluss die Zählung intrazellulärer Staphylokokken wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben.

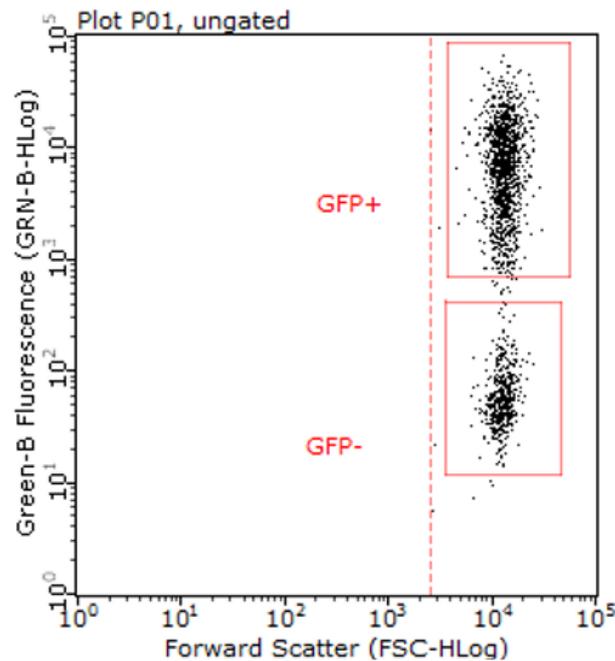


Abbildung 15 Dot-Plot humaner infizierter A549 Zellen. Dargestellt ist die GFP-Fluoreszenzintensität gegen den FSC. GFP-positive A549 Zellen wurden im *Gate* **GFP+** und GFP-negative im *Gate* **GFP-** detektiert und gezählt.

### 3.5.5 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen infizierter humaner Epithelzellen

Neben der Zählung von 16HBE14o- Epithelzellen und internalisierten *S. aureus*-Zellen wurden in diesem Infektionsexperiment auch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Für die Analyse wurden zu allen Zeitpunkten, an denen humane und bakterielle Zellen nach der Infektion gezählt wurden, ebenfalls Proben für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen entnommen. Hierfür wurden drei Tage vor der Infektion sterile Präzisionsdeckgläser ( $\varnothing$  18 mm) in die 12-Well-Zellkulturplatten gegeben, einmal mit PBS gewaschen und anschließend die 16HBE14o- Zellen in die Wells ausgesät. Die Zellen wurden wie in der Durchführung unter Abschnitt 3.5.4 beschrieben mit Staphylokokken infiziert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten (Abbildung 13) wurde der Überstand der Zellen entfernt und diese zweimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden in eine neue 12-Well-Zellkulturplatte überführt und dort in 2 %iger Formaldehyd-Lösung für 10 min bei RT fixiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt, durch PBS ersetzt und die Platten anschließend bei 4 °C gelagert.

Nach Abschluss des Experiments wurden die Zellen für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen gefärbt. Hierfür wurde die DNA mit Hoechst 33258 gefärbt, das F-Aktin mit Phalloidin konjugiert an Alexafluor 568 markiert und die Zellwand der Staphylokokken mit VMB sichtbar gemacht. Für die Färbung wurden die Farbstoffe nachfolgendem Schema zusammengesetzt:

100 µl Hoechst 33258 (Endkonz. = 1 µg/ml)

150 µl Phalloidin konjugiert an Alexafluor 568 (Endkonz. = 1 U/ml)

500 µl VMB (Endkonz. = 0,2 µg/ml)

250 µl PBS

1 ml Färbelösung

Zunächst wurde das PBS abgesaugt, und die Zellen wurden anschließend mit 500 µl 0,1 % Triton X-100 für 5 min bei RT permeabilisiert und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Färbelösung in jedes Well gegeben und für 10 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläser den Wells entnommen und mit Wasser gespült, um das restliche PBS zu entfernen. Die Deckgläser wurden auf einem Objektträger mit 15 µl DAKO *fluorescence mounting medium* für 1 h bei RT inkubiert. Die Analyse der gefärbten Präparate erfolgte mit dem ImagerM2 Fluoreszenzmikroskop.

---

## 4 ERGEBNISSE

In einer vorangegangenen Masterarbeit wurden der *S. aureus* Wildtyp HG001 und die isogene *rho*-Mutante ST1258 phänotypisch charakterisiert (Anna Nagel, Masterarbeit 2015). Dabei wurde zunächst das Wachstumsverhalten in verschiedenen Kulturmedien untersucht. In RPMI- und TSB-Medium konnten keine Unterschiede im Wachstum zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden. Dies traf auch auf den Leervektor-Stamm ST1258 pMKX und den Komplementationsstamm ST1258 pMKX::*rho* zu. Wachstumsexperimente in chemisch definiertem Medium (CDM) zeigten jedoch ein geringes Wachstumsdefizit der  $\Delta\rho$ -Mutante in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Generationszeit von ca. 55 min im Vergleich zum Wildtyp mit ca. 45 min (Abbildung A2).

Es wurden zudem Experimente in CDM durchgeführt, um das Wachstum der  $\Delta\rho$ -Mutante unter verschiedenen Stressbedingungen zu untersuchen und mögliche Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp aufzuzeigen. Zu den gewählten Stressbedingungen gehörten: Hitzestress bei 42 °C und 48 °C, Zugabe von Antibiotika (0,12  $\mu$ M Mupirocin und 0,3  $\mu$ g/ml Vancomycin), Eisenlimitation (hervorgerufen durch 300  $\mu$ M 2,2'-Bipyridyl), oxidativer Stress ausgelöst durch 2 mM Diamid, 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 10 mM Methylviologen sowie Sauerstofflimitation. Der Vergleich des Wachstums der beiden Stämme in Anwesenheit der verschiedenen Stressstimuli zeigte keine deutlichen Unterschiede.

Um Auswirkungen der Deletion des *rho*-Gens auf die Morphologie von *S. aureus* zu untersuchen, wurden die Bakterien fluoreszenzmikroskopisch untersucht und zu diesem Zweck ihre zytoplasmatische Membran mit Nile Red gefärbt. Die Aufnahmen zeigten, dass die Bakterienstämme morphologisch sehr ähnlich sind und sich weder in der Zellgröße noch in der Zellform voneinander unterscheiden.

An diesem Punkt setzt die vorliegende Dissertation an, die zum Ziel hatte, mögliche phänotypische Unterschiede zwischen dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante durch Proteomanalysen zu untersuchen.

## 4.1 Proteomanalysen von *S. aureus*

### 4.1.1 Erweiterung der Spektrenbibliothek des *S. aureus* HG001

Für die Analyse der Proben des zellulären und extrazellulären Proteoms des Wildtyps HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 in einem Daten-unabhängigen Analyseverfahren wurde die Spektrenbibliothek von *S. aureus* HG001 erweitert. In die bestehende Spektrenbibliothek von Michalik *et al.* (2017) sind 194 MS-Messungen von *S. aureus* HG001 aus *in vitro*-Kultivierungen unter verschiedenen Bedingungen eingeflossen. Durch die in dieser Arbeit generierten Proben konnten weitere 98 MS-Messungen zur Spektrenbibliothek beigetragen werden.

Der Vergleich der Spektrenbibliotheken zeigte, dass die Zahl der detektierten Ionen und Peptide um ca. 35 % zugenommen hatte (Abbildung 16). Die Zahl der identifizierten Proteine nahm nur um 40 Proteine zu. Die 2148 Proteine der Spektrenbibliothek decken dabei 75 % der vorhergesagten Proteine von *S. aureus* HG001 ab.

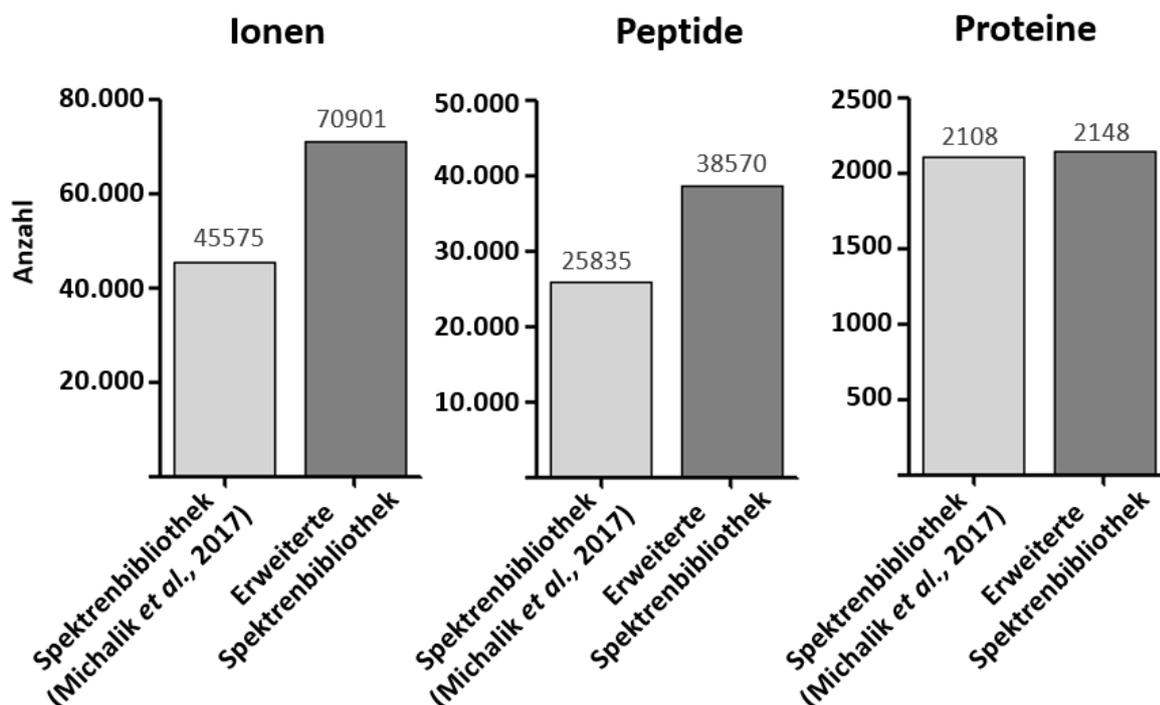


Abbildung 16 Anzahl von Ionen, Peptiden und Proteinen in der Spektrenbibliothek des *S. aureus* HG001 in der Arbeit von Michalik *et al.* (2017) und der in dieser Arbeit generierten Spektrenbibliothek.

Ein weiterer Unterschied zwischen den zwei Spektrenbibliotheken bestand in der zugrundeliegenden Annotation des *S. aureus* HG001. Während in der Arbeit von Michalik *et al.* (2017) die RefSeq-Annotation von *S. aureus* NCTC 8325 (Gillaspy *et al.* 2006) genutzt wurde, beruhte die in dieser Arbeit verwendete Proteindatenbank zur Erstellung der Spektrenbibliothek

auf der Arbeit von Fuchs *et al.* (2017). Die beiden Annotationen unterschieden sich in 63 Proteinen, von denen 29 Proteine Unterschiede in der Aminosäuresequenz aufweisen. Unter den restlichen 34 Proteinen befinden sich 13 Proteine, die in der Arbeit von Fuchs *et al.* (2017) hinzugekommen waren, wohingegen 21 Proteine in dieser Annotation nicht mehr vorhanden waren. Unter den Proteinen, die in der neuen Annotation hinzugekommen waren, befanden sich beispielsweise die vier  $\alpha$ -PSMs (*phenol-soluble modulins*) von *S. aureus*.

#### 4.1.2 Analyse des zellulären Proteoms

Das zelluläre Proteom des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 wurde durch massenspektrometrische Analyse untersucht. Die Stämme wurden jeweils nach Wachstum im Zellkulturmedium RPMI in der exponentiellen (RPMI exp) und stationären (RPMI stat) Wachstumsphase sowie in TSB-Medium in der exponentiellen (TSB exp) und stationären (TSB stat) Wachstumsphase untersucht. Dabei konnten 1347 Proteine in allen biologischen Replikaten der beiden Stämme in vier Bedingungen relativ quantifiziert werden.

In einer Hauptkomponentenanalyse der Proteomsignaturen der *S. aureus*-Zellen wurden die gemittelten Proteinintensitäten von drei biologischen Replikaten von Wildtyp und  $\Delta\rho$ -Mutante genutzt, um den Einfluss der Deletion des *rho*-Gens und der Kultivierungsbedingungen zu untersuchen (Abbildung 17).

Dabei wurde deutlich, dass die Unterschiede zwischen den Stämmen vergleichsweise gering waren und eher durch die Wachstumsphase und das Medium definiert wurden. Ein klarer Unterschied der Proteinsignaturen der Bakterien, die aus TSB in der stationären Wachstumsphase geerntet wurden, im Vergleich zu den anderen drei Bedingungen war in der ersten Dimension der Hauptkomponentenanalyse sichtbar. In der zweiten Dimension erfolgte die Trennung der anderen Bedingungen voneinander, wobei sich die Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase in RPMI- und TSB-Medium ähnlicher waren im Vergleich zu den Proben aus der stationären Wachstumsphase.

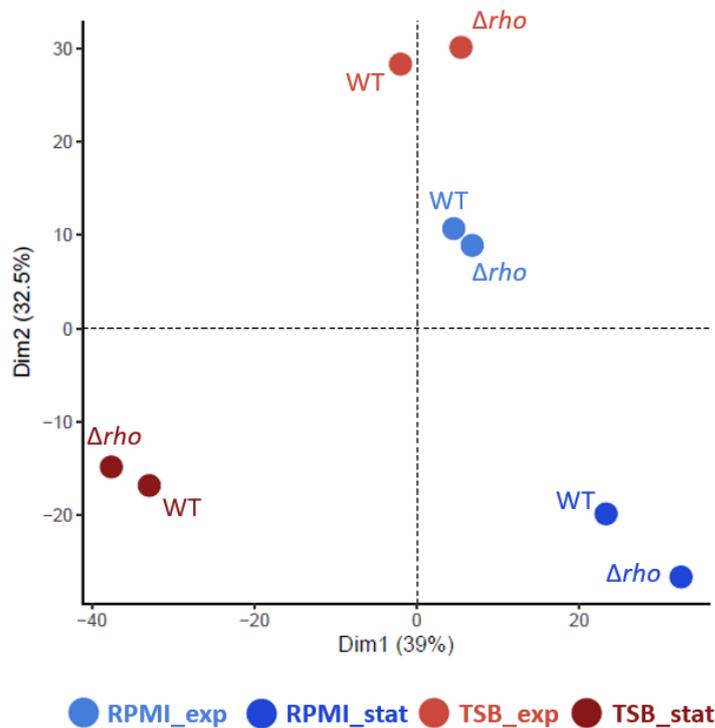


Abbildung 17 Hauptkomponentenanalyse der gemittelten Proteinintensitäten von drei biologischen Replikaten des Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 nach Wachstum unter vier verschiedenen Bedingungen. Dargestellt ist die erste gegen die zweite Dimension.

Die Untersuchung des Proteoms des Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 diente der Analyse möglicher Unterschiede in der Menge synthetisierter Proteine zwischen den Stämmen. Aus diesem Grund wurde für die 1347 relativ quantifizierte Proteine das Verhältnis der gemittelten Proteinintensitäten je Bedingung zwischen der  $\Delta rho$ -Mutante und dem Wildtyp gebildet (Tabelle A5). Wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben, wurde für diese quantifizierte Proteine eine statistische Analyse durchgeführt, um Proteine mit signifikant veränderter Menge zwischen den Stämmen zu identifizieren. Dabei wurden ein Verhältnis  $\geq 2$  oder  $\leq 0,5$  sowie ein p-Wert  $\leq 0,05$  nach multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg als signifikant verändert zwischen den zwei Stämmen definiert. Hierbei wiesen 76 Proteine veränderte Proteinmengen zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta rho$ -Mutante in mindestens einer der vier Bedingungen auf. In Tabelle 25 ist die Zahl der Proteine dargestellt, die in der  $\Delta rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp erhöhte oder verringerte Proteinmengen zeigten.

Tabelle 25 Zahl der zellulären 76 Proteine mit signifikant verringerter oder erhöhter Menge in der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 im Vergleich zum Wildtyp HG001. Die mittleren Proteinintensitäten der drei biologischen Replikate der  $\Delta rho$ -Mutante wurden durch die des Wildtyps geteilt.

	$\Delta rho$ /WT RPMI exp	$\Delta rho$ /WT RPMI stat	$\Delta rho$ /WT TSB exp	$\Delta rho$ /WT TSB stat
Zahl der Proteine	6↓ 20↑	2↓ 47↑	3↓ 19↑	2↓ 26↑

Dabei zeigte sich, dass in allen vier Bedingungen deutlich mehr Proteine in der  $\Delta rho$ -Mutante in erhöhter Menge identifiziert wurden als im Wildtyp. In der stationären Wachstumsphase, insbesondere im RPMI-Medium, unterschieden sich die Proteinmengen der beiden Stämme stärker voneinander im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase. Der Vergleich der signifikant veränderten Proteine zeigte, dass vergleichsweise wenige Überschneidungen zwischen den jeweiligen Medien und Wachstumsphasen vorlagen (Abbildung 18).

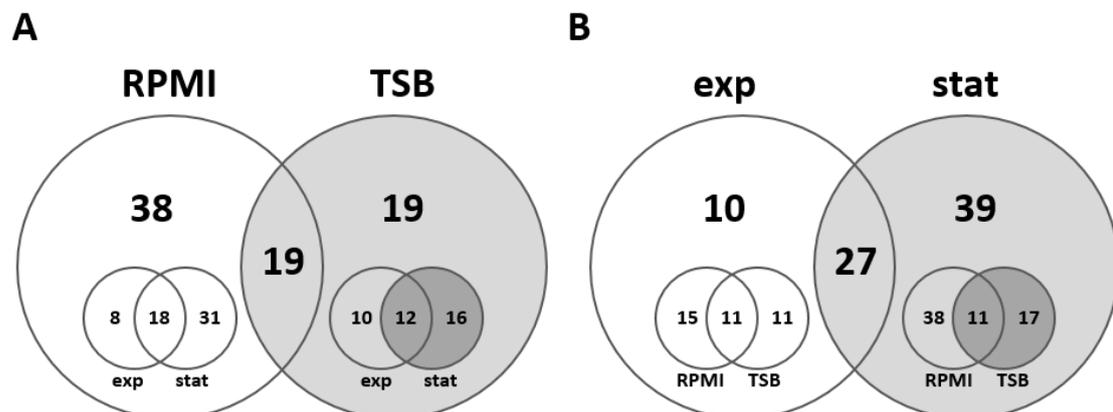


Abbildung 18 Vergleich der Proteine mit signifikant veränderter Menge zwischen dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 in den vier Bedingungen. In (A) ist der Vergleich des Einflusses der Medien und in (B) der Einfluss der Wachstumsphase dargestellt.

Von den 76 signifikant veränderten Proteinen (Tabelle 26) lagen acht Proteine unter allen Bedingungen in unterschiedlichen Mengen vor. Nur das Rho-Protein selbst lag in verringerter Menge vor, die sieben weiteren Proteine (CstB, Coa, SaeP, Emp, LukH, Sbi, und SAOUHSC\_00622) zeigten erhöhte Mengen in der  $\Delta rho$ -Mutante gegenüber dem Wildtyp.

Um signifikant veränderte Proteine funktionell klassifizieren zu können, wurden diese unter Nutzung der Datenbanken von RegPrecise und AureoWiki den bekannten Transkriptionsfaktor-Regulons von *S. aureus* zugeordnet. Zusätzlich wurde die TheSEED Datenbank genutzt, um die Stoffwechselwege zu identifizieren, an denen diese Proteine beteiligt sind (Tabelle A5). Dabei konnten 33 von 76 Proteinen den verschiedenen Regulons von *S. aureus* zugeordnet werden.

Fast die Hälfte dieser Proteine (14) konnte dem SaeR-Regulon zugeordnet werden. Dazu gehören beispielsweise der *staphylococcal complement inhibitor* SCIN, das *extracellular matrix and plasma binding protein* Emp sowie die *fibronectin-binding proteins* FnbA und FnbB. Einige Proteine, die dem SaeR-Regulon angehören, werden auch durch andere Regulatoren beeinflusst. Die Proteine *staphylocoagulase* Coa,  *$\alpha$ -hemolysin* Hla und *immunoglobulin G-binding protein* Sbi werden zusätzlich durch das AgrA/RNAlIIII-System reguliert. Hla sowie FnbA und FnbB stehen auch unter Kontrolle des *staphylococcal accessory regulator A* (SarA). Drei weitere Proteine, zwei unbekannter Funktion (SAOUHSC\_00156 und SAOUHSC\_00160) und ein Phosphotransferase-system-Transporter (SAOUHSC\_00158), die in der stationären Wachstumsphase in TSB-Medium in erhöhter Menge vorlagen, konnten der Regulation durch den globalen Repressor CcpA (*catabolite control protein A*) zugeordnet werden. Auch Hla wird durch diesen Regulator beeinflusst. Dem CodY-Regulon konnten insgesamt fünf der signifikant veränderten Proteine zugeordnet werden. Der globale Transkriptionsregulator CodY ist in die Adaptation an Nährstofflimitation involviert, wobei es durch niedrigen GTP- und BCAA-Level (*branched-chain amino acid*) zur Derepression von CodY-abhängigen Genen in *S. aureus* kommt. Dabei wurden vier Proteine identifiziert, die am Aminosäuremetabolismus beteiligt sind, wobei IlvA1 im RPMI-Medium in beiden Wachstumsphasen in erhöhter Proteinmenge in der  $\Delta\rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp vorlag. In der stationären Wachstumsphase in TSB-Medium konnten die Proteine MetE, MetF und TcyP in signifikant erhöhten Mengen in der  $\Delta\rho$ -Mutante detektiert werden. Der *competence transcription factor* ComK1 war in allen Bedingungen in der  $\Delta\rho$ -Mutante in erhöhter Menge vorhanden. Zum durch den alternativen Sigma-Faktor SigB kontrollierten Regulon gehören sieben der signifikant veränderten Proteine. Diese umfassen OpuBA und OpuBB, welche der Kategorie Stress-Antwort angehören und im RPMI-Medium erhöhte Mengen in der Mutante aufwiesen, sowie drei Proteine (SAOUHSC\_02096, SAOUHSC\_02574 und SAOUHSC\_03022) mit unbekannter Funktion. Ebenfalls durch SigB werden auch die Proteine MetE und MetF reguliert.

Tabelle 26 Zelluläre Proteine mit signifikant veränderter Menge zwischen dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 in RPMI- und TSB-Medium in exponentieller und stationärer Wachstumsphase. Dargestellt sind die Verhältnisse der Proteinintensitäten zwischen  $\Delta\rho$ -Mutante und Wildtyp sowie die p-Werte nach multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg, wobei ein grau hinterlegter Wert einen p-Wert  $\leq 0,05$  markiert.

ERGEBNISSE

Proteinname	$\Delta\rho$ /WT	$\Delta\rho$ /WT	$\Delta\rho$ /WT	$\Delta\rho$ /WT	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
	RPMI exp	RPMI stat	TSB exp	TSB stat	RPMI exp	RPMI stat	TSB exp	TSB stat
Adh1	0,72	2,62	0,49	1,21	1	2,16E-02	1	1
Ald1	3,86	4,41	2,36	1,71	1,13E-04	5,46E-06	5,17E-01	1
Coa	2,77	2,55	11,74	3,12	2,82E-04	4,83E-02	1,48E-07	1,97E-02
ComK1	23,72	6,21	23,03	11,80	2,34E-04	6,45E-01	9,85E-01	1,50E-02
CstB	13,32	7,76	4,35	3,84	1,56E-09	1,63E-07	6,03E-09	7,03E-03
DnaG	1,09	0,79	0,98	2,55	1	1	1	7,03E-03
Eap   Map	7,67	13,10	1,69	3,38	3,83E-25	4,16E-28	1	3,23E-14
Ecb	1,99	2,03	4,25	2,87	1	9,64E-02	8,32E-05	5,98E-04
Efb	0,55	21,82	6,21	7,14	1	5,41E-04	1,89E-03	3,44E-04
Emp	23,23	8,59	6,67	4,05	2,08E-11	8,38E-09	4,71E-07	6,19E-09
EsxA	0,09	0,22	0,47	0,91	5,22E-04	7,19E-01	1	1
FnbA	5,48	2,01	4,62	1,83	1,50E-06	1	1,37E-07	1
FnbB	1,24	1,32	3,90	1,88	1	1	1,13E-12	1
Geh	1,59	2,81	1,69	4,24	1	3,22E-03	1	9,96E-08
Hla	0,96	1,38	0,94	4,31	1	1	1	3,89E-11
IlvA1	4,23	4,33	1,76	1,29	9,46E-06	5,85E-03	1	1
LplA2	1,45	2,82	1,23	1,95	1	4,59E-02	1	1
LukG	21,84	2,51	9,14	2,79	1,64E-11	8,25E-02	4,17E-09	1,71E-03
LukH	17,29	5,84	9,95	4,26	6,60E-20	6,31E-11	1,65E-14	1,96E-09
MetE	1,06	0,66	1,19	2,02	1	1	1	3,31E-02
MetF	1,14	1,16	1,23	2,42	1	1	1	3,25E-02
Nos	1,74	6,29	1,37	1,52	1	1,79E-02	1	1
OpuBA	4,65	2,67	0,93	1,37	4,33E-04	2,49E-02	1	1
OpuBB	2,65	5,90	0,88	1,63	8,85E-01	1,49E-04	1	1
PgsA	0,50	6,08	1,12	1,10	1	9,12E-03	1	1
Prs	1,07	2,19	0,93	1,05	1	1,56E-02	1	1
RecF	1,36	3,91	0,96	1,15	1	7,58E-04	1	1
RecJ	1,10	9,86	1,71	0,89	1	3,26E-02	1	1
Rho	0,02	0,03	0,01	0,09	1,12E-22	1,26E-08	5,98E-18	3,45E-10
RibA	3,29	11,46	1,91	0,92	1,10E-05	1,95E-11	1	1
RibH	3,00	2,58	3,19	1,22	4,09E-06	2,33E-04	2,87E-06	1
RpmB	0,76	0,61	1,23	20,27	1	1	1	4,22E-03
RpsQ	1,17	0,65	0,91	238,76	1	1	1	1,61E-03
SaeP	4,51	4,90	5,27	6,84	6,82E-11	1,95E-11	3,55E-11	3,23E-14
SAOUHSC_00003	1,05	3,06	0,85	0,24	1	1,20E-02	1	1
SAOUHSC_00156	1,53	1,05	1,38	3,95	1	1	1	9,12E-07
SAOUHSC_00158	1,62	1,25	1,52	2,84	1	1	1	9,09E-03
SAOUHSC_00160	0,71	1,19	1,24	4,57	1	1	1	3,44E-04
SAOUHSC_00284	1,27	2,44	0,99	0,88	1	1,69E-03	1	1
SAOUHSC_00301	0,60	2,34	1,20	1,42	1	3,10E-02	1	1
SAOUHSC_00400	0,52	1,21	17,51	2,12	1	1	1,18E-07	1
SAOUHSC_00622	44,20	26,68	17,03	659,56	7,17E-18	9,51E-15	1,53E-12	2,44E-21
SAOUHSC_00972	0,29	0,28	0,55	1,02	1,18E-09	1	1	1
SAOUHSC_01332	0,56	9,43	1,19	0,85	1	3,62E-03	1	1
SAOUHSC_01576	1,06	3,12	1,43	0,98	1	3,10E-02	1	1
SAOUHSC_02071	4,28	2,44	1,85	0,86	8,90E-05	3,63E-02	1	1
SAOUHSC_02072	1,07	2,68	3,01	0,85	1	8,65E-03	1,00E-05	1
SAOUHSC_02096	0,81	0,51	1,06	7,68	1	1	1	1,81E-02
SAOUHSC_02129	2,64	147,09	19,04	1,04	1	3,00E-03	3,02E-04	1
SAOUHSC_02390	1,51	0,82	11,48	1,82	1	1	2,50E-02	1
SAOUHSC_02574	1,78	2,04	1,29	1,32	1	7,28E-04	1	1
SAOUHSC_02631	2,33	33,84	0,85	0,66	1	2,29E-02	1	1
SAOUHSC_02664	3,27	0,99	10,11	2,32	8,85E-01	1	3,60E-03	1
SAOUHSC_02670	2,88	1,80	2,61	5,03	1,53E-06	1	8,66E-02	7,66E-12
SAOUHSC_02757	0,97	2,73	0,75	1,00	1	4,59E-02	1	1
SAOUHSC_02769	0,83	2,80	1,81	0,77	1	2,14E-02	1	1
SAOUHSC_02866	0,54	0,79	0,25	0,32	1	1	2,10E-06	3,44E-04
SAOUHSC_02895	2,29	4,68	1,42	1,29	1,11E-01	1,15E-10	1	1
SAOUHSC_02912	0,15	1,19	1,65	0,97	3,75E-03	1	1	1
SAOUHSC_02979	0,88	2,91	1,36	1,46	1	1,42E-05	1	1
SAOUHSC_03022	2,86	3,29	1,75	1,04	6,82E-09	8,25E-11	1	1
Sbi	3,18	22,69	6,05	5,62	1,74E-19	2,68E-36	3,51E-29	3,99E-23
SceD	1,86	0,52	0,23	1,49	1	1	2,15E-02	1
SCIN	1,06	2,23	1,85	5,52	1	1	1	1,24E-06
SdrD	0,08	0,17	0,45	1,15	1,13E-19	7,71E-09	1	1
SecG	0,26	5,01	0,76	1,47	1	5,85E-03	1	1
SirTM	1,21	4,60	1,29	0,66	1	3,38E-02	1	1
Sle1	0,17	1,05	1,04	0,85	4,30E-06	1	1	1
TcyP	1,13	1,14	1,25	2,69	1	1	1	4,22E-03
ThiE	0,67	15,18	0,90	1,08	1	4,72E-02	1	1
TopB	1,58	2,30	1,18	1,31	1	1,47E-04	1	1
UreE	3,21	2,92	2,51	1,91	1,47E-06	1,11E-03	1,00E-01	1
UreG	1,51	4,32	3,40	1,61	1	3,98E-05	4,56E-04	1
UvrC	0,37	31,84	1,10	0,75	1	1,66E-02	1	1
VraF	0,79	6,47	0,98	0,88	1	3,25E-03	1	1
YjbH	1,58	8,77	1,20	0,26	1	3,10E-02	1	1



Unter den 43 Proteinen, die keinem Regulon zugeordnet werden konnten, befanden sich unter anderem Proteine, die am Harnstoffmetabolismus beteiligt sind, wie die *urease accessory proteins* UreE und UreG. Die Menge dieser Proteine war besonders im RPMI-Medium in der stationären und in TSB-Medium in der exponentiellen Wachstumsphase in der  $\Delta rho$ -Mutante signifikant erhöht. Ein ähnliches Muster zeigten die *riboflavin biosynthesis proteins* RibA und RibH, welche an der Synthese von Vitaminen und Kofaktoren beteiligt sind. Im Gegensatz dazu waren die Proteinmengen von SdrD und EsxA in der  $\Delta rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp geringer. Während es sich bei dem *serine-aspartate repeat-containing protein* D um ein Protein handelt, welches mit Virulenz in Staphylokokken assoziiert ist, ist EsxA in den Membrantransport der Bakterien involviert. Das Protein SAOUHSC\_00622, dessen Funktion bisher unbekannt ist, konnte in allen Bedingungen in stark erhöhten Proteinmengen (Verhältnis  $\geq 15$ ) in der  $\Delta rho$ -Mutante quantifiziert werden.

Da etwa 20 % (14/76) der signifikant veränderten Proteine dem SaeR-Regulon zugeordnet werden konnten, wurde in einer *Heatmap* das Verhältnis zwischen  $\Delta rho$ -Mutante und Wildtyp für alle Proteine des Regulons dargestellt (Abbildung 19). Von den 39 Proteinen des Regulons (Tabelle 2) konnten in der Analyse des zellulären Proteoms 17 Proteine in beiden Stämmen quantifiziert werden.

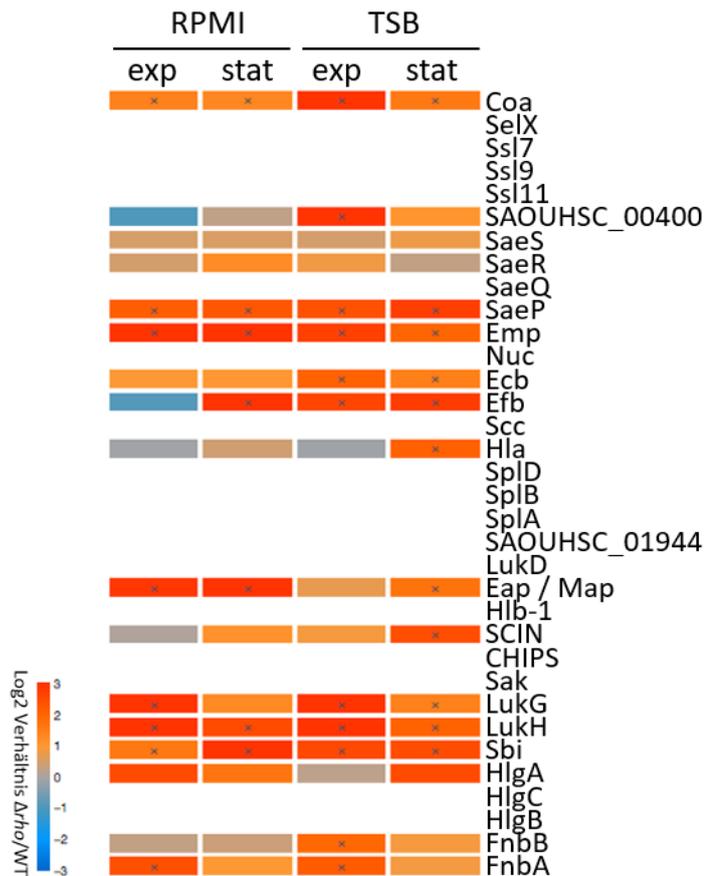


Abbildung 19 *Heatmap* quantifizierter Proteine des SaeR-Regulons aus der Proteomanalyse von *S. aureus*-Zellen des Wildtyps HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258. Dargestellt ist das Verhältnis (log<sub>2</sub> transformiert) zwischen der  $\Delta\rho$ -Mutante und dem Wildtyp, wobei signifikante Änderungen der Proteinmenge zwischen den Stämmen mit einem Kreuz markiert sind.

Unter den 17 Proteinen, die identifiziert und dem SaeR-Regulon zugeordnet werden konnten, waren auch drei Proteine, die vom *saePQRS*-Operon kodiert werden. Zu diesen zählte die Sensor kinase SaeS, das Lipoprotein SaeP und der Responseregulator SaeR.

Da es sich bei den SaeR-regulierten Proteinen größtenteils um Virulenzfaktoren handelt, die oberflächenassoziiert oder sekretiert vorliegen, wurden alle identifizierten Proteine nach ihrer hervorgesagten Lokalisation mittels PSORTb-Software gruppiert (Yu *et al.* 2011; Tabelle A5). Mit Hilfe der Software kann die subzelluläre Lokalisation der Proteine bestimmt werden und den Kategorien „Extrazellulär“, „Zellwand“, „Plasmamembran“ und „Zytoplasmatisch“ zugeordnet werden. Für einige Proteine konnte die Lokalisation nicht eindeutig bestimmt werden, wodurch diese der Gruppe „keine signifikante Vorhersage“ zugeordnet wurden.

Bei der Untersuchung der Gesamtzahl der Proteine konnten 924 Proteine als „zytoplasmatisch“ klassifiziert werden, dies entsprach ca. 69 % aller Proteine, die im Wildtyp und der  $\Delta\rho$ -Mutante quantifiziert werden konnten (Abbildung 20). Weitere 12 % der Proteine konnten der Kategorie „Plasmamembran“ zugeordnet werden, wohingegen nur jeweils 2 % der Proteine in die Gruppen

„Zellwand“ und „extrazellulär“ eingeordnet werden konnten. Die restlichen 15 % der Proteine konnten keiner spezifischen Klasse zugeordnet werden. Der Anteil an zytoplasmatischen Proteinen nahm in der Analyse signifikant veränderter Proteine um 22 % ab, während der Anteil extrazellulärer Proteine auf 13 % und Proteine der Kategorie „Zellwand“ auf 8 % anstiegen.

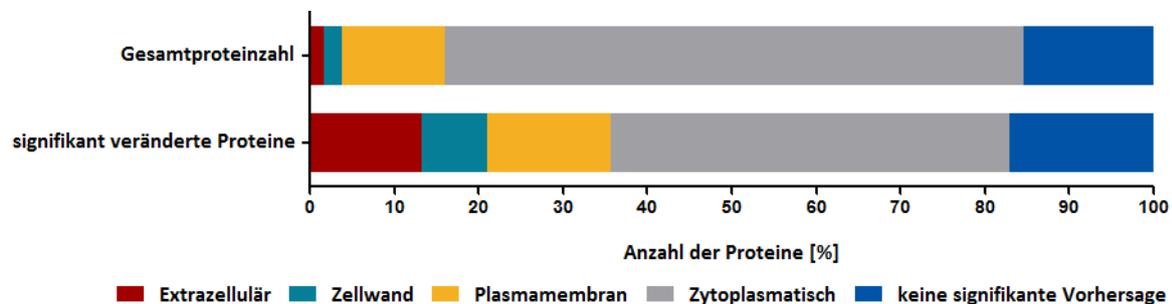


Abbildung 20 Subzelluläre Lokalisation der quantifizierten Proteine des Wildtyps HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258. Mittels PSORTb-Software wurden die 1347 Proteine den Kategorien Extrazellulär, Zellwand, Plasmamembran, Zytoplasmatisch oder keine signifikante Vorhersage zugeordnet. Dabei ist der prozentuale Anteil an der Gesamtproteinzahl bzw. den 76 zwischen  $\Delta\rho$ -Mutante und Wildtyp signifikant veränderten Proteinen dargestellt.

Die Proteomanalyse der *S. aureus*-Zellen zeigte für 76 Proteine signifikante Veränderungen der Menge zwischen dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258. Viele dieser Proteine gehören zum SaeR-Regulon, welches zahlreiche extrazelluläre und Zellwand-assoziierte Proteine umfasst. Aus diesem Grund wurde im Anschluss das extrazelluläre Proteom beider Stämme analysiert, um eventuelle Unterschiede in der Menge sekretierter Proteine zu untersuchen.

### 4.1.3 Analyse des extrazellulären Proteoms

In der Proteomanalyse des Zellkulturüberstandes des Wildtyps HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 sollten ebenfalls die Unterschiede in der Menge synthetisierter Proteine zwischen den Stämmen untersucht werden. In einer Hauptkomponentenanalyse der Proteomsignaturen der *S. aureus* Zellkulturüberstände wurden die gemittelten Intensitäten der 999 quantifizierten Proteine der drei biologischen Replikate von Wildtyp und  $\Delta\rho$ -Mutante genutzt, um die Stämme und Bedingungen miteinander zu vergleichen (Abbildung 21). Hierbei wurde deutlich, dass die Unterschiede zwischen den Stämmen größer sind als für das zelluläre Proteom zu beobachten war. In der ersten Dimension erfolgte die Trennung der RPMI-Proben von den TSB-Proben. In der zweiten Dimension der Hauptkomponentenanalyse wurde eine Trennung der Wachstumsphasen innerhalb einer Bedingung sichtbar. Dies war für die TSB-Proben deutlicher als für die RPMI-Proben.

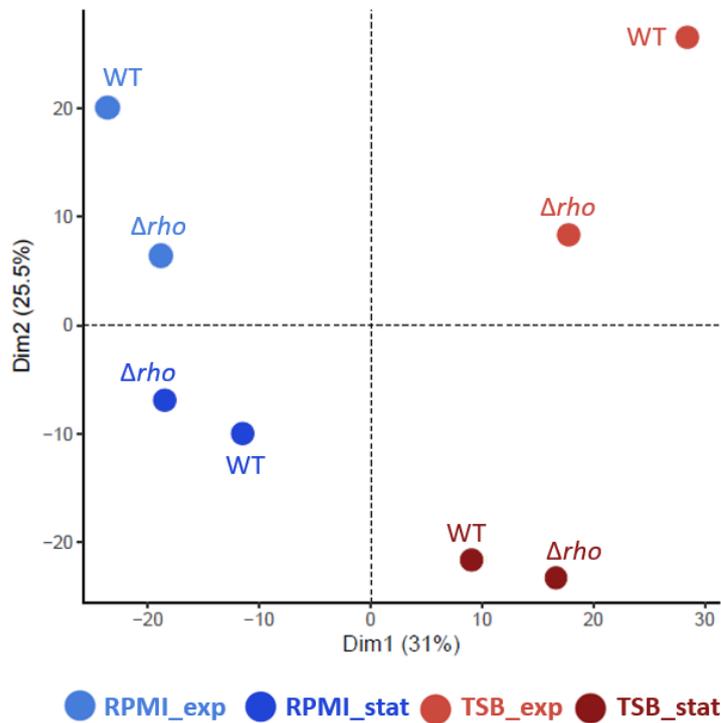


Abbildung 21 Hauptkomponentenanalyse der gemittelten Proteinintensitäten von drei biologischen Replikaten des Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 nach Wachstum unter vier verschiedenen Bedingungen. Dargestellt ist die erste gegen die zweite Dimension.

Wie in der Analyse der zellulären Proteomdaten wurden die Verhältnisse der 999 relativ quantifizierten Proteine zwischen der  $\Delta rho$ -Mutante und dem Wildtyp gebildet (Tabelle A5). Es wurde eine statistische Analyse, wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben, durchgeführt und analog zu den zellulären Proteomdaten ein Verhältnis  $\geq 2$  oder  $\leq 0,5$  sowie ein p-Wert  $\leq 0,05$  nach multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg als signifikant definiert. Es wiesen 167 Proteine veränderte Proteinmengen zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta rho$ -Mutante unter mindestens einer Bedingung auf. In Tabelle 27 ist die Zahl der Proteine dargestellt, die in der  $\Delta rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp in erhöhter oder verringerter Proteinmenge vorlagen.

Tabelle 27 Zahl der 167 extrazellulären Proteine mit signifikant verringerter oder erhöhter Menge in der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 im Vergleich zum Wildtyp HG001. Die mittleren Proteinintensitäten der drei biologischen Replikate der  $\Delta rho$ -Mutante wurden durch die des Wildtyps geteilt.

	$\Delta rho$ /WT RPMI exp	$\Delta rho$ /WT RPMI stat	$\Delta rho$ /WT TSB exp	$\Delta rho$ /WT TSB stat
Zahl der Proteine	15↓ 63↑	9↓ 65↑	7↓ 24↑	15↓ 42↑

Die Mehrzahl der signifikant veränderten Proteine zeigte in allen Bedingungen eine erhöhte Menge in der  $\Delta rho$ -Mutante. Dabei waren die meisten Änderungen im RPMI-Medium in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase zu verzeichnen. Der Vergleich dieser Proteine mit signifikant veränderter Proteinmenge zwischen den Stämmen in RPMI- und TSB-Medium in der jeweiligen Wachstumsphase zeigte, dass vergleichsweise wenige Überschneidungen zwischen den Bedingungen vorlagen (Abbildung 22).

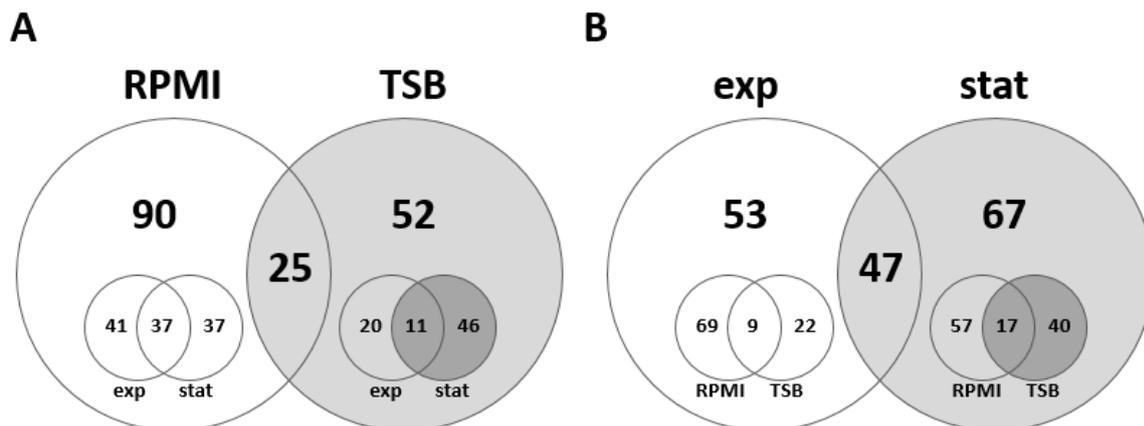


Abbildung 22 Vergleich der Proteine mit signifikant veränderter Menge zwischen dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 in den vier Bedingungen. In **(A)** ist der Vergleich des Einflusses der Medien und in **(B)** der Einfluss der Wachstumsphase dargestellt.

Nur eine relativ geringe Zahl an Proteinen wurde in den Kulturüberständen beider Medien in veränderten Mengen nachgewiesen (Abbildung 22A). Nur fünf Proteine wiesen in allen Bedingungen eine signifikant veränderte Proteinmenge auf. Vier Proteine (Coa, Sbi, SAOUHSC\_00622 und SAOUHSC\_0127) zeigten dabei erhöhte Mengen in der  $\Delta rho$ -Mutante, während das Protein SdrD in verringerter Menge vorlag.

Die signifikant veränderten Proteine wurden, wie in der Analyse des zellulären Proteoms, funktionell klassifiziert unter Nutzung von RegPrecise, AureoWiki und der TheSEED Datenbank (Tabelle A5). Dabei konnten 66 von 167 Proteinen den verschiedenen Regulons von *S. aureus* zugeordnet werden (Tabelle 28).

Tabelle 28 Extrazelluläre Proteine mit signifikant veränderter Menge zwischen dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 in RPMI- und TSB-Medium in exponentieller und stationärer Wachstumsphase. Dargestellt sind die Verhältnisse der Proteinintensitäten zwischen  $\Delta rho$ -Mutante und Wildtyp sowie die p-Werte nach multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg, wobei ein grau hinterlegter Wert einen p-Wert  $\leq 0,05$  markiert..

ERGEBNISSE

Proteinname	$\Delta\rho$ /WT RPMI exp	$\Delta\rho$ /WT RPMI stat	$\Delta\rho$ /WT TSB exp	$\Delta\rho$ /WT TSB stat	p-Wert RPMI exp	p-Wert RPMI stat	p-Wert TSB exp	p-Wert TSB stat
AdsA	2,81	2,01	1,42	1,39	6,25E-22	6,64E-07	1	1
AcpS	6,64	6,76	0,16	10,00	2,55E-02	1,53E-02	6,11E-01	3,17E-02
AldH	1,17	0,67	0,77	2,32	1	1	1	9,58E-04
Atl	0,28	0,47	0,46	0,55	9,52E-04	1	1	1
AtpB	0,88	0,77	0,36	0,06	1	1	1	1,30E-02
AtpE	0,35	0,75	3,45	1,30	1	1	4,47E-02	1
AtpG	1,01	0,75	0,90	2,11	1	1	1	1,54E-02
AzoR	1,00	2,56	2,16	1,58	1	8,04E-04	1,15E-01	1
BsaA	2,03	0,71	1,05	1,24	2,57E-02	1	1	1
Cdd	2,42	0,89	0,56	0,94	3,71E-02	1	1	1
CHIPS	5,20	4,39	1,36	4,19	1,73E-74	9,02E-78	1	7,96E-33
CidC	1,18	0,38	6,14	0,55	1	1	3,87E-03	1
ClpB	1,39	0,78	0,81	3,30	1	1	1	1,16E-15
Coa	2,43	2,36	6,12	2,18	2,42E-27	1,44E-23	1,40E-83	4,16E-18
CsbD	0,55	0,81	0,17	0,77	1	1	3,02E-03	1
CspB	0,49	2,44	0,80	0,63	1	2,55E-02	1	1
CzrA	3,42	2,96	1,23	0,41	3,21E-03	7,51E-02	1	1
DapL	7,05	1,20	1,08	2,17	2,82E-02	1	1	1
Ddl	2,33	0,53	0,96	1,43	2,29E-02	1	1	1
DltC	0,42	0,56	4,20	1,92	1	1	1,30E-03	7,76E-01
DltD	0,30	0,87	0,92	0,44	3,04E-02	1	1	1
Eap Map	2,26	7,62	0,94	1,33	7,66E-13	7,07E-73	1	1
Efb	0,85	1,86	3,06	0,91	1	1	1,39E-14	1
Emp	34,67	23,34	1,58	1,08	1,64E-75	6,95E-74	1	1
EsxA	0,16	0,89	0,61	0,31	3,66E-02	1	1	4,33E-03
FadA	1,03	1,15	0,60	0,31	1	1	1	1,62E-06
Fdh	1,37	0,56	3,35	1,56	5,82E-01	1	3,12E-02	1
Flr	6,58	12,77	0,85	1,41	1,67E-32	1,53E-43	1	1
FnbA	4,37	1,28	2,08	1,56	2,01E-25	5,64E-01	3,91E-02	1
FnbB	0,93	1,48	3,98	2,00	1	1	3,45E-33	1,12E-04
Frr	0,93	2,29	0,84	0,78	1	8,50E-08	1	1
FtsA	0,75	0,71	0,75	2,00	1	1	1	3,87E-02
Geh	2,07	1,91	1,21	1,11	2,54E-31	1	1	1
GlpQ	1,72	2,02	0,81	0,51	1	4,04E-04	1	1
Hla	0,74	0,53	1,20	3,12	1	1	1	1,57E-38
Hld	0,07	1,60	0,86	0,05	1,14E-06	1	1	9,03E-02
HlgA	11,24	17,10	1,05	1,29	1,35E-38	1,79E-55	1	1
HlgB	1,93	2,09	1,62	5,11	1	8,76E-07	1	5,41E-50
HlgC	1,99	1,43	1,33	5,81	1	1	1	5,20E-42
HmrA	0,16	0,13	0,59	0,62	1,38E-02	7,74E-05	1	1
HslU	0,54	3,19	1,02	1,54	1	4,72E-02	1	1
Hup	0,35	0,59	0,66	0,74	2,82E-02	1	1	1
HysA	4,45	1,05	1,18	4,44	2,57E-02	1	1	3,81E-02
KdpC	7,24	1,18	0,96	1,04	8,95E-03	1	1	1
LtaS	0,52	0,25	1,34	0,72	1	8,98E-19	1	1
LukD	1,44	2,48	1,67	2,17	7,62E-01	1,08E-03	1	1,00E-01
LukG	12,48	3,96	0,74	1,74	3,14E-99	1,58E-66	1	1
LukH	10,50	6,87	0,82	1,72	2,22E-116	2,34E-108	1	1
MetQ2	0,34	2,27	0,74	0,69	1	1,45E-02	1	1
MgrA	5,18	2,25	1,47	0,81	2,08E-12	2,20E-03	1	1
MnmA	3,76	1,43	0,64	1,22	7,36E-03	1	1	1
MsrA1	2,13	0,85	1,12	1,55	2,47E-05	1	1	1
MsrR	1,18	2,37	0,86	0,70	1	2,32E-02	1	1
Noc	3,32	1,89	0,92	0,42	1,28E-02	1	1	1
NusB	13,93	5,93	0,28	2,19	2,63E-01	1,76E-03	1	8,63E-01
OpuBB	6,37	6,90	0,89	0,83	3,31E-01	8,47E-05	1	1
PdhC	0,99	0,56	0,95	4,25	1	1	1	4,26E-39
PnbA	2,68	0,57	0,88	3,34	9,81E-03	1	1	6,39E-07
Psm $\beta$ 1	0,64	0,12	2,02	0,12	1	2,55E-02	7,12E-04	9,58E-04
Psm $\beta$ 2	0,71	0,56	1,27	0,14	1	1	1	1,62E-06
Psm $\alpha$ -1	0,44	0,58	1,84	0,02	1	1	1	3,45E-09
Psm $\alpha$ -2	0,94	0,38	0,70	0,03	1	1	1	2,58E-04
Psm $\alpha$ -3	0,82	0,18	0,75	0,01	1	1	1	1,40E-06
Psm $\alpha$ -4	0,52	0,25	1,24	0,02	1	1	1	1,28E-03
PurL	0,70	1,08	0,95	2,20	1	1	1	1,45E-03
PyrH	2,79	0,95	1,00	1,20	4,81E-02	1	1	1
RbfA	0,57	1,25	1,69	0,33	1	1	1	4,77E-02
RibH	2,04	2,90	1,66	2,18	8,34E-05	7,44E-09	1	1,09E-02
Rnr	1,10	0,82	0,66	2,34	1	1	1	4,84E-02
RplB	0,58	0,60	0,78	2,70	1	1	1	6,10E-14
RpmC	0,35	1,02	0,70	0,64	3,39E-05	1	1	1
RpmG2	0,48	4,37	0,67	0,92	1	1,68E-03	1	1
RpoA	0,86	0,54	0,88	2,18	1	1	1	1,22E-04
RpoB	0,83	0,90	1,07	3,28	1	1	1	2,76E-48



ERGEBNISSE

Proteinname	$\Delta\rho$ /WT	$\Delta\rho$ /WT	$\Delta\rho$ /WT	$\Delta\rho$ /WT	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
	RPMI exp	RPMI stat	TSB exp	TSB stat	RPMI exp	RPMI stat	TSB exp	TSB stat
RpoC	1,21	0,90	1,06	3,04	1	1	1	5,07E-63
RpoE	1,06	0,51	1,04	2,73	1	1	1	4,07E-04
RpsD	0,83	0,90	3,09	1,02	1	1	4,47E-08	1
RpsN2	0,12	5,65	0,14	0,51	2,94E-02	2,55E-02	1	1
RpsO	0,72	1,01	2,97	0,71	1	1	7,41E-03	1
RpsU	0,26	0,62	0,41	1,20	7,65E-08	1	1	1
RsfS	1,58	4,38	0,99	0,24	9,81E-01	3,26E-04	1	1
SaeP	2,68	3,37	1,60	8,46	3,96E-15	2,41E-28	1	2,76E-48
SaeR	0,21	4,42	2,63	3,12	1	3,79E-02	6,11E-01	5,93E-04
SAOUHSC_00106	5,85	5,56	1,19	1,28	7,17E-24	1,45E-28	1	1
SAOUHSC_00134	1,27	2,34	0,15	1,28	1	8,76E-01	2,82E-02	1
SAOUHSC_00362	0,88	3,11	0,91	1,46	1	2,46E-06	1	1
SAOUHSC_00400	0,67	0,58	6,45	2,10	1	1	1,67E-96	1,90E-14
SAOUHSC_00401	1,22	4,12	0,84	2,64	1	2,71E-26	1	6,85E-06
SAOUHSC_00531	3,27	0,84	1,49	1,42	1,95E-02	1	1	1
SAOUHSC_00538	28,92	0,37	1,63	0,44	3,25E-03	1	1	1
SAOUHSC_00622	67,70	43,59	4,47	33,50	5,83E-36	6,04E-36	2,28E-12	6,53E-31
SAOUHSC_00696	1,10	0,73	0,51	5,70	3,95E-01	1	1	2,42E-02
SAOUHSC_00756	7,82	1,24	0,53	1,55	6,95E-03	1	1	1
SAOUHSC_00817	11,07	8,57	1,54	0,74	2,43E-41	6,21E-39	1	1
SAOUHSC_00835	0,70	1,55	0,95	0,33	1	1	1	1,94E-02
SAOUHSC_00845	0,54	0,75	0,28	0,97	1	1	1,44E-07	1
SAOUHSC_01134	0,24	0,70	0,81	0,81	4,22E-03	1	1	1
SAOUHSC_01413	1,75	1,12	0,16	1,47	1	1	2,82E-02	1
SAOUHSC_01460	0,94	0,60	1,05	2,35	1	1	1	2,94E-02
SAOUHSC_01499	0,86	2,96	1,05	1,91	1	2,11E-02	1	1
SAOUHSC_01622	1,14	0,45	3,33	0,52	1	1	2,42E-04	1
SAOUHSC_01649	0,63	1,14	0,56	0,28	1	1	1	3,36E-03
SAOUHSC_01675	11,07	0,37	0,96	0,54	1,48E-03	1	1	1
SAOUHSC_01720	4,91	0,11	2,30	0,82	1,23E-01	1,62E-04	1	1
SAOUHSC_01729	0,28	0,41	0,13	0,75	4,07E-05	1	3,73E-03	1
SAOUHSC_01895	0,80	2,25	1,18	0,67	1	5,82E-03	1	1
SAOUHSC_01902	0,11	0,56	6,47	0,38	1	1	6,73E-04	1
SAOUHSC_01920	2,01	3,79	0,43	0,32	3,33E-01	1,34E-02	1	1
SAOUHSC_01944	53,77	0,69	19,12	1,86	4,33E-04	1	4,76E-04	1
SAOUHSC_01977	0,60	2,03	1,18	0,66	1	3,44E-07	1	1
SAOUHSC_01991	0,38	3,54	0,58	0,99	1	2,55E-02	1	1
SAOUHSC_02010	36,17	1,43	0,35	0,41	2,55E-02	1	1	1
SAOUHSC_02014	0,18	1,53	1,44	0,66	3,13E-05	1	1	1
SAOUHSC_02044	1,26	3,24	1,42	0,64	9,53E-01	7,47E-10	1	1
SAOUHSC_02065	1,20	2,63	0,48	0,27	1	2,19E-04	1	1,23E-06
SAOUHSC_02077	0,74	4,91	0,74	0,21	1	2,99E-05	1	1
SAOUHSC_02093	0,28	0,72	0,71	0,41	1,74E-13	1	1	1
SAOUHSC_02096	0,43	0,34	2,03	0,35	1	1	1,21E-03	1
SAOUHSC_02127	2,99	2,27	5,16	2,43	3,41E-31	1,23E-11	2,72E-53	3,36E-14
SAOUHSC_02448	0,65	0,34	0,72	0,42	1	1,16E-02	1	1
SAOUHSC_02466	0,74	0,64	0,75	2,04	1	1	1	1,67E-04
SAOUHSC_02574	4,17	7,19	13,42	5,89	1,87E-01	8,85E-03	3,44E-01	3,09E-04
SAOUHSC_02627	1,65	0,55	0,49	6,35	1	1	1	1,04E-05
SAOUHSC_02724	2,02	1,65	0,82	1,19	3,40E-02	1	1	1
SAOUHSC_02794	6,26	9,03	0,29	1,92	2,82E-02	8,47E-05	1	1
SAOUHSC_02846	8,59	0,89	1,53	2,56	7,49E-03	1	1	7,29E-01
SAOUHSC_1307a	0,43	1,00	1,47	0,34	1	1	1	3,92E-06
SarR	3,27	1,08	0,87	0,46	1,58E-07	1	1	1
Sbi	2,73	4,59	4,50	2,49	4,33E-73	6,18E-234	4,78E-118	2,83E-42
SbnC	0,41	0,25	0,59	1,28	1	4,41E-02	1	9,13E-01
Scc	9,21	35,38	0,78	0,79	1,79E-26	5,55E-46	1	1
SdaAA	2,04	0,66	0,83	1,53	3,71E-02	1	1	1
SdrD	0,08	0,10	0,31	0,16	1,38E-45	1,40E-46	1,34E-09	2,46E-105
SecDF	12,58	1,11	0,46	0,73	1,11E-03	1	1	1
SecG	0,09	0,48	0,62	0,46	1,72E-03	4,21E-01	1	1
SelX	8,40	6,65	1,05	1,95	2,05E-94	4,74E-93	1	1
Sle1	0,31	0,19	1,18	0,63	1	2,35E-02	1	1
SmpB	0,56	0,03	0,23	1,06	1	2,51E-02	1	1
Spa	0,31	0,50	0,36	0,28	1	1	8,18E-08	4,56E-01
SplA	18,97	1,70	2,71	16,18	1,11E-03	1	6,11E-01	1,15E-04
SplB	1,18	0,99	2,04	22,48	1	1	5,26E-03	3,68E-21
SplD	4,74	4,47	1,05	17,21	5,53E-06	1,38E-06	1	3,95E-10
SplF	1,29	0,99	2,44	8,97	1	1	4,23E-05	2,75E-23
Ssl1	2,56	10,29	0,95	0,99	1,60E-23	3,84E-100	1	1
Ssl2	5,72	42,07	0,69	0,87	4,07E-05	5,87E-12	1	1
Ssl3	7,74	37,83	1,14	1,29	5,89E-26	1,95E-49	1	1
Ssl4	21,26	63,53	0,80	1,14	1,21E-36	4,56E-50	1	1
Ssl5	5,78	25,83	0,69	0,91	4,50E-04	9,50E-09	1	1



ERGEBNISSE

Proteinname	$\Delta\rho$ /WT RPMI exp	$\Delta\rho$ /WT RPMI stat	$\Delta\rho$ /WT TSB exp	$\Delta\rho$ /WT TSB stat	p-Wert RPMI exp	p-Wert RPMI stat	p-Wert TSB exp	p-Wert TSB stat
Ssl6	4,32	20,85	0,75	1,06	2,58E-28	1,70E-55	1	1
Ssl7	8,42	16,99	0,84	0,83	2,48E-115	8,18E-117	1	1
Ssl8	1,39	7,77	0,67	0,91	1	4,37E-11	1	1
Ssl9	0,43	3,83	1,63	1,39	1	2,68E-03	1	1
Ssl11	1,03	1,24	7,02	2,60	1	1	7,40E-46	2,87E-20
Ssl12	7,25	13,24	0,61	1,55	3,32E-06	2,32E-10	1	1
Ssl13	42,97	35,72	1,97	5,03	3,24E-19	9,70E-22	1	1,06E-08
Ssl14	16,28	81,34	1,06	1,10	1,88E-10	1,27E-13	1	1
SspA	2,40	2,89	2,78	1,94	7,02E-07	5,72E-11	3,54E-10	6,81E-01
SspB	4,25	4,01	1,58	1,56	1,03E-37	5,66E-34	1	1
SucB	0,57	0,45	1,09	2,76	1	1	1	7,09E-13
TarF	2,86	1,39	0,72	1,30	9,81E-03	1	1	1
TcaA	1,27	8,40	0,31	0,55	1	8,85E-03	1	1
TcyP	2,57	9,19	1,22	1,46	2,63E-01	2,07E-07	1	7,09E-01
ThyA	2,47	0,53	0,73	0,91	2,39E-02	1	1	1
TopA	1,16	5,22	0,92	1,25	1	1,38E-04	1	1
TraP	0,82	0,53	1,01	2,02	1	1	1	3,18E-04
TrxA	0,49	0,66	2,04	0,85	1	1	2,50E-03	1
TyrS	3,32	0,69	0,72	1,01	1,55E-05	1	1	1



Dem SaeR-Regulon konnten 27 der 66 Proteine zugeordnet werden. Im RPMI-Medium wurden in beiden Wachstumsphasen stark erhöhte Proteinmengen (Verhältnis  $\geq 5$ ) für die Proteine SelX (*staphylococcal enterotoxin-like toxin X*), Ssl7 (*staphylococcal superantigen-like protein*), Emp (*extracellular matrix and plasma binding protein*), Scc (*fibrinogen-binding protein precursor-like protein*), das Leukozidin-Komponenten LukH und HlgA in der  $\Delta\rho$ -Mutante nachgewiesen. Im TSB-Medium konnte eine erhöhte Proteinmenge (Verhältnis  $\geq 5$ ) in der exponentiellen Wachstumsphase für die Proteine *staphylocoagulase* Coa, *staphylococcal superantigen-like protein* Ssl11, SAOUHSC\_00400 und SAOUHSC\_01944 detektiert werden sowie in der stationären Wachstumsphase für das Lipoprotein SaeP, die Serinproteasen SplD, SplB und SplA sowie die Leukozidin-Komponenten HlgC und HlgB.

Eine weitere große Gruppe stellten Proteine dar, die durch den alternativen Sigma-Faktor SigB reguliert werden. Hier konnten 15 Proteine zugeordnet werden, die besonders in der stationären Wachstumsphase in RPMI- und TSB-Medium in erhöhter Menge in der  $\Delta\rho$ -Mutante vorlagen. Auch in dieser Analyse wies OpuBB wie in der zellulären Proteomanalyse eine erhöhte Proteinabundanz im RPMI-Medium in beiden Wachstumsphasen auf. Die extrazellulären Proteasen SspA und SspB, die durch SarA negativ reguliert werden, konnten ebenfalls in erhöhter Proteinmenge in der  $\Delta\rho$ -Mutante in allen Bedingungen detektiert werden.

Durch das Protein AgrA (*accessory gene regulator A*) werden verschiedene *phenol-soluble modulins* (PSMs) von Staphylokokken reguliert. Die vier  $\alpha$ -PSMs sowie die zwei  $\beta$ -PSMs wurden in dieser Analyse in der  $\Delta\rho$ -Mutante in verringerter Proteinmenge im Kulturüberstand in der stationären Wachstumsphase detektiert. Auch das  $\delta$ -Hämolyisin (Hld) wird durch AgrA reguliert und lag in signifikant verringerter Proteinmenge im Kulturüberstand der  $\Delta\rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp in der exponentiellen Wachstumsphase im RPMI-Medium vor. Durch AgrA

und die RNAlII wird das Protein A (Spa) von *S. aureus* reguliert. Dieses Protein wies in allen Bedingungen ein Verhältnis  $\leq 0,5$  auf, war jedoch nur in der exponentiellen Wachstumsphase im TSB-Medium signifikant verändert. Das Autolysin Atl wurde ebenfalls in allen Bedingungen in verringerten Proteinmengen in der  $\Delta rho$ -Mutante detektiert, wobei nur das Verhältnis im RPMI-Medium in der exponentiellen Wachstumsphase signifikant verändert war.

Unter den 101 Proteinen, die keinem Regulon zugeordnet werden konnten, befanden sich die *staphylococcal superantigen-like proteins* Ssl1-9 sowie Ssl11-14, die zu den Exotoxinen gehören. Sie wiesen eine erhöhte Proteinmenge in der  $\Delta rho$ -Mutante im RPMI-Medium in beiden Wachstumsphasen auf. Als weiterer Virulenzfaktor wurde die Serinprotease SplF ebenfalls in erhöhter Menge in der Mutante im TSB-Medium in beiden Wachstumsphasen detektiert. Die Proteine RpoA, RpoB, RpoC und RpoE, die für Untereinheiten der RNA-Polymerase kodieren, waren im TSB-Medium in der stationären Wachstumsphase in erhöhten Mengen vorhanden.

In signifikant verringerten Mengen wurde das Protein SdrD in allen Bedingungen quantifiziert. Auch in dieser Analyse wurde das Protein SAOUHSC\_00622 in stark erhöhten Mengen (Verhältnis  $\geq 40$  im RPMI-Medium) in der  $\Delta rho$ -Mutante in allen Bedingungen quantifiziert.

Wie erwartet wurden in der vergleichenden Analyse des extrazellulären Proteoms zwischen Wildtyp HG001 und  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 erhöhte Mengen an SaeRS-abhängigen Virulenzfaktoren gefunden, die 40 % (27/66) der signifikant veränderten Proteine ausmachen, die einem Regulon zugeordnet werden konnten. Von den 39 Proteinen des Regulons konnten in der Analyse des extrazellulären Proteoms 33 Proteine in beiden Stämmen quantifiziert werden (Abbildung 23).

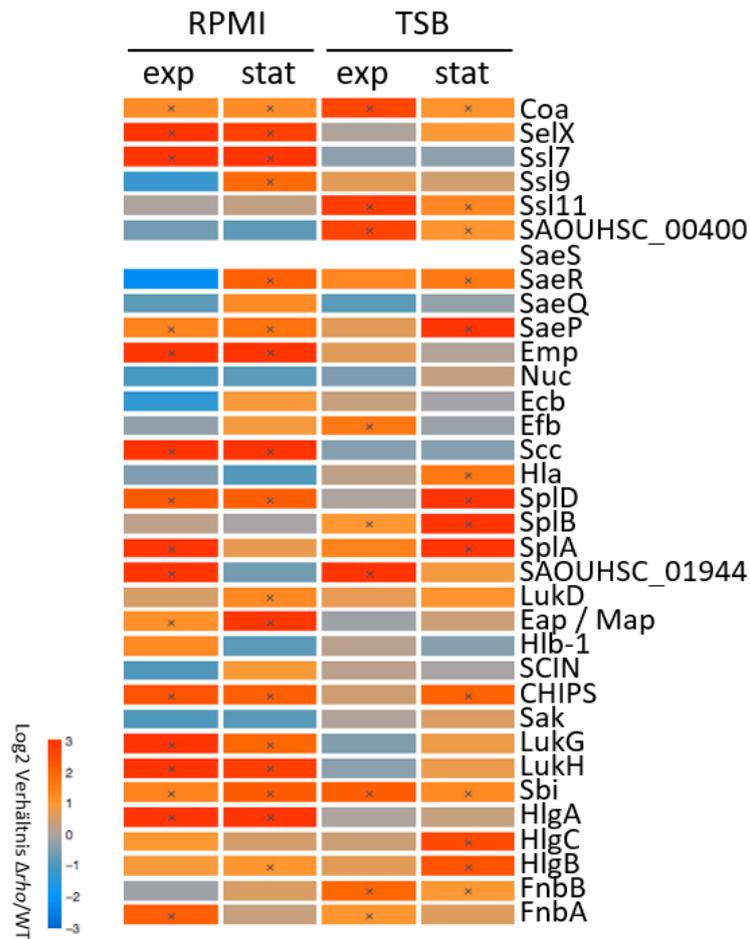


Abbildung 23 *Heatmap* quantifizierter Proteine des SaeR-Regulons aus der Proteomanalyse von *S. aureus* Kulturüberständen vom Wildtyp HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258. Dargestellt ist das Verhältnis (log<sub>2</sub> transformiert) zwischen  $\Delta\rho$ -Mutante und Wildtyp, wobei signifikante Änderungen der Proteinmenge zwischen den Stämmen mit einem Kreuz markiert sind.

In der Analyse der Zellkulturüberstände vom Wildtyp HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 wurde eine Anreicherung extrazellulärer Proteine erwartet. Unter Zuhilfenahme der PSORTb-Software wurde aus diesem Grund die Lokalisation der quantifizierten Proteine bestimmt (Abbildung 24). Dabei zeigte sich, dass der Anteil extrazellulärer Proteine an der Gesamtproteinanzahl mit 6 % weiterhin sehr gering war und zytoplasmatische Proteine mit 65 % weiterhin den größten Anteil ausmachten. Bei alleiniger Betrachtung der signifikant veränderten Proteine stieg diese Zahl der extrazellulären Proteine auf 22 % an, während die zytoplasmatischen Proteine auf 41 % sanken.

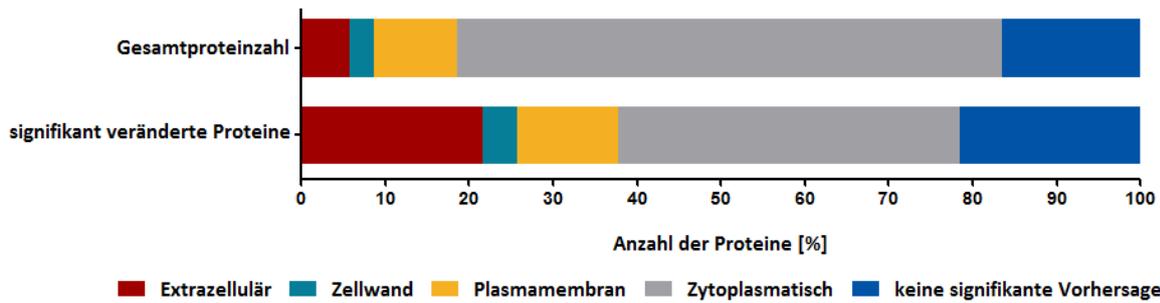


Abbildung 24 Subzelluläre Lokalisation der quantifizierten Proteine des Zellkulturüberstandes vom Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258. Mittels PSORTb-Software wurden die 999 Proteine den Kategorien Extrazellulär, Zellwand, Plasmamembran, Zytoplasmatisch oder keine signifikante Vorhersage zugeordnet. Dabei ist der prozentuale Anteil an der Gesamtproteinanzahl bzw. den 167 zwischen  $\Delta rho$ -Mutante und Wildtyp signifikant veränderten Proteinen dargestellt.

Die Betrachtung der Summe der Proteinintensitäten pro Kategorie zeigte, dass zwar die Zahl der extrazellulären und Zellwand-assoziierten Proteine bei der Analyse der Kulturüberstände kaum gestiegen ist, jedoch deren Intensität deutlich zugenommen hat (Abbildung 25A). Die Intensitäten der extrazellulären Proteine nahmen besonders in der exponentiellen Wachstumsphase in beiden Medien sowie im RPMI-Medium in der stationären Wachstumsphase zu. In den Proben der stationären Wachstumsphase (RPMI- und TSB-Medium) kam es ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme der Proteinintensitäten von Proteinen ohne signifikante Vorhersage.

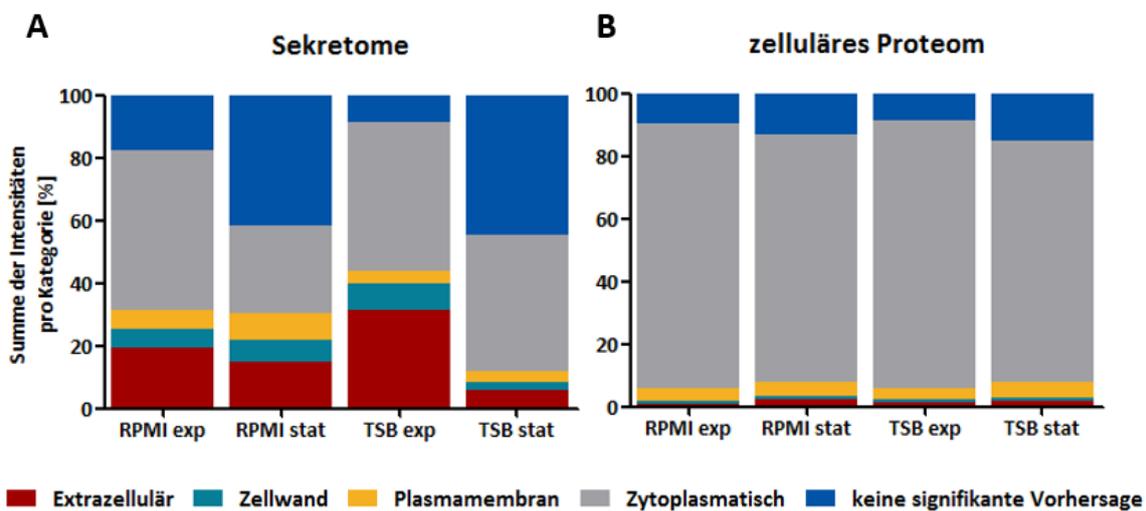


Abbildung 25 Summe der Proteinintensitäten pro Kategorie der subzellulären Lokalisation der quantifizierten Proteine (A) der Zellkulturüberstände und (B) der Zellen vom Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258. Mittels PSORTb-Software wurden die Proteine den Kategorien Extrazellulär, Zellwand, Plasmamembran, Zytoplasmatisch oder keine signifikante Vorhersage zugeordnet. Es ist der prozentuale Anteil der Summe der Proteinintensitäten pro Kategorie in den vier Bedingungen dargestellt.

Während die Intensitätsverteilung der Proteine der Zellkulturüberstände des *S. aureus* Wildtyps und der  $\Delta rho$ -Mutante zwischen den vier Bedingungen variierte, war die Verteilung bei der Analyse der zellulären Proteine für alle Bedingungen nahezu gleich (Abbildung 25B). Hier wurden 75 % der Gesamtintensität durch Proteine ausgemacht, die zytoplasmatisch vorhergesagt wurden.

In der durchgeführten Proteomanalyse wurde der größte Teil der SaeRS-abhängigen Proteine von *S. aureus* in der  $\Delta rho$ -Mutante in erhöhter Menge gefunden. Da es sich bei vielen der zum SaeR-Regulon gehörenden Proteine um wichtige Virulenzfaktoren handelt, wurde die Relevanz dieser Ergebnisse in einem *in vivo*-Infektionsexperiment untersucht.

## 4.2 Der Einfluss von Rho auf das Infektionsverhalten von

### *S. aureus* in einem *in vivo*-Infektionsmodell

Die Proteomanalysen von *in vitro*-Kulturen des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 zeigten signifikante Unterschiede in der Menge SaeRS-abhängiger Virulenzfaktoren im Kulturüberstand. In einem Bakteriämie-Infektionsmodell, welches an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von PD Dr. Knut Ohlsen und Dr. Tobias Hertlein durchgeführt wurde, sollte daraufhin der Einfluss der Virulenzfaktoren untersucht werden.

Hierfür wurden jeweils acht weibliche BALB/c Mäuse intravenös mit  $8 \times 10^7$  Bakterien in die Schwanzvene mit dem Wildtyp HG001, der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 oder dem Komplementationsstamm ST1258 pMKX::*rho* infiziert. Die Tiere wurden während des Versuchs zweimal am Tag hinsichtlich der Schwere der Infektion untersucht und gewogen.

Bei der Überprüfung der Infektionsdosis (Tabelle 29), die mittels KBE-Analyse bestimmt wurde, konnten keine Unterschiede zwischen den drei *S. aureus* Stämmen festgestellt werden.

Tabelle 29 Bestimmung der Infektionsdosis des Wildtyp HG001, der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 oder des Komplementationsstammes ST1258 pMKX::*rho* für die Infektion von BALB/c Mäusen.

Gruppe	Stamm	KBE
A	Wildtyp HG001	$7,8 \times 10^7$
B	$\Delta rho$ -Mutante ST1258	$8,1 \times 10^7$
C	Komplementationsstamm ST1258 pMKX:: <i>rho</i>	$8,2 \times 10^7$

In Tabelle A4 sind Gewichtsabnahme und klinische Symptome der einzelnen Tiere aufgeführt. In Gruppe B (Mäuse, die mit der  $\Delta rho$ -Mutante infiziert wurden) zeigten fünf der acht Tiere bereits zwei Tage nach Infektion (*post infection*, p. i.) neben einer Gewichtsreduktion deutliche klinische Symptome, wie verklebte Augen und reduzierte Aktivität, wodurch sie aus dem Experiment ausscheiden mussten. In den Gruppen A und C wiesen zu diesem Zeitpunkt nur jeweils ein Tier entsprechende Krankheitssymptome auf. Insgesamt zeigten 75 % der infizierten Mäuse in Gruppe B klinische Symptome, während es in den beiden anderen Gruppen nur 25 % waren.

Die Daten, die durch die Kooperationspartner erhoben wurden, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit in einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abbildung 26 dargestellt, die den Vergleich der Überlebensrate der Mäuse nach Infektion mit den verschiedenen *S. aureus* Stämmen zeigte.

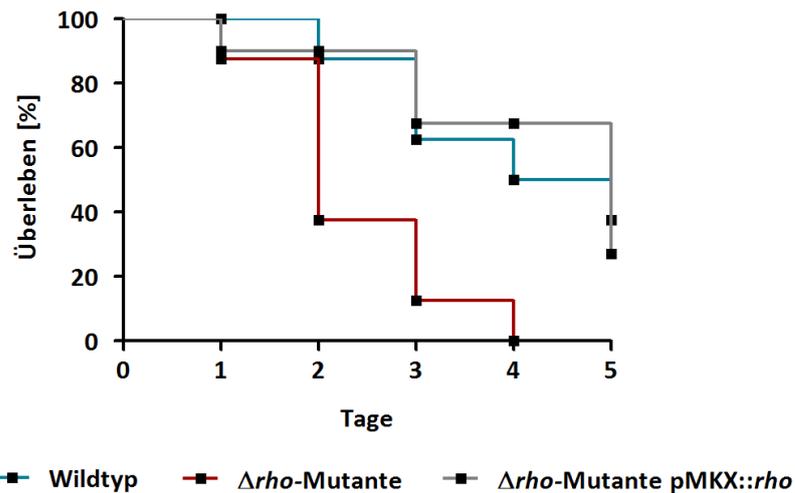


Abbildung 26 Überlebenskurve von Mäusen, die mit dem Wildtyp HG001, der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 oder dem Komplementationsstamm ST1258 pMKX::*rho* infiziert wurden. Jeweils acht weibliche BALB/c Mäuse wurden intravenös mit  $8 \times 10^7$  KBE des Wildtyps, der  $\Delta\rho$ -Mutante oder des Komplementationsstammes infiziert. Mäuse mit einem Gewichtsverlust von mehr als 20 % oder klinischen Symptomen wurden eingeschläfert und als „tot“ erfasst. Signifikante Unterschiede im Überleben der Mäuse zwischen den Gruppen wurden mit dem Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test geprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass es einen signifikanten Unterschied in der Überlebensrate von Mäusen gab, die mit der  $\Delta\rho$ -Mutante infiziert wurden im Gegensatz zum Wildtyp (p-Wert = 0,0121) und dem Komplementationsstamm (p-Wert = 0,0088). Für die statistische Analyse wurde der Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test genutzt. Zwei Tage p. i. hatten bereits fünf der acht Tiere in Gruppe B den humanen Endpunkt erreicht und mussten getötet werden. Zum selben Zeitpunkt musste aus den Gruppen A und C lediglich ein Tier getötet werden. Auch hatte keine Maus, die mit der  $\Delta\rho$ -Mutante infiziert wurde, fünf Tage p. i. überlebt, wohingegen es beim Wildtyp drei und bei dem Komplementationsstamm zwei waren. Zwischen dem Wildtyp und dem Komplementationsstamm konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate der infizierten Mäuse festgestellt werden (p-Wert = 0,9610).

### 4.3 Der Einfluss von Rho auf das Infektionsverhalten von *S. aureus* in einem *in vitro*-Infektionsmodell

In dem zuvor beschriebenen murinen Infektionsmodell konnte ein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate von Mäusen nach Infektion mit der  $\Delta rho$ -Mutante festgestellt werden. Folglich sollte untersucht werden, ob sich diese Unterschiede in einem Zellkulturmodell hinsichtlich der Anzahl internalisierter *S. aureus*-Zellen im zeitlichen Verlauf widerspiegeln.

#### 4.3.1 Infektion von 16HBE14o- Epithelzellen mit *S. aureus*

Humane 16HBE14o- Epithelzellen wurden mit dem *S. aureus* Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 infiziert und Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, um quantitative Daten zur Anzahl internalisierter *S. aureus*-Zellen zu erheben und Präparate für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen anzufertigen.

Bei der Zählung der humanen Epithelzellen mit der Countess® nach Trypanblau-Färbung konnte eine Unterscheidung von lebenden und toten Epithelzellen vorgenommen werden. Im Verlauf der Infektion mit dem *S. aureus* Wildtyp bzw. der  $\Delta rho$ -Mutante konnten keine Unterschiede in der Zahl lebender 16HBE14o- Zellen festgestellt werden (Abbildung 27A). Zudem war kein klarer Trend einer Zu- oder Abnahme der Wirtszellzahl nach Infektion zu erkennen, da die Wirtszellzahl zu den jeweiligen Zeitpunkten stark schwankte. Die Zahl abgestorbener 16HBE14o- Zellen nahm im Verlauf der Infektion zu, wobei sich auch hier kein deutlicher Unterschied zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta rho$ -Mutante nachweisen ließ (Abbildung 27B).

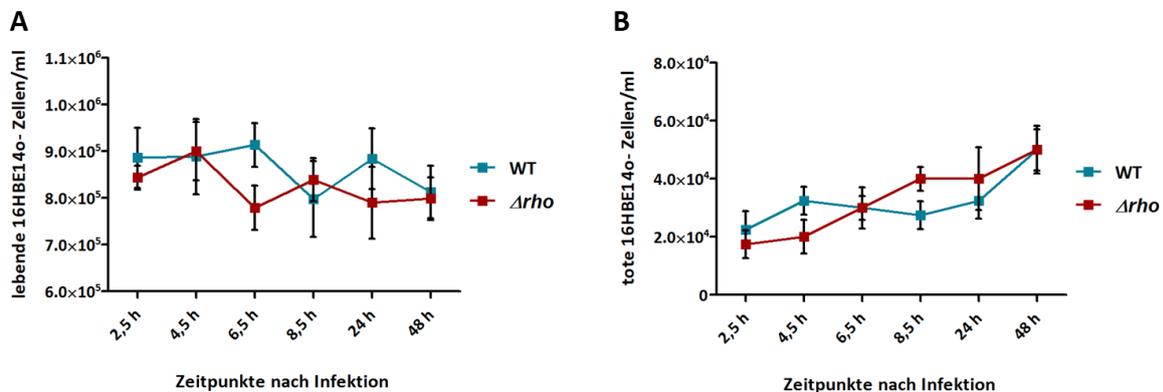


Abbildung 27 Quantifizierung von 16HBE14o- Zellen nach Infektion mit *S. aureus* Wildtyp HG001 und  $\Delta rho$ -Mutante ST1258. Dargestellt ist die Zahl lebender (A) und abgestorbener (B) 16HBE14o- Zellen pro ml, die mittels Countess® nach Trypanblau-Färbung stimmt wurde, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion.

Die intrazellulären Bakterien wurden nach Lyse der Wirtszellen mit dem Guava easyCyte™ Durchflusszytometer (Abbildung 28) gezählt. Da die *S. aureus*-Zellen keine Fluoreszenzmarker trugen, wurden diese mit Vancomycin-BODIPY FL gefärbt. Für beide Stämme stieg die Zahl der intrazellulären Bakterien im Verlauf der Infektion deutlich an und erreichte ihren Höchstwert 8,5 h p. i., wobei sich die Zahl der Bakterien für beide Stämme nahezu verdreifachte. Nach 24 h p. i. zeigte sich eine starke Reduktion der Staphylokokkenzahl, die 48 h p. i. noch weiter sank.

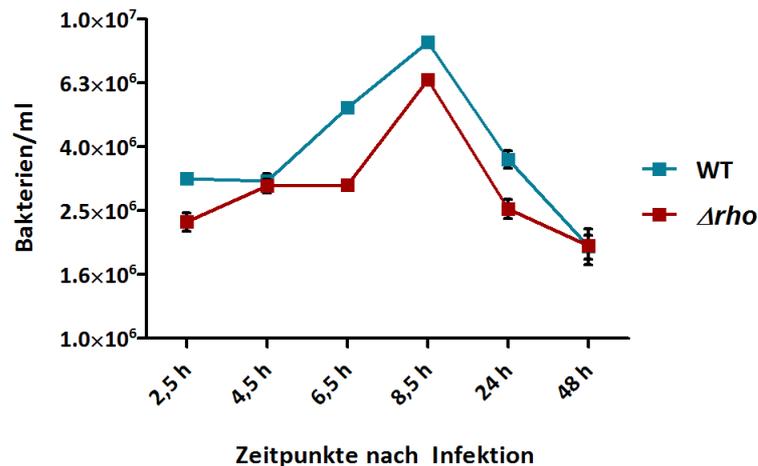


Abbildung 28 Quantifizierung von intrazellulären *S. aureus* Wildtyp HG001 und  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 nach Infektion von 16HBE14o- Zellen. Die Zahl der Bakterien pro ml wurde mit dem Guava easyCyte™ Durchflusszytometer zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt. Infizierte 16HBE14o- Zellen wurden mit SDS lysiert, die Bakterien mit Vancomycin-BODIPY FL gefärbt und die positiven Events gezählt.

Zu allen Zeitpunkten, an denen eine Bestimmung der Zahl humaner Lungeneithelzellen und intrazellulärer Bakterien erfolgte, wurden auch Präparate für eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung vorbereitet.

Die Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 29 zeigten, dass die *S. aureus*-Zellen ungleichmäßig in den 16HBE14o- Zellen verteilt waren, wobei eine Tendenz zur Lokalisation und Clusterbildung zu späteren Zeitpunkten nahe des Nukleus der Eithelzellen zu beobachten war.

Zu Beginn der Infektion (2,5 h p. i.) waren in den Eithelzellen zumeist nur kleinere Gruppen von zwei bis vier *S. aureus* zu erkennen. Vereinzelt konnten auch größere Cluster von Bakterien identifiziert werden. Die Formation dieser Cluster nahm im Verlauf der Infektion bis 8,5 h p. i. in beiden Stämmen stark zu. Nach 24 h bzw. 48 h p. i. war nur noch ein geringer Teil der Eithelzellen infiziert. Zudem hatte auch die Anzahl der intrazellulären *S. aureus*-Zellen stark abgenommen und es waren keine größeren Cluster mehr erkennbar.

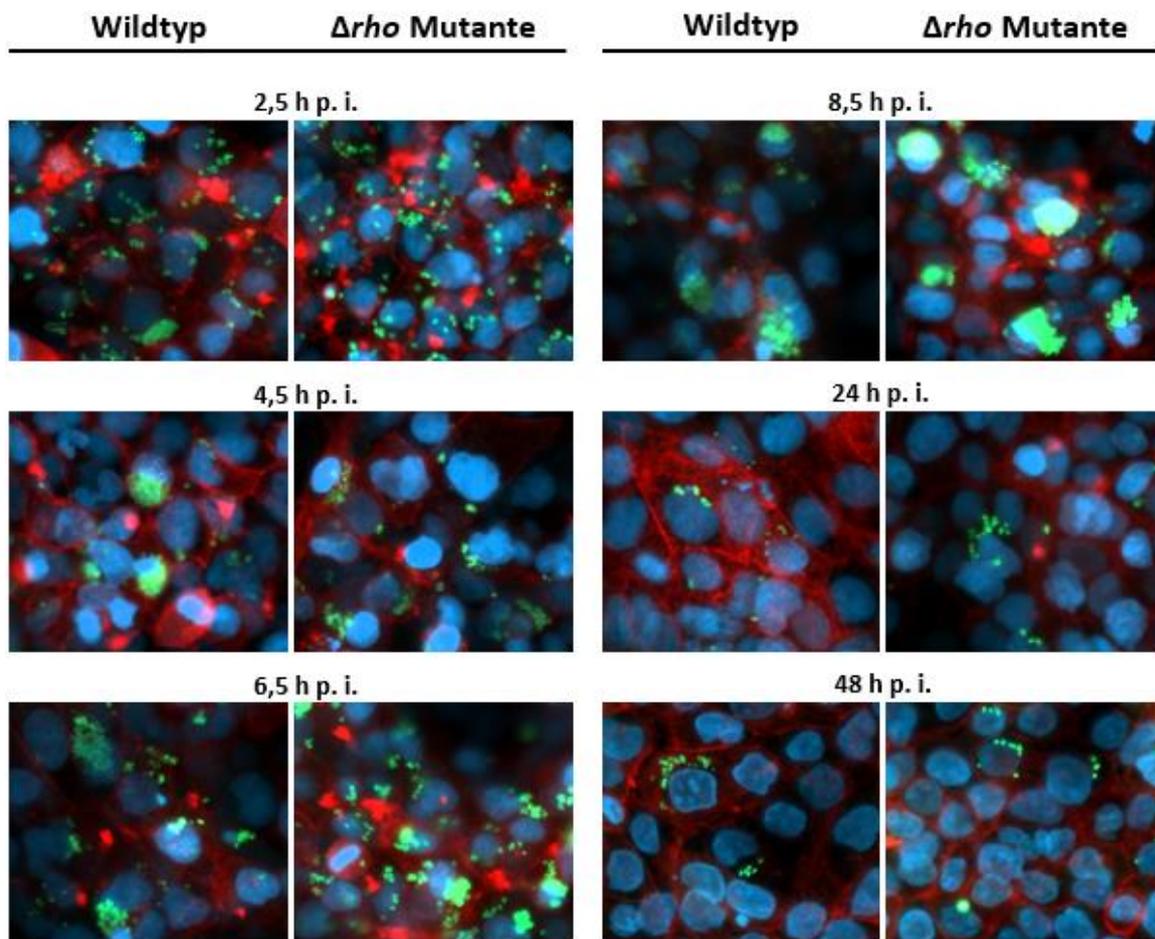


Abbildung 29 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 16HBE14o- Zellen nach Infektion mit dem *S. aureus* Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Epithelzellen und Bakterien gefärbt und mit dem ImagerM2 Fluoreszenzmikroskop untersucht. blau: DNA/Hoechst 33258, grün: *S. aureus*-Zellen/Vancomycin BODIPY FL, rot: F-Aktin/Phalloidin.

Die Färbung der *S. aureus*-Zellen mit Vancomycin BODIPY FL ermöglichte keine Unterscheidung von infizierten und nicht-infizierten humanen Epithelzellen mittels Durchflusszytometrie. Da im Folgenden das Internalisierungs- und Replikationsverhalten des Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 genauer untersucht werden sollte, war das Einbringen von Fluoreszenz-Markerproteinen in die Bakterien notwendig. Hierfür wurden Plasmide mit einer optimierten Sequenz des *gfp*-Gens in den Wildtyp und die  $\Delta rho$ -Mutante eingebracht und anschließend charakterisiert.

### 4.3.2 Methodenoptimierung zur Fluoreszenz-Markierung von *S. aureus*

Die Charakterisierung von *S. aureus*-Zellen, die verschiedene Fluoreszenz-Markerproteine trugen, sowie der folgende *in vitro*-Infektionsversuch mit A549-Zellen wurden im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Alexander Ganske durchgeführt, wobei die unmittelbare Betreuung der experimentellen Arbeiten durch mich erfolgte.

#### Wachstumsverhalten in pMEM- und TSB-Medium

Um einen möglichen Einfluss der Gensequenz der verschiedenen *gfp*-Varianten auf das Wachstumsverhalten des *S. aureus* Wildtyps HG001 zu untersuchen, wurden die vier Derivate des HG001 mit den pJL-sar-Plasmiden (Tabelle 5) in pMEM- und TSB-Medium kultiviert.

Der Vergleich des Wachstums der verschiedenen Derivate des HG001-Wildtyps in pMEM-Medium zeigte keine Unterschiede im Wachstum zwischen den Stämmen mit Ausnahme des Stammes, der das Plasmid pJL-sar-GFP trug (Abbildung 30A). Für diesen Stamm konnten ein geringes Wachstumsdefizit sowie eine geringere maximale optische Dichte gezeigt werden. Im TSB-Medium konnten hingegen keine Unterschiede im Wachstum zwischen dem Wildtyp ohne Plasmid oder mit Leerplasmid und den Derivaten mit verschiedenen *gfp*-Varianten festgestellt werden (Abbildung 30B).

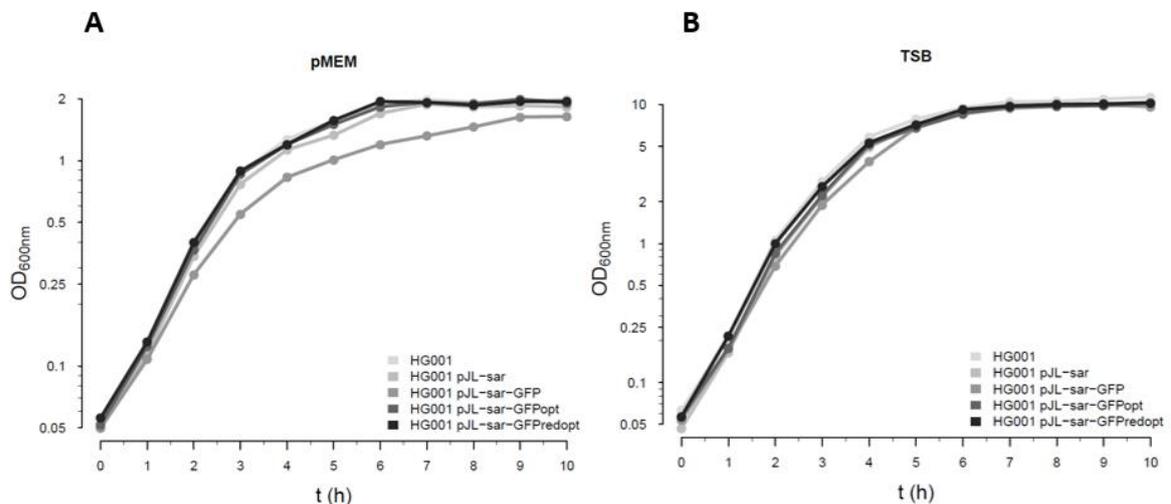


Abbildung 30 Wachstumskurven des Wildtyps HG001 und verschiedener Derivate in (A) pMEM- und (B) TSB-Medium. Die Derivate trugen dabei unterschiedliche Varianten des pJL-sar-Plasmides, die wie folgt bezeichnet wurden: pJL-sar, pJL-sar-GFP, pJL-sar-GFPopt, pJL-sar-GFPpredopt.

**In vitro-Stabilitätstest des Plasmids pJL-sar-GFPredopt**

Um die Stabilität des in dieser Arbeit konstruierten Plasmids pJL-sar-GFPredopt im *S. aureus* Wildtyp HG001 zu überprüfen, wurden die Bakterien in TSB-Medium ohne Antibiotikum kultiviert und 24 h nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase Proben für Analysen mit dem FACSaria™ IIIu gewonnen. Ein Aliquot der Kultur wurde genutzt, um eine neue TSB-Kultur zu inokulieren und nach 24 h erneut Proben zu analysieren. Bis zu sieben Tage wurden auf diese Weise Zellen analysiert. Neben der Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie wurden ebenfalls Zellen auf TSB-Agarplatten ausplattiert, um die Zahl lebender Zellen und deren Anteil an fluoreszierenden Bakterien zu bestimmen. In Abbildung 31 ist der Anteil an GFP-positiven Zellen im zeitlichen Verlauf dargestellt.

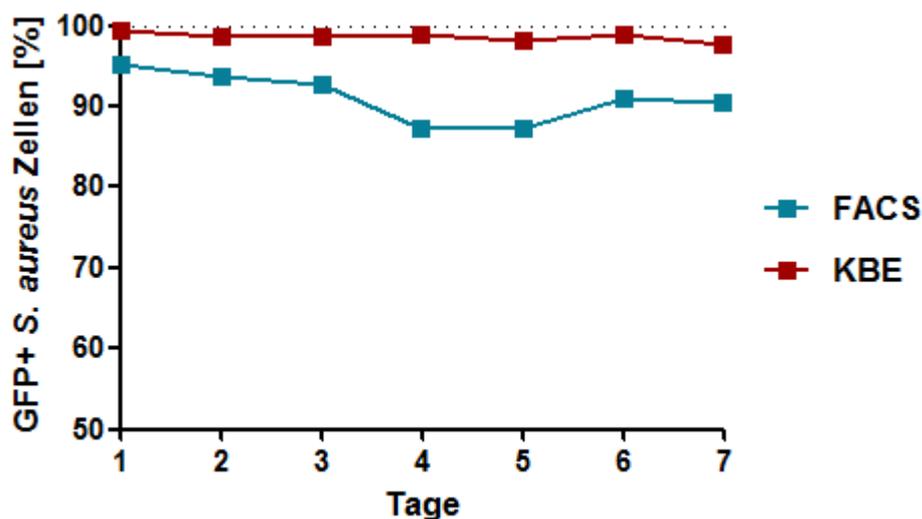


Abbildung 31 In vitro-Stabilitätstest des Plasmids pJL-sar-GFPredopt in *S. aureus* HG001. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an GFP-positiven *S. aureus*-Zellen im TSB-Medium nach Wachstums für sieben Tage ohne Antibiotikum.

Es konnte festgestellt werden, dass das Plasmid pJL-sar-GFPredopt ohne Zugabe von Antibiotika im *S. aureus* Wildtyp HG001 über den analysierten Zeitraum sehr stabil ist. Lediglich 5-13 % der *S. aureus*-Zellen wiesen im dem FACSaria™ IIIu kein Fluoreszenzsignal auf. Auch die Intensität des Fluoreszenzsignals blieb über den Analysezeitraum von sieben Tagen konstant. Die Analyse der auf TSB-Agarplatten ausplattierten Bakterien zeigte, dass mehr als 98 % der Bakterien GFP-positiv waren. Die restlichen 1-2 % der Kolonien wiesen kein (Abbildung 32A) oder auf einen Teil der Kolonie beschränktes Fluoreszenzsignal auf (Abbildung 32B).

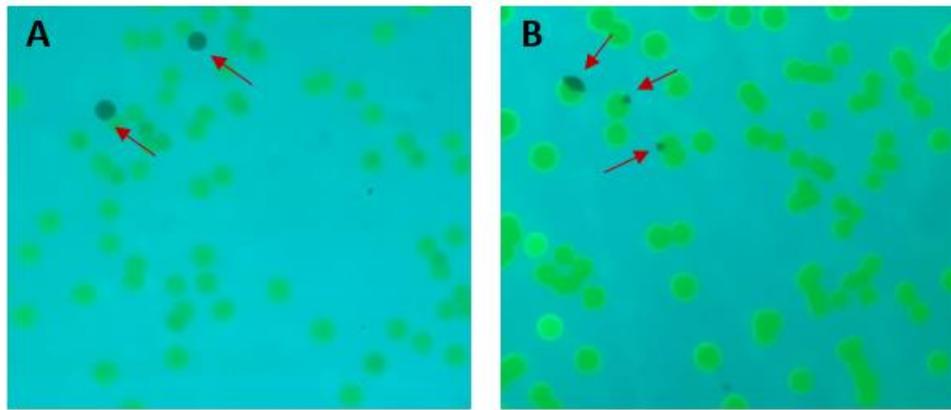


Abbildung 32 *S. aureus* HG001 pJL-sar-GFPredopt auf TSB-Agarplatten ohne Antibiotikum. **(A)** zeigt Kolonien, die kein Fluoreszenzsignal aufweisen, während in **(B)** nur noch ein Teil der jeweiligen Kolonien GFP exprimieren und somit fluoreszieren.

### Northern Blot-Analysen CodY-abhängiger Gene

Die Fluoreszenzmarkierung von *S. aureus*-Zellen sollte möglichst geringe Auswirkungen auf den Metabolismus haben, um Unterschiede im Infektionsverhalten zwischen dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258, die auf die fehlende Rho-Aktivität zurückzuführen sind, bestimmen zu können. Aus diesem Grund wurde eine entsprechende Sequenzoptimierung des *gfp*-Gens vorgenommen. Dies war notwendig, da eine *gfp*-Sequenz, die nicht an die Codon-Nutzung von *S. aureus* angepasst wurde, zu einem vermehrten Auftreten von unbeladenen tRNAs führt. Dadurch wird der Zelle ein Aminosäuremangel signalisiert und es kommt zur Derepression von CodY-abhängigen Genen. Diese Gene sind an der Synthese von Aminosäuren, aber auch an vielen anderen zellulären Prozessen beteiligt (Brinsmade 2017).

Somit wurde neben der phänotypischen Charakterisierung auch die Expression von CodY-abhängigen Genen in den *gfp*-optimierten Stämmen mittels Northern Blot-Analysen untersucht. Dafür wurden Sonden gegen die Gene *butA*, *serA* und SAOUHSC\_02888 generiert. Das Gen *butA* kodiert für eine Acetoin-Reduktase und *serA* für eine D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, während SAOUHSC\_02888 für ein Protein unbekannter Funktion kodiert. Die in Tabelle 5 aufgeführten Stämme wurden mit Ausnahme von ST1258 pMKX und ST1258 pMKX::*rho* in pMEM bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,4 kultiviert, die RNA aus den Zellen isoliert und für die Northern Blot-Analysen genutzt.

Mit der *butA*-spezifischen Sonde (Abbildung 33A) konnte auf einer Höhe von ca. 800 b eine Bande in allen Proben detektiert werden, die dem *butA*-Transkript entspricht. Dabei war die Menge des Transkripts in der  $\Delta\rho$ -Mutante geringer im Vergleich zum Wildtyp in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Expression von *butA* war im Wildtyp vergleichbar mit dem Stamm, der das

Leerplasmid pJL-sar trägt. Diese erhöhte sich jedoch stark unter Verwendung des Plasmids pJL-sar-GFP (Liese *et al.* 2013). In den beiden Stämmen, die ein Plasmid mit optimierter *gfp*-Sequenz trugen, war die Expression deutlich geringer als beim nicht optimierten *gfp* und vergleichbar zu den Transkriptmengen des Wildtyps ohne Plasmid und mit dem Leerplasmid. In den verschiedenen Proben der  $\Delta rho$ -Mutanten-Stämme waren die Expressionslevel von *butA* hingegen relativ ähnlich. Lediglich beim ST1258 pJL-sar-GFPredopt-Stamm konnte ein geringes Fluoreszenzsignal detektiert werden, was jedoch auf eine geringere Gesamt-RNA-Menge dieser Probe zurückzuführen ist (siehe Beladungskontrolle).

Die Untersuchung der Transkriptmengen von *serA* ist in Abbildung 33B dargestellt. Das *serA*-Gen bildet zusammen mit dem Gen SAOUHSC\_01832 ein bi-cistronisches Operon (siehe *AureoWiki*). Daher wurde ein Transkript auf einer Höhe von ca. 2800 b erwartet. In der Northern Blot-Analyse wurde ausschließlich im HG001 pJL-sar-GFP ein *serA*-Transkript detektiert.

In Abbildung 33C sind die Ergebnisse des Northern Blots zur Expression des SAOUHSC\_02888-Transkripts in den untersuchten *S. aureus*-Stämmen dargestellt. Dieses Transkript wurde bei ca. 1000 b mit geringer Intensität in den Stämmen HG001 und HG001 mit Leerplasmid pJL-sar sowie mit hoher Intensität im HG001 pJL-sar-GFP nachgewiesen. In den anderen Wildtyp-Stämmen und in allen *rho*-defizienten Stämmen konnte kein SAOUHSC\_02888-Transkript detektiert werden. Zusätzlich zu dem starken Fluoreszenzsignal im HG001 pJL-sar-GFP-Stamm konnte ein weiteres Transkript bei ca. 2000 b detektiert werden.

Das Auftragen von gleichen RNA-Mengen auf die Gele wurde mittels Methylenblaufärbung der Northern Blot-Membran kontrolliert, wodurch die 16S und 23S rRNA angefärbt wurde. Dabei wurde deutlich, dass in allen Proben vergleichbare Mengen RNA aufgetragen wurden, ausgenommen beim *S. aureus* Stamm ST1258 pJL-sar-GFPredopt. Die rRNA-Banden dieser Probe wiesen eine geringere Intensität auf und waren zudem schmaler, was auf eine geringe RNA-Menge schließen lässt.

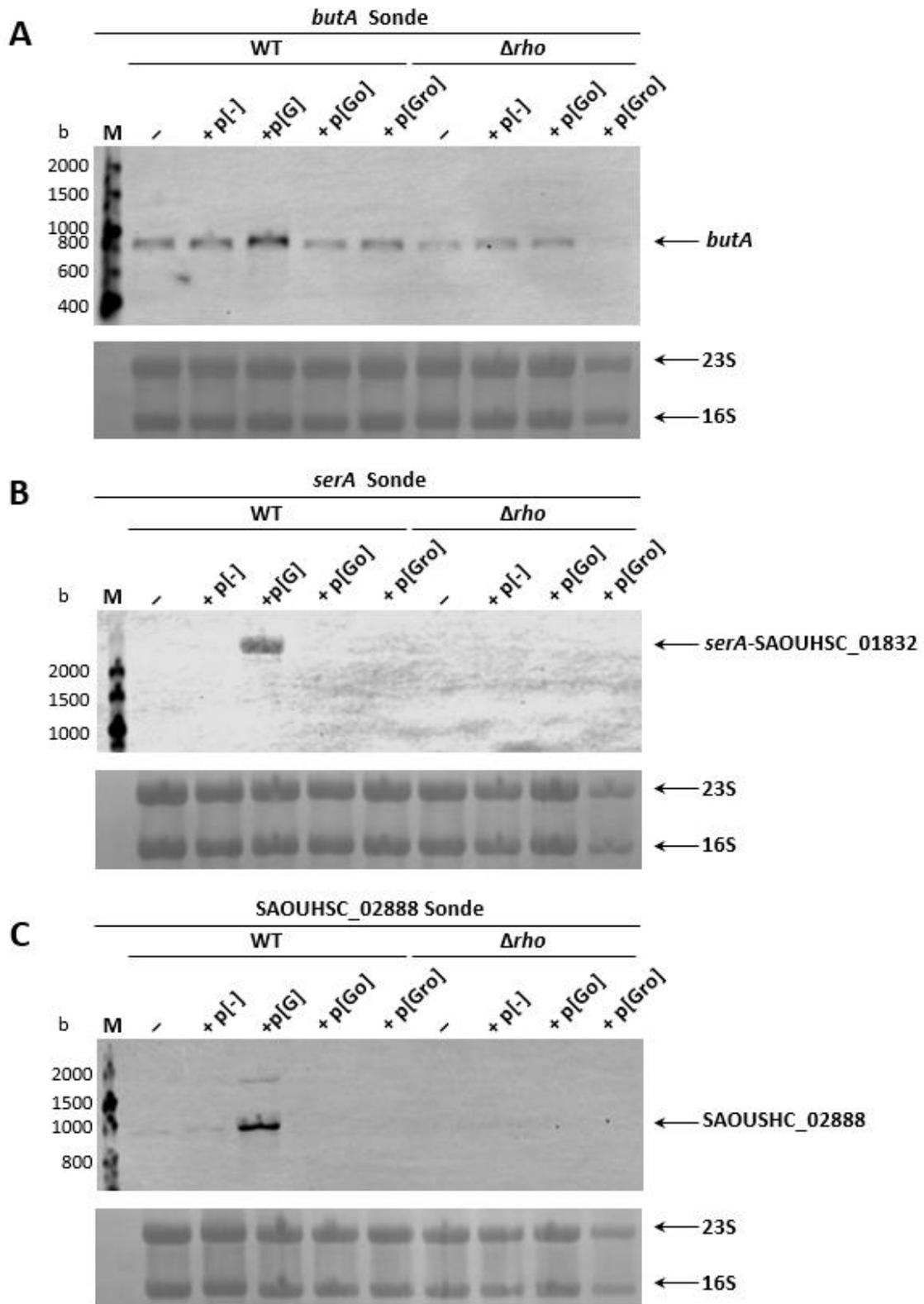


Abbildung 33 Northern Blot-Analyse der Transkripte *butA* (A), *serA* (B) und SAOUHSC\_02888 (C) in verschiedenen *S. aureus* Stämmen. Die Stämme wurden in pMEM kultiviert und bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 Zellen für die Analyse gewonnen. Es wurden RNA-Proben (3 µg pro Spur) des Wildtyps HG001, der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 und der verschiedenen Derivate aufgetragen. Die Derivate trugen dabei unterschiedliche Varianten des pJL-sar-Plasmides, die wie folgt bezeichnet wurden: + p[-] = pJL-sar, + p[G] = pJL-sar-GFP, + p[Go] = pJL-sar-GFPopt, + p[Gro] = pJL-sar-GFPredopt. Der untere Teil der Membranen zeigt jeweils die Beladungskontrolle.

Die Charakterisierung der verschiedenen Sequenzvarianten des Fluoreszenz-Markerproteins GFP in *S. aureus* zeigte, dass es zwischen den Stämmen kaum Wachstumsunterschiede gab, lediglich *S. aureus* pJL-sar-GFP wies ein geringes Wachstumsdefizit in pMEM-Medium auf. Nur im *S. aureus*-Stamm mit dem Plasmid pJL-sar-GFP war im Vergleich zum plasmidfreien Kontrollstamm eine verstärkte Expression der Gene *butA*, *serA* und SAOUHSC\_02888 erkennbar, was auf eine artifizielle und durch die GFP-Expression verursachte partielle Derepression des CodY Regulons schließen lässt. Die Anpassung der Codon-Nutzung von GFP an *S. aureus* zeigte damit die gewünschte Wirkung. Die Expression der untersuchten CodY-abhängigen Gene fiel in diesen Stämmen wieder auf das Kontrollniveau, so dass durch die Codon-Optimierung die artifizielle Derepression des CodY-Regulons vermieden werden konnte. Die *gfp*-Sequenz von pJL-sar-GFPredopt berücksichtigt auch die tatsächlich kodierten tRNAs von *S. aureus*, sodass der Einfluss auf den Metabolismus der Bakterien hier am geringsten war. Für das in dieser Arbeit konstruierte Plasmid pJL-sar-GFPredopt konnte über einen Zeitraum von sieben Tagen eine hohe Stabilität ohne Selektionsdruck nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde das Plasmid pJL-sar-GFPredopt im Anschluss für die Infektion von A549-Zellen mit dem *S. aureus* Wildtyp und der  $\Delta rho$ -Mutante genutzt

#### **4.3.3 Infektion von A549-Epithelzellen mit *S. aureus***

Humane A549-Epithelzellen wurden mit dem *S. aureus* Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 infiziert und Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, um quantitative Daten zur Zahl infizierter und nicht-infizierter Epithelzellen sowie internalisierter *S. aureus*-Zellen mit dem Guava easyCyte™ Durchflusszytometer zu erheben.

Bei der Zählung der humanen Epithelzellen im Verlauf der Infektion konnte aufgrund des Vorhandenseins von GFP in den *S. aureus*-Zellen eine Unterscheidung zwischen infizierten und nicht-infizierten A549-Zellen getroffen werden (Abbildung 15). Dabei zeigte sich, dass etwa 70 % der Epithelzellen mit Staphylokokken 1,5 h p. i. infiziert waren. Die Analyse der GFP-positiven, infizierten A549-Zellen zeigte eine leichte Abnahme bis 10,5 h p. i. und bis 24,5 h p. i. eine deutliche Reduktion der Zellzahl (Abbildung 34A). Die Zahl der GFP-negativen, nicht-infizierten Epithelzellen nahm ebenfalls bis 10,5 h p. i. ab. Danach war ein erneuter Anstieg zu verzeichnen (Abbildung 34B). Zwischen den Zellen, die mit dem Wildtyp und der  $\Delta rho$ -Mutante infiziert worden waren, konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Zellzahlen festgestellt werden.

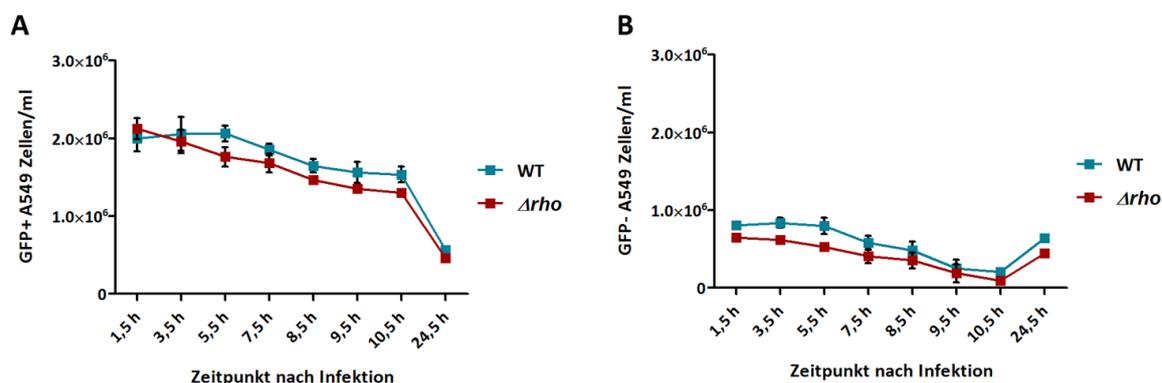


Abbildung 34 Quantifizierung von A549-Zellen nach Infektion mit dem *S. aureus* Wildtyp HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258. Dargestellt ist die Anzahl GFP-positiver (A) und GFP-negativer (B) A549-Zellen pro ml, die mit dem Guava easyCyte™ Durchflusszytometer bestimmt wurde.

Nach der Zählung der Epithelzellen wurden diese mit SDS lysiert und es erfolgte die Quantifizierung der intrazellulären Bakterien mit dem Guava easyCyte™ Durchflusszytometer (Abbildung 35). Für beide Stämme nahm die Zahl der intrazellulären Bakterien im Verlauf der Infektion deutlich zu und erreichte ihren Höchstwert 7,5 h p. i., wobei sich die Zahl der Bakterien in beiden Stämmen nahezu verdoppelt hatte. Anschließend zeigte die Zahl intrazellulärer Staphylokokken bis 10,5 h p. i. einen leichten Abwärtstrend. Nach 24,5 h p. i. hatte sich die Bakterienzahl deutlich verringert (90 % Reduktion im Vergleich zum höchsten Wert). Wie die Zahl infizierter und nicht-infizierter Epithelzellen unterschied sich auch die Zahl intrazellulärer Staphylokokken zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta\rho$ -Mutante nicht.

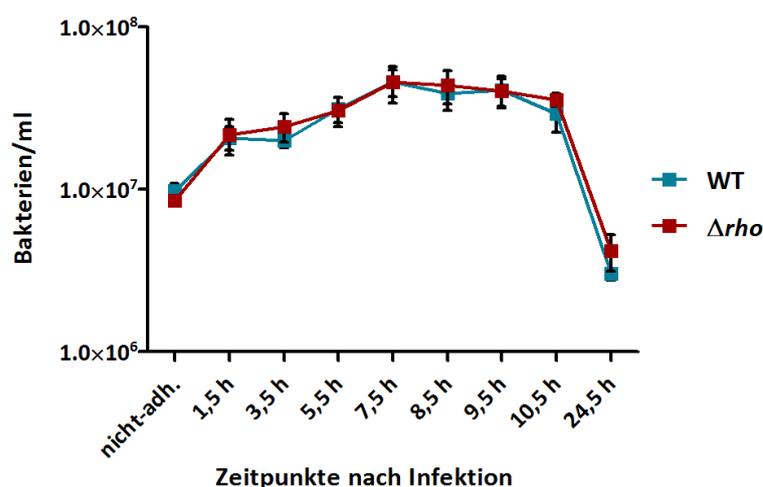


Abbildung 35 Quantifizierung von intrazellulären *S. aureus* Wildtyp HG001 und  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 nach Infektion von A549-Zellen. Die Zahl der Bakterien pro ml wurde mit dem Guava easyCyte™ Durchflusszytometer zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt. Infizierte A549-Zellen wurden mit SDS lysiert, die Zelllysate mit PBS verdünnt und die GFP-positiven Events gezählt.

In den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Infektionsexperimenten mit humanen Epithelzellen (16HBE14o- und A549-Zellen) konnten keine Unterschiede im Infektionsverhalten des *S. aureus* Wildtypstamms HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 festgestellt werden.

Jedoch wurde in diesem Experiment eine Internalisierungsrate von ca. 70 % der A549-Zellen für beide Stämme festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu anderen Untersuchungen (Surmann *et al.* 2015; Pförtner *et al.* 2014), bei denen etwa 30 % der Epithelzellen mit *S. aureus*-Zellen infiziert waren. Um einen möglichen Einfluss der Größe der Zellkulturschale und der eingesetzten FCS-Menge im Medium auf die Infektion von A549-Zellen mit *S. aureus* zu untersuchen, wurde ein weiteres *in vitro*-Infektionsexperiment durchgeführt. Dabei wurden A549-Zellen in eMEM-Medium mit 4 % bzw. 10 % FCS in verschiedenen Zellkulturschalen kultiviert und mit dem *S. aureus* Wildtyp HG001 pJL-sar-GFPredopt infiziert. Die Zahl der humanen infizierten und nicht-infizierten Epithelzellen wurde mit dem Guava® easyCyte Durchflusszytometer 1,5 h und 2,5 h p. i. bestimmt.

Die Ergebnisse der Infektion von A549-Zellen mit dem *S. aureus* Wildtyp HG001 pJL-sar-GFPredopt zeigten, dass die Menge an FCS keinen Einfluss auf die Internalisierungsrate von *S. aureus* hat und sich auch die Zahl der GFP-positiven Zellen 1,5 h und 2,5 h p. i. nur wenig voneinander unterscheidet (Abbildung 36). Durch die Kultivierung von A549-Zellen mit 10 % FCS im eMEM-Medium konnte ein Anstieg von 4-8 % der Gesamtzahl humaner Zellen in den verschiedenen Zellkulturplatten im Vergleich zu 4 % FCS detektiert werden.

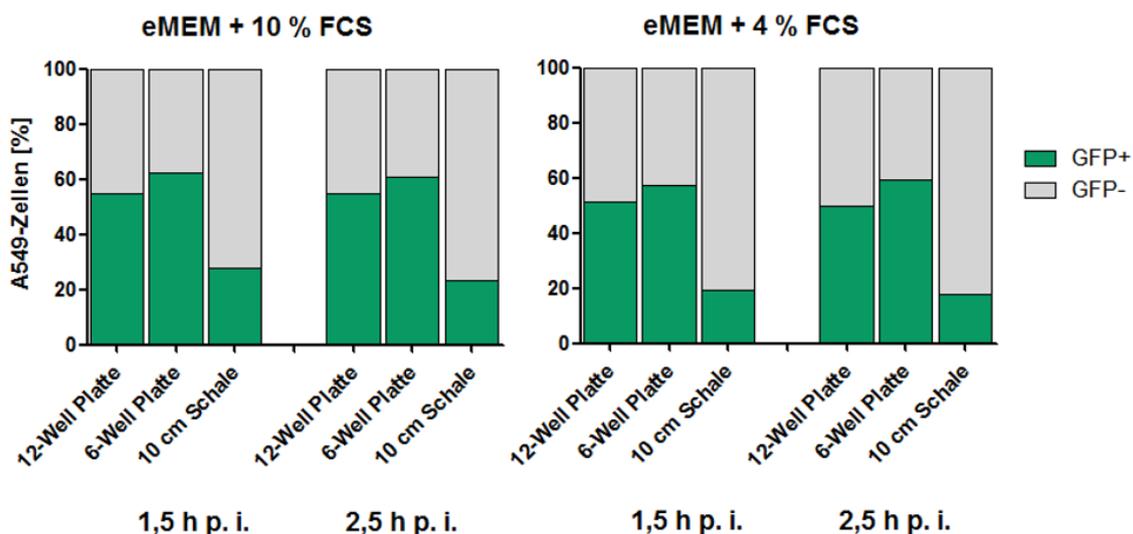


Abbildung 36 Internalisierungsrate vom *S. aureus* HG001 pJL-sar-GFPredopt nach Infektion von A549-Zellen in 12-Well, 6-Well Platten sowie 10 cm Zellkulturschalen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an GFP-positiven und GFP-negativen A549-Zellen kultiviert in eMEM-Medium mit 10 % FCS bzw. 4 % FCS 1,5 h und 2,5 h p. i..

In der Analyse der Daten wurde aber deutlich, dass die Größe der Zellkulturschale einen Einfluss auf die Internalisierung von *S. aureus*-Zellen in A549-Zellen zu haben scheint. Während in 12- und 6-Well-Platten ähnliche Verhältnisse von GFP-positiven (ca. 60 %) zu GFP-negativen (ca. 40 %) humanen Zellen festgestellt werden konnten, waren in den 10 cm Schalen nur knapp 30 % der Epithelzellen mit Staphylokokken infiziert.

Da die Unterschiede mit den verschiedenen FCS-Mengen zu den analysierten Zeitpunkten sehr gering waren, wurde die anschließende Datenanalyse mit den Daten 1,5 h p. i. und 10 % FCS im eMEM-Medium durchgeführt. Es wurde die Zahl von A549-Zellen und die Zahl der GFP-positiven A549-Zellen pro cm<sup>2</sup> bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Gesamtzahl an A549-Zellen pro cm<sup>2</sup> in den Zellkulturschalen mit steigender Fläche abnimmt (Abbildung 37A). Dies gilt auch für die Zahl der GFP-positiven A549-Zellen. In 10 cm Schalen waren im Vergleich zu 12-Well und 6-Well Platten deutlich weniger GFP-positive A549-Zellen zu verzeichnen (Abbildung 37B).

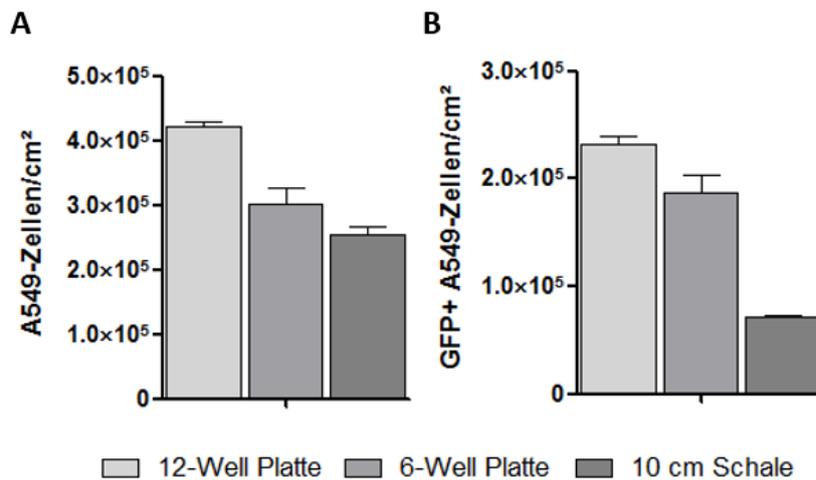


Abbildung 37 In (A) ist die Zahl von A549-Zellen pro cm<sup>2</sup> vor der Infektion dargestellt, während in (B) die Zahl der GFP-positiven A549-Zellen pro cm<sup>2</sup> nach der Infektion mit *S. aureus* HG001 pJL-sar-GFPredopt gezeigt wird.

Mittels Mikroskopie wurde vor Beginn des Infektionsexperiments überprüft, ob die A549-Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet haben. Dabei waren sowohl für die 12- und 6-Well Platten als auch für die 10 cm Schalen keine sichtbaren Lücken erkennbar. Trotzdem ist die Zahl von A549-Zellen pro cm<sup>2</sup> in 10 cm Schalen geringer im Vergleich zu 6-Well und 12-Well Platten. Somit scheint die Zelldichte einen Einfluss auf die Internalisierungsrate von *S. aureus*-Zellen zu haben.

## 4.4 Analyse des Einflusses von Bicyclomycin auf *S. aureus*

Durch die Behandlung des *S. aureus* Wildtyps HG001 mit dem Antibiotikum BCM sollte überprüft werden, ob die Inhibition von Rho durch BCM vergleichbare Effekte auf die *Antisense*-Transkription und die Expression SaeRS-abhängiger Gene hervorruft wie die Inaktivierung des *rho*-Gens. Die Versuche orientierten sich hinsichtlich der BCM-Konzentration und der Dauer der Behandlung an einer Studie von Ederth *et al.* (2006), die die Effekte von BCM auf *E. coli* untersuchte. Um einen Effekt auf die Expression von ausgewählten SaeRS-abhängigen Genen und asRNAs nachzuweisen, wurden zunächst Northern Blot-Analysen durchgeführt.

### 4.4.1 Northern Blot-Analysen

Um die Expression von SaeRS-abhängigen Genen zu untersuchen, wurden Sonden gegen die Gene *saeP* und *coa* generiert. Mit der *saeP* Sonde (Abbildung 38A) konnten zwei Transkripte bei ca. 500 b und 3000 b in allen Proben nachgewiesen werden. Das kleinere Transkript entsprach dabei dem Gen *saeP*, während das längere Transkript das gesamte Operon *saePQRS* umfasst. Die Menge beider Transkripte nahm im Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase im Wildtyp zu und wurde durch Zugabe von 20 µg/ml BCM induziert, wobei in dieser Probe fast 2-fache mRNA-Level im Vergleich zur Kontrolle in der exponentiellen Wachstumsphase nachgewiesen werden konnten (Daten der relativen Quantifizierung Abbildung A4). Die Expression erreichte jedoch nicht das Niveau der  $\Delta\rho$ -Mutante zum selben Zeitpunkt. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigte das *coa*-Gen (Abbildung 38B), für das ein Transkript mit einer Größe von ca. 2000 b detektiert wurde. Zur Untersuchung der *Antisense*-Transkription wurden Sonden zum Gegenstrang der Gene SAOUHSC\_03046 und SAOUHSC\_00974 genutzt. Für diese *Antisense*-Transkripte wurden in der Tiling Array-Studie von Mäder *et al.* (2016) erhöhte Transkriptmengen in der  $\Delta\rho$ -Mutante festgestellt. Mit der Sonde SAOUHSC\_03046AS konnte jeweils ein Transkript mit einer Größe von ca. 1700 b in den Proben der  $\Delta\rho$ -Mutante nachgewiesen werden, während beim Wildtyp kein Transkript nachweisbar war (Abbildung 38C). Mit der Sonde SAOUHSC\_00974AS (Abbildung 38D) wurde ein Transkript mit einer Größe von ca. 2500 b erwartet, welches jedoch in keiner Probe nachgewiesen werden konnte.

Bei den Northern Blots, die in diesem Experiment durchgeführt wurden, wurde zusätzlich zu den spezifischen Gen-Sonden auch eine Sonde verwendet, die gegen die rRNA von *S. aureus* gerichtet war, um die Menge der aufgetragenen rRNA quantifizieren zu können. Dabei wurde der Farbstoff IRDye® 700CW verwendet. Jedoch war das Fluoreszenzsignal dieser Sonde bei der Detektion des

IRDye® 800CW Farbstoffs, mit dem die Gen-Sonden markiert wurden, sichtbar (Abbildung A4). Aus diesem Grund wurde für die folgenden Northern Blots diese rRNA-Sonde nicht mehr verwendet.

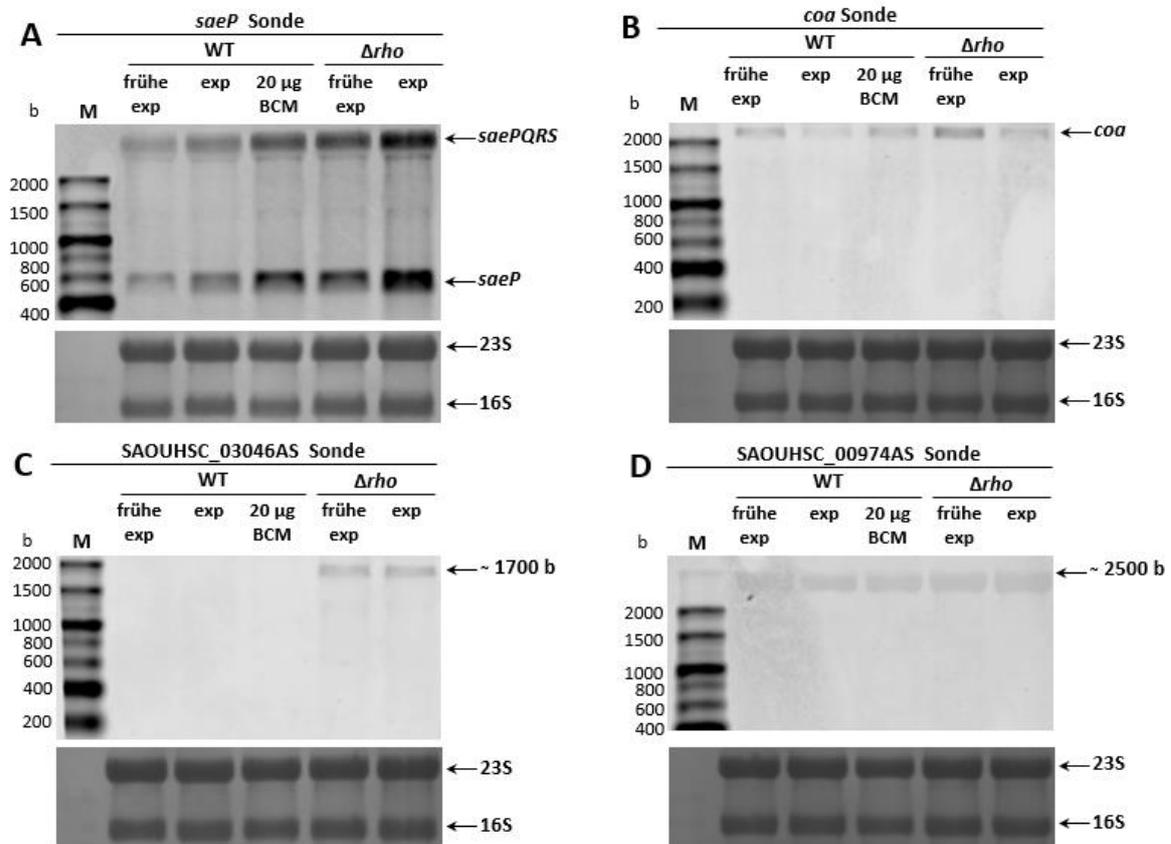


Abbildung 38 Northern Blot-Analyse der Transkripte *saeP* (A), *coa* (B) sowie der *Antisense*-Transkripte zu den Genen SAOUHSC\_03046 (C) und SAOUHSC\_00974 (D) unter Zugabe von 20 µg/ml BCM. Die Stämme wurden in RPMI kultiviert, in früher exponentieller Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  0,2) wurden Proben vom Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 gewonnen. Die Kultur des Wildtyps wurde geteilt und ein Teil der Kultur mit 20 µg/ml BCM versetzt. In der exponentiellen Wachstumsphase, 70 min nach Zugabe von BCM, wurden Zellen des Wildtyps und der  $\Delta rho$ -Mutante für die Analyse gewonnen. Es wurden 3 µg RNA pro Spur aufgetragen. Unterhalb des Northern Blots befindet sich die jeweilige Beladungskontrolle.

Durch die Zugabe von 20 µg/ml BCM zu *S. aureus* Wildtyp-Zellen konnte eine Induktion von SaeRS-abhängigen Genen erzielt werden. Jedoch entsprach diese Expression nicht den mRNA-Mengen in der  $\Delta rho$ -Mutante in der gleichen Wachstumsphase. Außerdem konnten die ausgewählten *Antisense*-Transkripte in BCM-behandelten *S. aureus*-Zellen nicht nachgewiesen werden.

Aus diesem Grund wurde ein zweiter Versuch durchgeführt, bei dem die Staphylokokken mit 40 µg/ml BCM behandelt wurden. Zusätzlich wurden Proben vom Wildtyp und der  $\Delta rho$ -Mutante in der stationären Wachstumsphase entnommen.

Mittels Northern Blot-Analyse wurde neben den bereits betrachteten SaeRS-abhängigen Genen *saeP* und *coa* zusätzlich das Gen *chp* untersucht. Die Ergebnisse zu *saeP* und *coa* konnten in diesem Experiment bestätigt werden (Abbildung 39AB). Jedoch führte eine Erhöhung der BCM-Konzentration bei beiden Genen zu keiner gesteigerten Induktion im Vergleich zur Behandlung mit 20 µg/ml BCM (Abbildung A5).

Ein anderes Ergebnis zeigte die Untersuchung der Expression des Gens *chp* (Abbildung 39C). In allen Proben der  $\Delta rho$ -Mutante und im Wildtyp während der exponentiellen Wachstumsphase wurde ein Transkript mit einer Größe von ca. 450 b nachgewiesen, welches der Länge des Gens *chp* entsprach. Nach relativer Quantifizierung der Fluoreszenzintensität konnte eine dosisabhängige Expression des SaeRS-abhängigen Gens *chp* nach Zugabe von BCM gezeigt werden (Abbildung A5). Eine weitere Bande wurde bei ca. 1200 b identifiziert, die besonders deutlich in den Proben der exponentiellen Wachstumsphase der  $\Delta rho$ -Mutante nachweisbar war. Hier konnte ebenfalls eine dosisabhängige Zunahme der Transkriptmenge in den BCM-behandelten Proben des Wildtyps gezeigt werden, während in den Kontrollproben aus der exponentiellen Wachstumsphase des Wildtyps nur ein schwaches Signal detektiert wurde. Zusätzlich wurde in der  $\Delta rho$ -Mutante ein sehr langes Transkript von mehr als 4 kb in den Proben der exponentiellen Wachstumsphase nachgewiesen.

Bei der Untersuchung der asRNA S597 konnten Transkripte mit einer Größe von ca. 2600 b in den Proben der  $\Delta rho$ -Mutante detektiert werden, wobei die Expression in der exponentiellen Wachstumsphase am stärksten war (Abbildung 39D). Beim Wildtyp zeigte sich hingegen nur ein sehr schwaches Transkript in der Probe, die mit 40 µg/ml BCM behandelt wurde sowie in der stationären Wachstumsphase.

Die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse des Versuchs mit 40 µg/ml BCM zeigten, dass eine dosisabhängige Erhöhung der Expression nicht für alle SaeRS-abhängigen Gene nachgewiesen werden konnte. Jedoch konnte bei dieser höheren BCM-Konzentration ein Effekt auf die Transkription der asRNA S597 festgestellt werden, der im Vergleich zur  $\Delta rho$ -Mutante allerdings nur schwach war. Aus diesem Grund wurde ein dritter Versuch mit 80 µg/ml BCM durchgeführt.

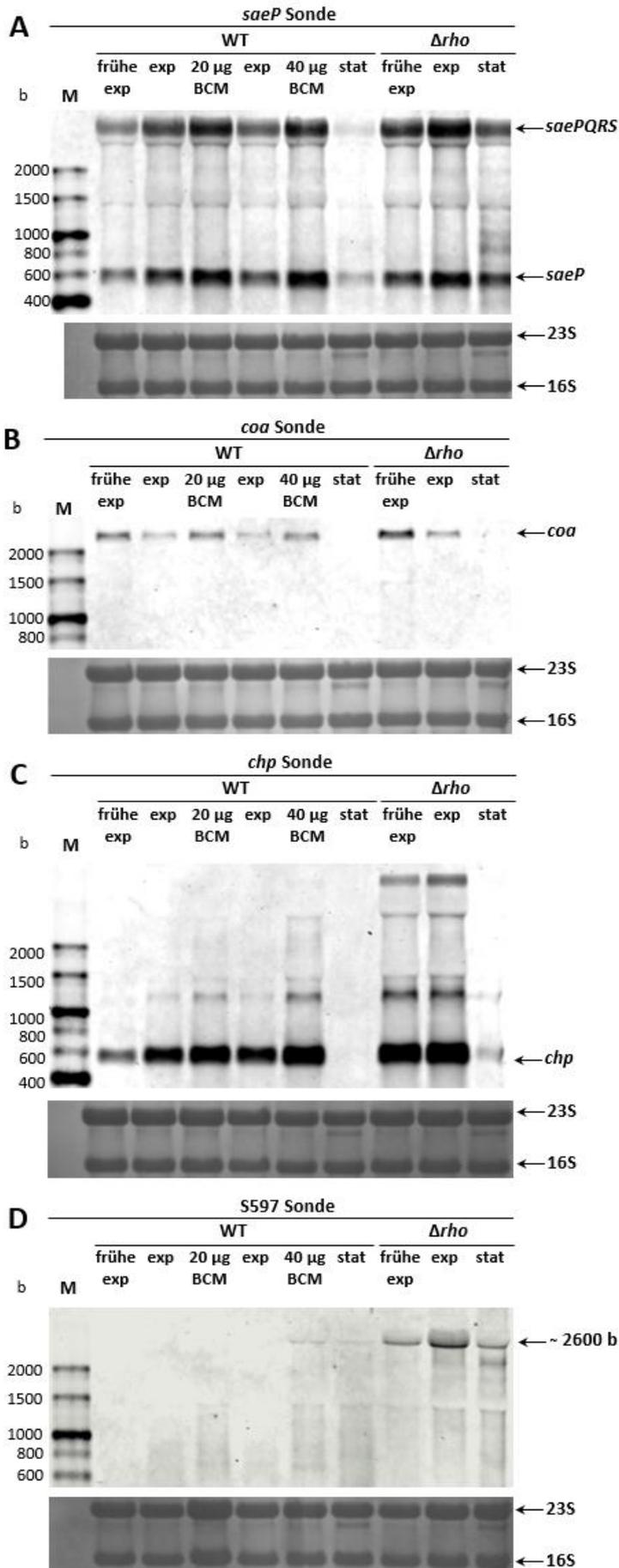


Abbildung 39 Northern Blot-Analyse der Transkripte *saeP* (A), *coa* (B), *chp* (C) und der Antisense-RNA S597 (D) unter Zugabe von 20 und 40  $\mu$ g/ml BCM. Die Stämme wurden in RPMI kultiviert, in früher exponentieller Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  0,2) wurden Proben vom Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 gewonnen. Die Kultur des Wildtyps wurde geteilt und ein Teil der Kultur mit 40  $\mu$ g/ml BCM versetzt. In der exponentiellen Wachstumsphase, 70 min nach Zugabe von BCM, wurden Zellen des Wildtyps und der  $\Delta rho$ -Mutante für die Analyse gewonnen. Es wurden 5  $\mu$ g RNA pro Spur aufgetragen. Unterhalb des Northern Blots befindet sich die jeweilige Beladungskontrolle.

Die Northern Blot-Analyse des Experiments mit 80 µg/ml BCM zeigte einen deutlichen Effekt auf die Expression der asRNA S597 in behandelten Wildtyp-Zellen (Abbildung 40). Die relative Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten in der exponentiellen Wachstumsphase zeigte, dass die Expression der asRNA in Wildtyp-Zellen mit BCM vergleichbare Transkriptmengen wie in der *Δrho*-Mutante erreichte (Abbildung A6). In der stationären Wachstumsphase wurde ein sehr starkes Fluoreszenzsignal in der *Δrho*-Mutante detektiert, wohingegen im Wildtyp nur eine sehr geringe Transkription nachweisbar war. In den Proben aus der frühen exponentiellen und exponentiellen Wachstumsphase des Wildtyps konnte keine Transkription der asRNA S597 gezeigt werden.

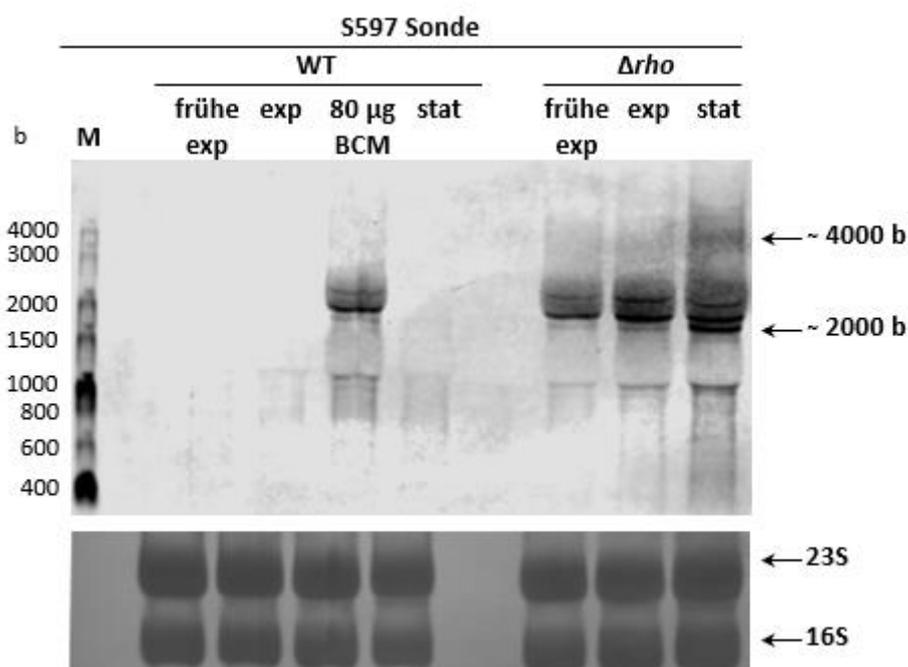


Abbildung 40 Northern Blot-Analyse der asRNA S597 unter Zugabe von 80 µg/ml BCM. Die Stämme wurden in RPMI kultiviert, in früher exponentieller Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  0,2) wurden Proben vom Wildtyp HG001 und der *Δrho*-Mutante ST1258 gewonnen. Die Kultur des Wildtyps wurde geteilt und ein Teil der Kultur mit 80 µg/ml BCM versetzt. In der exponentiellen Wachstumsphase, 70 min nach Zugabe von BCM, wurden Zellen des Wildtyps und der *Δrho*-Mutante für die Analyse gewonnen. Es wurden 7 µg RNA pro Spur aufgetragen. Unterhalb des Northern Blots befindet sich die Beladungskontrolle.

Da mit einer Konzentration von 80 µg/ml BCM ein deutlicher Effekt auf die Expression der asRNA S597 erreicht werden konnte, wurden diese Proben für Microarray-Analysen eingesetzt, um einen globalen Überblick über die Expression von Protein-kodierenden Genen und asRNAs im Wildtyp nach Zugabe von BCM im Vergleich zur *Δrho*-Mutante ST1258 zu bekommen. Für die Analysen wurde ein zweites biologisches Replikat erzeugt. Aus den jeweiligen Experimenten wurden zudem die Überstände der Kulturen für Proteomanalysen genutzt (siehe Abschnitt 4.4.3).

#### 4.4.2 Microarray-Analysen

Mit Hilfe von Microarray-Analysen sollte die Expression von asRNAs und SaeRS-abhängigen Virulenzfaktoren nach Behandlung des *S. aureus*-Wildtyps mit verschiedenen BCM-Konzentrationen untersucht werden. Es wurden Proben des Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 aus der frühen exponentiellen ( $OD_{600nm}$  0,2; frühe exp) und exponentiellen Wachstumsphase (exp) sowie Wildtyp-Proben nach Behandlung mit 40 bzw. 80  $\mu g/ml$  BCM analysiert.

In einer Hauptkomponentenanalyse wurde deutlich, dass es in der ersten Dimension zur Trennung der Proben von unbehandelten Wildtyp-Zellen und der  $\Delta rho$ -Mutante kommt (Abbildung 41). In der zweiten Dimension erfolgte eine Differenzierung der frühen exponentiellen von der exponentiellen Wachstumsphase. Die Proben des Wildtyps nach Zugabe von 40 bzw. 80  $\mu g/ml$  BCM waren zwischen den Proben der exponentiellen Wachstumsphase des Wildtyps und der  $\Delta rho$ -Mutante angeordnet. Das Genexpressionsmuster des mit 40  $\mu g/ml$  BCM behandelten Wildtyps war dabei dem des unbehandelten Wildtyp ähnlicher, während das Genexpressionsmuster nach Behandlung mit 80  $\mu g/ml$  deutlich mehr der  $\Delta rho$ -Mutante als dem Wildtyp entsprach.



Abbildung 41 Hauptkomponentenanalyse der gemittelten relativen Expressionslevel von zwei biologischen Replikaten des Wildtyps HG001 mit und ohne Zugabe von BCM (40 & 80  $\mu g/ml$ ) und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 in RPMI-Medium. Dargestellt ist die erste gegen die zweite Dimension.

Wie auch in den vorangegangenen Proteomanalysen wurden die Verhältnisse der relativen Expressionslevel zwischen der *Δrho*-Mutante und dem Wildtyp gebildet sowie zwischen dem Wildtyp nach Zugabe von BCM und dem unbehandeltem Wildtyp (Tabelle A6). Die Analyse zeigte, dass in der *Δrho*-Mutante eine Vielzahl von Genen eine erhöhte Expression (Verhältnis  $\geq 2$ ) in beiden Wachstumsphasen im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Nach Zugabe von BCM (40 bzw. 80  $\mu\text{g/ml}$ ) war die Anzahl von Genen mit veränderten mRNA-Mengen geringer. Bei 80  $\mu\text{g/ml}$  BCM zeigten jedoch fast so viele Gene eine erhöhte Expression wie in der *Δrho*-Mutante (Tabelle 30).

Tabelle 30 Zahl der Gene, deren Verhältnis  $\geq 2$  oder  $\leq 0,5$  zwischen *Δrho*-Mutante ST1258 und Wildtyp HG001 sowie zwischen Wildtyp nach Zugabe von BCM und dem unbehandeltem Wildtyp.

	<i>Δrho</i> /WT frühe exp	WT + BCM/WT 40 $\mu\text{g}$ BCM	WT + BCM/WT 80 $\mu\text{g}$ BCM	<i>Δrho</i> /WT exp
Zahl der Gene	59↓ 216↑	8↓ 81↑	18↓ 170↑	77↓ 218↑

In der Tiling Array-Analyse von Mäder *et al.* (2016) konnten 26 asRNAs identifiziert werden, die erhöhte Transkriptlevel in der *Δrho*-Mutante aufwiesen. Auf dem verwendeten Microarray waren Sonden für 21 dieser 26 asRNAs vorhanden, sodass deren Expression nach Zugabe von BCM untersucht werden konnte. Die relativen Expressionswerte in den analysierten Proben ist in Abbildung 42 dargestellt.

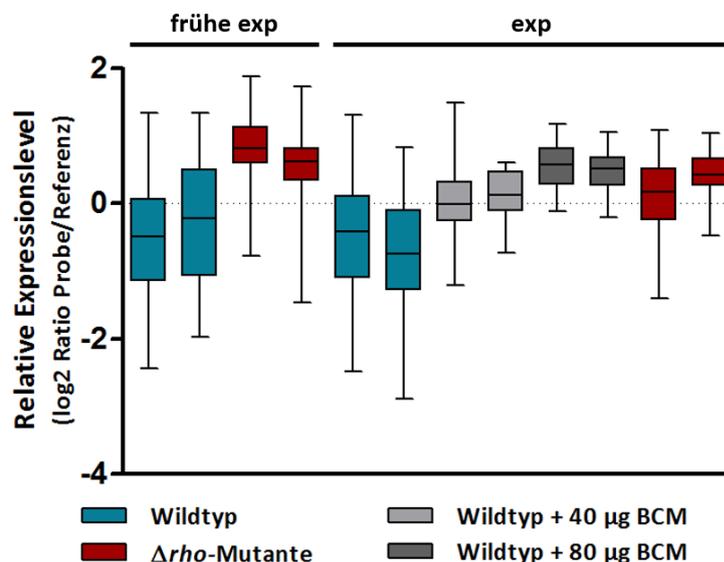


Abbildung 42 Boxplot der relativen Expressionswerte von asRNAs des *S. aureus* Wildtyps nach Zugabe von BCM und der *Δrho*-Mutante. Dargestellt sind die relativen Expressionswerte ( $\log_2$  transformiert) von 21 asRNAs die in einer Tiling Array-Studie von Mäder *et al.* (2016) identifiziert wurden. In früher exponentieller Wachstumsphase (frühe exp,  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0,2) wurden Kontrollproben gewonnen und anschließend ein Teil der Wildtyp-Kultur mit BCM (40 & 80  $\mu\text{g/ml}$ ) behandelt. Proben von behandelten und unbehandelten Zellen des Wildtyp sowie von der *Δrho*-Mutante wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (exp) gewonnen.

Es konnte eine dosisabhängige Zunahme von *Antisense*-Transkripten nach Zugabe von BCM (40 & 80 µg/ml) nachgewiesen werden. Bei 80 µg/ml BCM erreichten die Transkriptlevel ähnliche bzw. etwas höhere Werte als in der *Δrho*-Mutante.

Die Verhältnisse der relativen Expressionswerte der 21 asRNAs zwischen der *Δrho*-Mutante und dem Wildtyp sowie dem Wildtyp nach Zugabe von BCM und dem unbehandeltem Wildtyp sind in Tabelle 31 zusammengefasst. Für 11 von 21 asRNAs konnten in der *Δrho*-Mutante erhöhte Transkriptionslevel ( $\geq 1,5$ ) in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden, während vier asRNAs geringere Transkriptlevel ( $\leq 0,66$ ) aufwiesen. In Wildtyp-Proben nach Behandlung mit 80 µg/ml BCM waren 4 der 11 asRNAs stärker (Differenz  $\geq 25\%$ ) induziert als in der *Δrho*-Mutante. Zusätzlich wiesen 9 asRNAs erhöhte Transkriptionslevel ( $\geq 1,5$ ) nach Zugabe von 80 µg/ml BCM auf. In der frühen exponentiellen Wachstumsphase war für viele Transkripte ein vergleichbar großer Unterschied in der Expression der asRNAs zwischen dem Wildtyp und der *Δrho*-Mutante zu verzeichnen wie in der exponentiellen Wachstumsphase.

Tabelle 31 Das Verhältnis der relativen Expressionswerte von 21 asRNAs, die von Mäder *et al.* (2016) identifiziert worden waren. Verglichen wurde die *Antisense*-Transkription zwischen der *Δrho*-Mutante bzw. dem Wildtyp mit BCM (40 & 80 µg/ml) und dem unbehandelten Wildtyp. Dabei wurden Proben aus der frühen exponentielle ( $OD_{600nm}$  0,2) und der exponentiellen Wachstumsphase in RPMI-Medium analysiert.

Antisense-RNA	<i>Δrho</i> /WT	WT + BCM/WT	WT + BCM/WT	<i>Δrho</i> /WT
	frühe exp	40 µg BCM	80 µg BCM	exp
S1024	0,89	0,71	0,60	0,60
S1035	7,42	2,92	4,60	4,24
S1066	2,60	1,04	1,89	2,01
S116	2,35	1,67	2,79	2,56
S1165	3,24	1,73	3,62	2,57
S202	1,13	1,07	1,04	1,22
S308	0,40	0,57	1,16	0,25
S343	1,43	1,56	2,00	1,80
S401	1,00	0,79	0,94	0,65
S42	4,36	1,33	3,15	5,06
S457	3,03	1,49	2,70	1,74
S555	1,25	1,19	1,08	0,90
S597	4,01	1,70	4,64	4,68
S744	4,62	2,78	4,28	3,93
S787	2,57	1,58	1,81	1,48
S814	1,78	3,60	3,46	2,71
S815	8,02	7,11	11,73	9,06
S818	1,74	1,41	2,23	1,38
S870	1,37	2,78	1,32	0,97
S876	1,06	0,94	0,86	0,59
S977	1,60	1,64	2,26	1,42

Verhältnis *Δrho*/WT bzw. WT + BCM/WT

0,5                      1                      2

Nach der *Antisense*-Transkription wurde der Einfluss von BCM auf die Expression von SaeRS-abhängigen Genen untersucht. Auch in diesem Fall wurden die relativen Expressionswerte der 39 Gene des SaeR-Regulons in Form eines Boxplot dargestellt (Abbildung 43). Der dosisabhängige Einfluss von BCM auf die Genexpression wurde bei der Analyse der SaeRS-abhängigen Gene noch deutlicher als bei den *Antisense*-Transkripten.

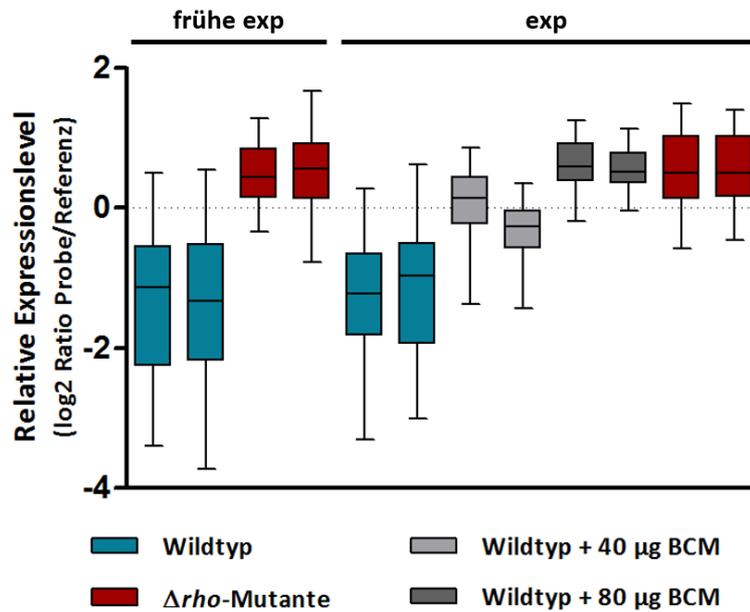


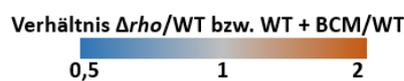
Abbildung 43 Boxplot der relativen Expressionswerte von Genen des SaeR-Regulons des *S. aureus* Wildtyps nach Zugabe von BCM und der  $\Delta\rho$ -Mutante. Dargestellt sind die relativen Expressionswerte ( $\log_2$  transformiert) von 39 Genen, die zum SaeR-Regulon gehören. In früher exponentieller Wachstumsphase (frühe exp,  $OD_{600\text{nm}}$  0,2) wurden Kontrollproben gewonnen und anschließend ein Teil der Wildtyp-Kultur mit BCM (40 & 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) behandelt. Proben von behandelten und unbehandelten Zellen des Wildtyp sowie von der  $\Delta\rho$ -Mutante wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (exp) gewonnen.

Wie im Fall der asRNAs wurde auch für die Gene des SaeR-Regulons das Verhältnis der relativen Expressionslevel zwischen der  $\Delta\rho$ -Mutante bzw. dem BCM-behandelten Wildtyp und dem unbehandelten Wildtyp gebildet (Tabelle 32).

Von den 39 Genen des SaeR-Regulons konnte für 31 Gene eine erhöhte Expression (Verhältnis  $\geq 1,5$ ) in der  $\Delta\rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp in der exponentiellen Wachstumsphase detektiert werden. Die Expression von SaeRS-abhängigen Genen stieg nach Zugabe von BCM im Wildtyp an und erreichte nach Zugabe von 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BCM vergleichbare Expressionslevel wie in der  $\Delta\rho$ -Mutante. Nach Behandlung mit 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BCM konnte für 33 Gene eine höhere Expression (Verhältnis  $\geq 1,5$ ) festgestellt werden. Der Vergleich zwischen den verschiedenen BCM-Konzentrationen zeigte, dass 22 von diesen 33 Genen nach Zugabe von 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BCM im Vergleich zu 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BCM eine 30 % höhere Transkription aufwiesen.

Tabelle 32 Das Verhältnis der relativen Expressionswerte von 39 SaeRS-abhängigen Genen. Verglichen wurde die Genexpression zwischen der  $\Delta rho$ -Mutante bzw. dem Wildtyp mit BCM (40 & 80  $\mu\text{g/ml}$ ) und dem unbehandelten Wildtyp. Dabei wurden Proben aus der frühen exponentielle ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0,2) und der exponentiellen Wachstumsphase in RPMI-Medium analysiert.

Genname	$\Delta rho$ /WT frühe exp	WT + BCM/WT 40 $\mu\text{g}$ BCM	WT + BCM/WT 80 $\mu\text{g}$ BCM	$\Delta rho$ /WT exp
SAOUHSC_00182	2.73	2.18	1.87	3.96
<i>coa</i>	5.42	1.88	4.50	2.16
<i>selX</i>	7.33	4.40	5.27	9.59
<i>ssl7</i>	2.47	1.52	1.94	3.92
<i>ssl9</i>	1.02	1.26	1.41	1.28
<i>ssl11</i>	3.03	1.56	1.83	1.60
SAOUHSC_00400	2.87	1.47	1.70	1.41
<i>lpl3</i>	0.48	0.75	1.00	0.53
<i>saeS</i>	3.43	2.43	4.05	3.82
<i>saeR</i>	3.63	2.80	4.74	4.34
<i>saeQ</i>	4.74	3.76	7.02	4.70
<i>saeP</i>	5.63	4.05	7.24	6.42
<i>emp</i>	22.60	7.01	13.10	19.49
<i>nuc</i>	1.31	1.46	1.28	1.54
<i>ecb</i>	2.52	1.66	3.05	3.01
<i>efb</i>	2.83	1.82	4.24	2.67
<i>scc</i>	2.79	1.85	3.68	2.20
<i>hla</i>	1.54	1.46	1.23	1.30
<i>splD</i>	3.97	0.97	2.39	1.84
<i>splC</i>	3.42	1.77	2.85	2.34
<i>splB</i>	2.91	2.07	2.77	2.12
<i>splA</i>	2.24	1.36	1.93	1.57
SAOUHSC_01944	1.67	1.37	1.66	1.43
<i>lukD</i>	1.11	0.88	1.35	1.06
<i>lukE</i>	1.41	0.76	1.43	0.95
<i>map2</i>	10.03	5.35	12.97	10.89
<i>eap/map</i>	12.28	5.03	10.79	11.81
<i>h1b-1</i>	8.21	6.47	10.67	8.47
<i>scn</i>	4.25	3.50	3.87	7.80
<i>chp</i>	11.35	5.94	7.58	15.37
<i>sak</i>	3.81	1.70	3.10	4.15
<i>lukG</i>	11.16	4.74	8.42	9.36
<i>lukH</i>	12.12	4.87	8.70	12.73
<i>sbi</i>	5.28	3.17	3.93	3.97
<i>hlgA</i>	11.07	4.11	8.63	10.39
<i>hlgC</i>	4.86	2.97	6.30	7.60
<i>hlgB</i>	4.33	2.67	4.88	6.31
<i>fnbB</i>	2.31	0.94	2.14	1.24
<i>fnbA</i>	3.39	1.04	2.77	1.88



Zusätzlich konnte für die meisten Gene (34/39) eine erhöhte Expression ( $\geq 1,5$ ) in der frühen exponentiellen Wachstumsphase in der  $\Delta rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Für 10 der 34 Gene lag das Verhältnis der Transkriptlevel zwischen Mutante und Wildtyp in der frühen exponentiellen Wachstumsphase sogar 30 % oder mehr über dem in der exponentiellen Phase.

Neben der Analyse der asRNAs und SaeRS-abhängigen Gene unter Zugabe von BCM wurden auch Gene untersucht, deren Produkte in der vorangegangenen Proteomanalyse in signifikant veränderten Mengen vorlagen. Hierzu zählte unter anderem die stark erhöhte Expression des Gens SAOUHSC\_00622 in der *Δrho*-Mutante. In beiden Wachstumsphasen erreichte das Verhältnis der relativen Expressionswerte einen Wert  $\geq 130$  zwischen dem Wildtyp und der *Δrho*-Mutante. Nach BCM-Behandlung des Wildtyps lag dieses Verhältnis nur bei 1,3 (40  $\mu\text{g/ml}$  BCM) bzw. 2,1 (80  $\mu\text{g/ml}$  BCM).

Die Expression der Gene *ssl1-14*, die für die *staphylococcal superantigen-like proteins* kodieren, wiesen in den meisten Fällen eine erhöhte Transkriptmenge (Verhältnis  $\geq 1,5$ ) in der *Δrho*-Mutante in der exponentiellen Wachstumsphase (12/14) und nach Zugabe von 40 bzw. 80  $\mu\text{g/ml}$  BCM (11/14) auf. Auch für die SigB-abhängigen Gene *opuBA* und *opuBB* sowie die SarA-abhängigen Gene der Serinproteasen *sspA* und *sspB* konnten erhöhte Transkriptmengen in der *Δrho*-Mutante und nach Zugabe von BCM detektiert werden. Die Expression des *ureABCEFGD*-Operons, welches am Harnstoffmetabolismus beteiligt ist, zeigte sowohl in der *Δrho*-Mutante als auch im Wildtyp nach Zugabe von BCM erhöhte Transkriptmengen. Jedoch lag unter Behandlung mit 40  $\mu\text{g/ml}$  BCM das Verhältnis zum unbehandelten Wildtyp nur zwischen 1,1 und 1,7. Im Gegensatz dazu konnten mit 80  $\mu\text{g/ml}$  BCM ähnliche Transkriptmengen, wie in der Mutante nachgewiesen werden konnten. Auch das Gen *comK1*, welches für den *competence transcription factor* ComK1 kodiert, wies sowohl in der *Δrho*-Mutante in beiden Wachstumsphasen als auch nach Zugabe von BCM stark erhöhte Transkriptmengen (Verhältnis  $\geq 4$ ) auf.

Verringerte Transkriptmengen konnten für das Gen *sdrD* in allen Bedingungen detektiert werden, sowohl in der *Δrho*-Mutante als auch nach Zugabe von BCM. Jedoch waren die Transkriptmengen nach Zugabe von BCM etwas höher als in der *Δrho*-Mutante. Ein ähnliches Expressionsmuster wies das Gen *spa*, welches für das Protein A von *S. aureus* kodiert, auf.

Die Analyse der Northern Blots und Microarray-Daten zeigte einen Einfluss des Antibiotikums BCM auf die Expression SaeRS-abhängigen Gene und die Mengen von asRNAs. Im Folgenden wurden die Proteine der Kulturüberstände dieses Experiments analysiert, um auch hier den Einfluss auf die Proteinmengen zu untersuchen.

### 4.4.3 Proteomanalysen

Die Kulturüberstände, die durch Filtration von den Zellen getrennt wurden (Abschnitt 3.2.2), wurden für Proteomanalysen genutzt, um Unterschiede in der Menge sekretierter Proteine zu untersuchen. Dabei erfolgte eine Anreicherung der Proteine mittels StrataClean™ Resin Beads. Die Analyse der Daten erfolgte wie unter Punkt 3.2.5 beschrieben. Es konnten insgesamt 776 Proteine in allen Bedingungen identifiziert werden. Dabei wurden wie in der Microarray-Analyse Proben des Wildtyps und der  $\Delta rho$ -Mutante aus der frühen exponentiellen ( $OD_{600nm}$  0,2; frühe exp) und exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  0,45; exp) sowie Wildtyp-Proben nach Behandlung mit 80  $\mu g/ml$  BCM untersucht.

In einer Hauptkomponentenanalyse wurden die Proteomsignaturen der Kulturüberstände der verschiedenen Proben miteinander verglichen (Abbildung 44). Unter Betrachtung der ersten und zweiten Dimensionen in der Hauptkomponentenanalyse wurde eine klare Trennung der Sekretom-Proben des Wildtyps und der  $\Delta rho$ -Mutante in beiden Wachstumsphasen ersichtlich. Die Proben des Wildtyps nach Zugabe von 80  $\mu g/ml$  BCM aus der exponentiellen Wachstumsphase ähnelten dabei den Proben der  $\Delta rho$ -Mutante in der früher exponentiellen Wachstumsphase stärker als den Proben anderer Bedingungen.

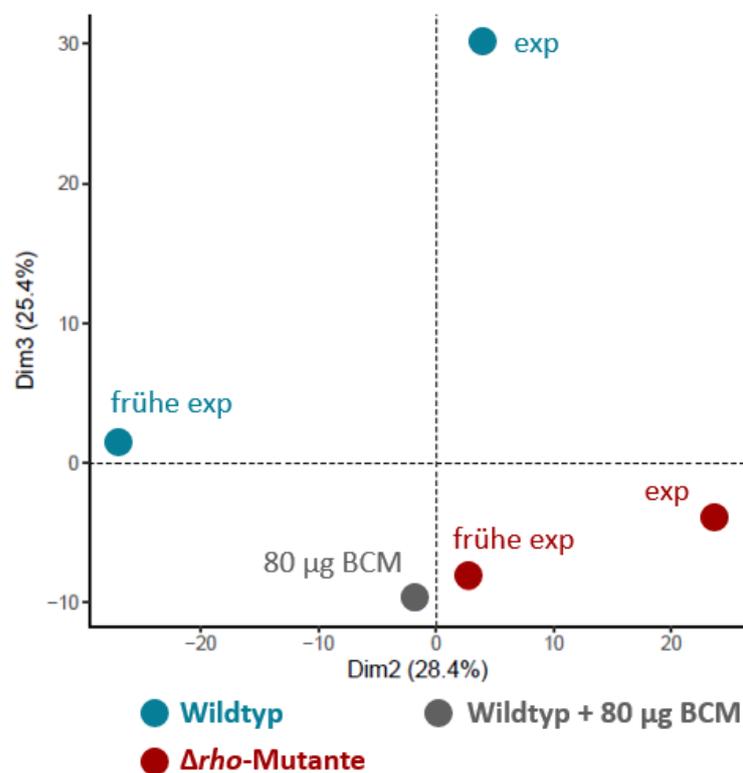


Abbildung 44 Hauptkomponentenanalyse der gemittelten Proteinintensitäten von zwei biologischen Replikaten des Wildtyps HG001 mit und ohne Zugabe von 80  $\mu g/ml$  BCM und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 in RPMI-Medium. Dargestellt ist die zweite gegen die dritte Dimension.

Auch in dieser Proteomanalyse wurden die Verhältnisse der 776 relativ quantifizierten Proteine zwischen der  $\Delta rho$ -Mutante bzw. dem Wildtyp mit 80  $\mu\text{g/ml}$  BCM und dem unbehandelten Wildtyp gebildet (Tabelle A7). Mit diesen Proteinen wurde eine statistische Analyse, wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben, durchgeführt und gleichermaßen ein Verhältnis  $\geq 2$  oder  $\leq 0,5$  sowie ein p-Wert  $\leq 0,05$  nach multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg als signifikant definiert. Es wiesen 79 Proteine veränderte Mengen auf. In Tabelle 33 ist die Zahl der Proteine dargestellt, die in der  $\Delta rho$ -Mutante bzw. dem Wildtyp mit 80  $\mu\text{g/ml}$  BCM im Vergleich zum Wildtyp in erhöhter oder verringerter Menge vorlagen.

Tabelle 33 Zahl der 79 extrazellulären Proteine mit signifikant veränderter Menge zwischen der  $\Delta rho$ -Mutante bzw. dem Wildtyp mit 80  $\mu\text{g/ml}$  BCM und dem unbehandelten Wildtyp. Die mittleren Proteinintensitäten der zwei biologischen Replikate der  $\Delta rho$ -Mutante bzw. dem Wildtyp mit 80  $\mu\text{g/ml}$  BCM wurden durch die des unbehandelten Wildtyps geteilt.

	$\Delta rho$ /WT frühe exp (OD <sub>600nm</sub> 0,2)	WT + BCM/WT 80 $\mu\text{g}$ BCM (OD <sub>600nm</sub> 0,45)	$\Delta rho$ /WT Exp (OD <sub>600nm</sub> 0,45)
Zahl der Proteine	5↓ 42↑	2↓ 54↑	6↓ 41↑

Fast alle signifikant veränderten Proteine zeigten eine erhöhte Abundanz in der  $\Delta rho$ -Mutante oder nach Zugabe von BCM zum Wildtyp. Der Vergleich der in der  $\Delta rho$ -Mutante (frühe exp & exp) und nach Zugabe von BCM im Wildtyp in ihrer Menge veränderten Proteine zeigte eine vergleichsweise große Anzahl an Proteinen (28/79), die in allen Bedingungen signifikant veränderte Mengen aufwiesen (Abbildung 45). Besonders groß war die Überlappung der beiden Wachstumsphasen ( $\Delta rho$ -Mutante versus Wildtyp). Im Gegensatz dazu waren 24 Proteine spezifisch nach Zugabe von BCM im Wildtyp signifikant verändert.

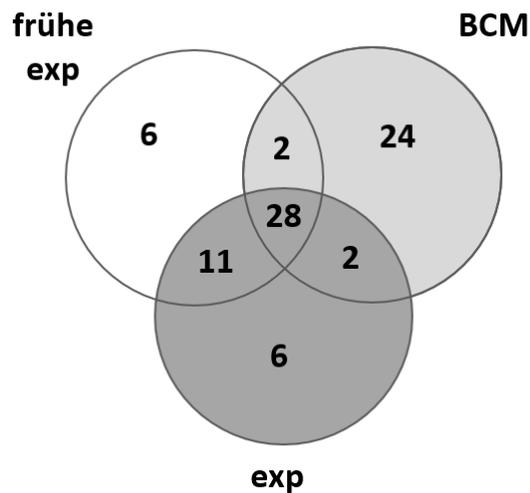


Abbildung 45 Vergleich der Proteine mit signifikant veränderter Menge in den drei Bedingungen zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta rho$ -Mutante bzw. dem Wildtyp mit BCM-Behandlung.

Unter den 28 Proteinen, die in allen Bedingungen signifikant veränderte Proteinmengen aufwiesen, befanden sich 17 Proteine, die dem SaeR-Regulon zugeordnet werden konnten. Besonders starke Unterschiede wiesen dabei die Proteine CHIPS, Emp, HlgA, LukG und LukH sowie Ssc und SelX (Verhältnis  $\geq 20$ ) in einer der drei Bedingungen auf. Insgesamt konnten 29 von 39 Proteinen des SaeR-Regulons in dieser Analyse identifiziert werden.

Für die 79 signifikant veränderten Proteine sind die Verhältnisse zwischen der  $\Delta rho$ -Mutante und dem Wildtyp sowie den Proben nach BCM-Zugabe und dem unbehandelten Wildtyp in Tabelle 34 zusammengefasst.

Tabelle 34 Extrazelluläre Proteine mit signifikant veränderter Menge zwischen der  $\Delta rho$ -Mutante bzw. dem Wildtyp mit BCM-Behandlung (80  $\mu\text{g/ml}$ ) und dem unbehandelten Wildtyp. Dabei wurden Proben aus der frühen exponentiellen ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0,2) und der exponentiellen Wachstumsphase in RPMI-Medium analysiert. Dargestellt sind die Verhältnisse der Proteinintensitäten zwischen der  $\Delta rho$ -Mutante bzw. dem Wildtyp mit 80  $\mu\text{g/ml}$  BCM und dem unbehandelten Wildtyp sowie die p-Werte nach multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg, wobei ein grau hinterlegter Wert einen p-Wert  $\leq 0,05$  markiert.

ERGEBNISSE

Proteinname	$\Delta\rho$ /WT	WT + BCM/WT	$\Delta\rho$ /WT	p-Wert	p-Wert	p-Wert
	frühe exp	exp	exp	frühe exp	BCM	exp
AdsA	3,16	1,02	4,83	1,91E-07	1	1,37E-09
CHIPS	23,75	11,58	25,60	4,80E-12	3,96E-10	5,42E-11
CidC	1,27	2,91	0,94	1	7,23E-03	1
CntA	1,57	2,73	1,00	1	5,82E-14	1
Coa	5,95	2,24	4,15	2,61E-24	4,05E-04	2,82E-19
CopA	0,09	0,84	0,18	1,96E-04	1	2,09E-01
Eap Map	7,90	5,55	9,64	7,93E-14	1,99E-10	1,04E-12
Ecb	2,92	4,35	1,69	6,06E-02	1,51E-03	1
Emp	34,61	24,86	25,97	1,58E-09	3,23E-09	3,63E-09
EsxA	0,25	0,75	0,14	1,03E-03	1	2,22E-07
FabF	1,16	2,11	0,93	1	9,93E-03	1
FhuD1	1,45	2,96	0,91	1	4,03E-02	1
Flr	2,87	2,37	11,07	9,48E-01	4,36E-01	5,34E-05
FnbA	6,28	4,22	7,20	8,25E-09	1,12E-05	8,10E-08
FtnA	0,69	0,07	1,38	1	4,99E-03	1
FtsH	1,13	2,14	0,77	1	7,23E-03	1
GapA	0,92	2,20	0,97	1	1,39E-02	1
Geh	3,65	1,30	4,19	1,67E-11	1	1,96E-10
HlgA	14,56	27,42	24,90	1,10E-07	5,73E-07	1,96E-10
HlgB	3,14	5,65	10,60	6,87E-02	1,61E-04	2,69E-06
HlgC	5,30	8,21	11,39	9,77E-03	3,95E-04	1,60E-03
HtrA1	1,58	2,84	0,89	1	9,36E-03	1
HtsA	1,32	3,00	0,56	1	3,20E-06	1
IsdA	1,72	9,65	1,63	1	9,21E-12	1
IsdB	1,11	4,83	1,44	1	1,31E-24	1
IsdC	1,27	8,77	0,51	1	1,54E-08	1
IsdD	1,92	3,29	2,18	1	2,62E-04	1,02E-01
IsdH	0,87	2,32	0,71	1	1,06E-03	1
IsdI	1,08	4,11	0,78	1	5,86E-04	1
LukG	15,31	4,67	20,80	8,25E-09	1,12E-05	1,33E-07
LukH	21,74	10,90	22,87	1,00E-15	1,77E-14	1,53E-14
NrdF	0,39	1,16	0,22	1	1	1,80E-02
OpuBB	3,45	2,19	2,48	1,20E-06	1,13E-01	4,01E-02
PrsA	1,92	1,65	2,29	1	1	1,69E-03
PsmB1	1,24	2,88	0,06	1	1	9,47E-03
QueF	0,80	3,48	5,53	1	3,51E-02	7,08E-01
RelQ	0,26	0,84	0,16	9,72E-03	1	9,15E-01
RibH	3,81	2,95	3,94	2,29E-04	1,48E-02	1,78E-03
RpsI	1,99	2,79	0,84	1	1,02E-02	1
RpsT	9,01	4,38	1,69	1,74E-02	2,18E-02	1
SaeP	4,77	3,52	4,62	9,97E-08	7,42E-04	1,62E-05
SaeQ	5,67	9,39	3,38	1,72E-02	3,51E-02	1,81E-01
SAOUHSC_00106	6,34	2,95	6,65	1,01E-36	1,71E-13	7,38E-35
SAOUHSC_00356	1,54	2,70	1,38	8,80E-11	6,08E-08	9,40E-11
SAOUHSC_00400	3,19	0,88	2,64	1,70E-06	1,95E-06	4,70E-07
SAOUHSC_00462	0,32	0,31	0,87	8,00E-35	1	2,68E-31
SAOUHSC_00542	1,39	3,50	1,23	2,14E-12	2,79E-08	4,33E-11
SAOUHSC_00622	290,78	1,01	163,69	1	3,27E-10	1
SAOUHSC_00817	3,52	0,93	6,72	3,06E-05	1,95E-05	1,45E-06
SAOUHSC_00918	2,20	2,83	1,02	1,70E-06	3,38E-05	1,59E-06
SAOUHSC_00964	0,84	2,12	0,27	4,12E-09	3,96E-10	1,50E-02
SAOUHSC_01039	2,07	2,04	1,15	5,15E-15	1,80E-12	5,62E-12
SAOUHSC_02071	3,68	0,19	3,72	3,59E-04	3,95E-04	3,48E-04
SAOUHSC_02073	3,10	0,67	3,79	6,97E-04	1,13E-02	6,77E-04
SAOUHSC_02127	4,20	2,27	5,36	1,76E-02	3,00E-03	3,36E-02
SAOUHSC_02145	0,29	0,27	0,22	9,51E-09	1,79E-05	1,00E-08
SAOUHSC_02158	0,21	0,81	0,26	1	4,96E-03	1,80E-02
SAOUHSC_02466	3,73	3,08	2,45	2,11E-04	6,66E-06	1,48E-07
SAOUHSC_02666	4,07	2,04	0,93	2,96E-08	1,12E-05	1,48E-07
SAOUHSC_02979	3,13	1,40	3,04	6,65E-11	4,11E-10	8,18E-09
Sbi	9,56	3,36	8,60	3,55E-01	2,65E-02	1
Scc	24,86	13,91	34,81	1	1	6,78E-04
SCIN	6,26	5,81	7,71	3,48E-02	1	1
SdrD	0,10	0,42	0,11	1	3,52E-01	3,88E-02
SelX	27,26	9,58	32,36	4,59E-01	3,51E-02	1
SirA	1,67	3,48	0,98	6,78E-03	6,34E-01	1
SpIB	5,78	5,88	5,75	4,19E-01	2,87E-02	1
SpIF	7,54	7,09	5,46	2,90E-02	8,48E-02	1
Ssl1	6,79	8,79	2,52	1	1,78E-02	1
Ssl11	17,02	7,83	4,89	9,25E-01	4,55E-06	1
Ssl13	35,89	13,78	27,35	3,08E-02	1,24E-01	9,15E-01
Ssl14	10,76	4,32	9,75	8,63E-13	1	1,50E-07
Ssl3	8,71	6,85	8,96	7,32E-14	1	7,13E-10
Ssl4	81,23	24,99	243,72	8,94E-03	4,38E-01	1,80E-02
Ssl6	1,93	3,23	3,08	1,73E-02	1	1,10E-04
Ssl7	4,77	4,86	7,26	4,95E-08	4,93E-02	8,18E-09
SspA	7,82	7,09	7,95	2,88E-08	9,26E-03	2,60E-08
SspB	10,09	6,57	5,17	1,65E-03	1	1,33E-07
TarF	3,53	5,93	0,64	5,88E-11	1	2,94E-10

Verhältnis  $\Delta\rho$ /WT bzw. WT + BCM/WT



In dieser Analyse konnten zusätzlich zu den SaeRS-abhängigen Proteinen sechs *staphylococcal superantigen-like proteins* (Ssl1, Ssl3, Ssl4, Ssl6, Ssl13, Ssl14) in erhöhter Menge in der  $\Delta rho$ -Mutante oder im Wildtyp nach Zugabe von BCM detektiert werden. Die SarA-abhängigen Proteine SspA und SspB konnten ebenfalls in signifikant erhöhter Menge in der  $\Delta rho$ -Mutante in beiden Wachstumsphasen und im Wildtyp nach Zugabe von BCM nachgewiesen werden. Ähnlich verhielt es sich bei der Serinprotease SplF, die ebenfalls ein Virulenzfaktor von *S. aureus* ist. Eine erhöhte Proteinmenge der Lipase Geh konnte in der  $\Delta rho$ -Mutante in beiden Wachstumsphasen detektiert werden, wobei unter Zugabe von BCM nur eine geringe Erhöhung der Proteinmenge zu verzeichnen war. Unter den Proteinen, die in allen Bedingungen eine erhöhte Proteinmenge zeigten, war das Protein RibH. Weitere sechs Proteine konnte dem SigB-Regulon zugeordnet werden. Dazu gehörte das Protein OpuBB, welches auch in den vorangegangenen Analysen detektiert wurde, wobei die erhöhte Menge dieses Proteins unter Zugabe von BCM weniger stark war im Vergleich zur  $\Delta rho$ -Mutante und diese Änderung nicht signifikant war.

Das *serine-aspartate repeat-containing protein D* (SdrD) wurde in dieser Analyse in verringerter Menge in der  $\Delta rho$ -Mutante in beiden Wachstumsphasen detektiert. Auch unter Zugabe von BCM nahm die Menge des Proteins ab, jedoch weniger stark. Ähnlich verhielt es sich auch mit dem Protein EsxA. Das Protein PSM $\beta$ 1, welches zum AgrA-Regulon gehört, wurde in der  $\Delta rho$ -Mutante in verringerter Proteinmenge im Kulturüberstand in der exponentiellen Wachstumsphase detektiert.

Zudem konnten zehn Proteine dem Fur-Regulon zugeordnet werden. Diese umfassten die Proteine IsdABCDHI, SirA und HtsA sowie FtnA und FhuD1, welche eine erhöhte Menge im Wildtyp nach Zugabe von 80  $\mu\text{g/ml}$  BCM aufwiesen, ausgenommen FtnA, welches in signifikant verringerter Menge vorlag. Trotz dessen, dass die Menge durch die Zugabe von BCM beeinflusst war, wiesen diese Proteine erstaunlicherweise beim Vergleich von Wildtyp und  $\Delta rho$ -Mutante in beiden Wachstumsphasen keine signifikanten Unterschiede auf.

Wie auch schon in den vorangegangenen Analysen konnte für das Protein SAOUHSC\_00622 in der Mutante in beiden Wachstumsphasen eine stark erhöhte Proteinmenge (Verhältnis  $\geq 150$ ) detektiert werden. Unter Zugabe von 80  $\mu\text{g/ml}$  BCM zeigte diese Protein jedoch keine Änderungen in der Abundanz im Vergleich zum Wildtyp (Verhältnis = 1).

---

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Vergleichende Proteomanalyse des *S. aureus*-Wildtyps und der $\Delta\rho$ -Mutante

Die Analyse des zellulären und extrazellulären Proteoms des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 wurde in einem Daten-unabhängigen Analyseverfahren (*data independent acquisition*, DIA) durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der erhöhten Abdeckung der Proteinsequenz der identifizierten Proteine und der verbesserten Quantifizierung auf MS2-Ebene. Daraus ergibt sich eine verbesserte Identifikationsrate im Vergleich zu herkömmlichen Daten-abhängigen Analyseverfahren (*data dependent acquisition*). Voraussetzung für diese Analyse ist jedoch eine Spektrenbibliothek des jeweiligen Organismus (Doerr 2014). Die in dieser Arbeit genutzte Spektrenbibliothek beruht auf der Arbeit von Michalik *et al.* (2017), in die 194 MS-Messungen von *S. aureus* HG001 aus *in vitro*-Kultivierungen unter verschiedenen Bedingungen eingeflossen sind. Durch die in dieser Arbeit generierten Proben konnten weitere 98 MS-Messungen zur Erweiterung der Spektrenbibliothek beigetragen werden. Der Vergleich der Spektrenbibliotheken zeigte, dass die Zahl der detektierten Ionen und Peptide um ca. 35 % zugenommen hatte (Abbildung 16). Auf diese Weise konnte eine höhere Sequenzabdeckung der Proteine erreicht werden. Durch die erhöhte Anzahl an quantifizierbaren Peptiden wurde zudem die statistische Aussagekraft bei einer Peptid-basierten Auswertestrategie erhöht, wodurch auch relativ kleine Unterschiede in der Proteinmenge zwischen verschiedenen Stämmen oder Bedingungen zuverlässig quantifiziert werden können.

In einer Tiling Array-Studie (Mäder *et al.* 2016) konnte gezeigt werden, dass sich das Transkriptom einer *S. aureus*  $\Delta\rho$ -Mutante stark von dem des Wildtyps unterscheidet. Für insgesamt 416 chromosomale Regionen konnten in einer der vier Bedingungen in der  $\Delta\rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp wenigstens 4-fach erhöhte Transkriptmenge beobachtet werden. Zu den untersuchten Bedingungen gehörten das Wachstum in RPMI- und TSB-Medium in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Von diesen Transkripten konnten jedoch nur

11 % annotierten Genen zugeordnet werden, während 76 % vom *Antisense*-Strang von kodierenden Genen stammten. Die Transkripte mit erhöhten Mengen in der  $\Delta rho$ -Mutante konnten drei Gruppen zugeordnet werden: (I) Verlängerung von TUs über das im Wildtypstamm detektierte 3'-Ende hinaus, (II) erhöhte Expression von Protein-kodierenden Genen und (III) *Antisense*-Transkripte, die nicht im Wildtyp, sondern nur in der  $\Delta rho$ -Mutante detektiert wurden. Die Mehrheit der 416 chromosomalen Regionen entfiel auf die dritte Gruppe. Die verstärkte *Antisense*-Transkription infolge der fehlenden Rho-Aktivität scheint in *S. aureus* im Gegensatz zu *E. coli* (Peters *et al.* 2012) einen Einfluss auf die *Sense*-Transkription zu haben.

Ausgehend von dieser Studie wurden in der vorliegenden Arbeit das zelluläre und extrazelluläre Proteom des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 verglichen. Die Analyse der beiden Proteinfractionen zeigte vergleichsweise wenige Proteine (76 von 1347 zellulären und 167 von 999 extrazellulär gefundenen), die signifikante Veränderungen in der relativen Proteinmenge in einer der vier untersuchten Bedingungen zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta rho$ -Mutante aufwiesen. Dabei lag die Mehrheit dieser Proteine in erhöhten Mengen in der  $\Delta rho$ -Mutante vor. Viele dieser Proteine konnten dem SaeRS-Zweikomponentensystem von *S. aureus* zugeordnet werden. Durch das Sae-System werden ca. 40 Gene in *S. aureus* kontrolliert (Tabelle 2), von denen die meisten für Virulenzfaktoren kodieren. In der Proteomanalyse konnten 34 von 39 Proteinen, die durch SaeR reguliert werden, quantifiziert werden. Von diesen wiesen 29 erhöhte Proteinmengen in der  $\Delta rho$ -Mutante auf. Diese erhöhten Mengen korrespondieren mit erhöhten Transkriptmengen von SaeR-abhängigen Genen in der zuvor durchgeführten Tiling Array-Analyse (Mäder *et al.* 2016). Dort wurde für 30 der 39 Gene des Regulons eine signifikante Zunahme der mRNA-Menge in der  $\Delta rho$ -Mutante gefunden.

Die regulatorischen Komponenten des Sae-Systems werden durch das *saePQRS*-Operon kodiert (Steinhuber *et al.* 2003). Neben der membrangebundenen Sensorkinase SaeS und dem DNA-bindenden Responseregulator SaeR besitzt das System zwei weitere Komponenten, das Lipoprotein SaeP und das Membranprotein SaeQ, die die Aktivierung der Phosphataseaktivität von SaeS modulieren (Jeong *et al.* 2012). Ein konstitutiver Promotor ist für die basale Expression von *saeS* und *saeR* verantwortlich, während der Promotor vor *saeP* durch den phosphorylierten Responseregulator SaeR induziert wird (Novick & Jiang 2003; Geiger *et al.* 2008). Die vier Sae-Proteine wurden im Proteom der  $\Delta rho$ -Mutante in erhöhten Mengen gefunden. Die Unterschiede in der Proteinmenge waren jedoch nur für SaeP, SaeQ und SaeR signifikant, da das Verhältnis von SaeS zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta rho$ -Mutante in den untersuchten Bedingungen zwischen 1,42 und 1,75 lag (Tabelle A5). In den erhöhten Mengen der regulatorischen Proteine kann jedoch nicht die Ursache für die Erhöhung der Expression von SaeR-Zielgenen gesehen werden (Mainiero

*et al.* 2010; Jeong *et al.* 2012). Da das Operon einer positiven Autoregulation unterliegt stellt die Aktivierung des *saeP*-Promotors vielmehr eine Konsequenz der stärkeren SaeR-Phosphorylierung in der  $\Delta\rho$ -Mutante dar. Die Daten der Proteomanalyse zeigen deutlich, dass in *S. aureus*-Zellen, denen die Aktivität von Rho fehlt, das Sae-System aktiviert wird und dadurch die Induktion des SaeR-Regulons zu beobachten ist.

Die Aktivierung des Sae-Systems wird über eine Vielzahl von Stimuli vermittelt (Liu *et al.* 2016). Zu diesen gehören subinhibitorische Konzentrationen von *human neutrophil peptides* (HNPs; Geiger *et al.* 2008) und inhibitorische Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (Geiger *et al.* 2008) sowie das Protein Calprotectin, welches von Neutrophilen gebildet wird (Cho *et al.* 2015).

Es wird angenommen, dass an der Aktivierung des Sae-Systems zusätzliche Membranproteine zur Wahrnehmung externer Signale beteiligt sind. Die N-terminale Domäne von SaeS, die aus zwei Transmembranhelices mit einem kurzen extrazytoplasmatischen *Linker* besteht, ist für die Übertragung des Signals an die Kinasedomäne verantwortlich (Mascher 2014). Exogene oder endogene Signalmoleküle, die die Konformation der Transmembrandomäne verändern, können die Phosphorylierung von SaeR beeinflussen (Liu *et al.* 2015). In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die meisten experimentell untersuchten Intramembran-Histidinkinasen auf Zellhüllenstress reagieren (Mascher 2014).

Eine solche Interaktion zwischen Zellwandmetabolismus und der Aktivierung des SaeR-Regulons konnte in der Arbeit von Delauné *et al.* (2012) gezeigt werden. Dabei wurde ein *S. aureus*-Stamm untersucht, der eine konstitutiv aktive Variante des Responseregulators WalR exprimiert. Das WalKR-System ist an der Regulation des Zellwandmetabolismus und der Autolyse von *S. aureus* beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die konstitutive WalR-Aktivität zu einer Induktion der Autolysin-Gene *atl* und *lytM* führt, aber auch eine verstärkte Expression des *saePQRS*-Operons und 19 weiterer SaeRS-abhängiger Gene bewirkt. In einem *S. aureus*-Stamm, dem zusätzlich die Gene *saeR* und *saeS* fehlten, war keine erhöhte Expression der Gene des SaeR-Regulons festzustellen. Der Einfluss des WalKR-Systems auf die Expression von Virulenzfaktoren ist demnach auf die Aktivierung des Sae-Systems zurückzuführen (Delauné *et al.* 2012). In *S. aureus* ist die Aktivität von Autolysinen auch mit der Biofilmbildung und der Freisetzung genomischer DNA assoziiert (Biswas *et al.* 2006; Ebner *et al.* 2017). In der vorliegenden Arbeit wurden für die Autolysine Atl und LytM verringerte Proteinmengen im Zellkulturüberstand der  $\Delta\rho$ -Mutante detektiert.

In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde untersucht, inwieweit die Lipasen Geh (oder SAL2) und Lip (oder SAL1) einen Einfluss auf die Menge extrazellulärer DNA in *S. aureus* haben (Nguyen *et al.* 2017). Für die Analyse wurden *S. aureus*-Stämme konstruiert, denen die Lipase-Gene fehlten

und anschließend die Menge an extrazellulärer DNA bestimmt sowie die Ausprägung der Biofilmbildung dieser Stämme untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Menge extrazellulärer DNA in den Mutanten signifikant abnahm und auch die Biofilmbildung deutlich geringer war im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sekretierte Lipasen die Integrität der zytoplasmatischen Membran beeinflussen können (Nguyen *et al.* 2017), wodurch DNA aus der Zelle gelangt. Die Lipase Geh wurde in dieser Arbeit in signifikant erhöhten Proteinmengen in der  $\Delta rho$ -Mutante in RPMI- und TSB-Medium detektiert (Tabelle 26). Daher könnte das Signal, welches zur Aktivierung des Sae-Systems in Abwesenheit von Rho führt, eine Änderung in der Membranstruktur infolge erhöhter Lipaseaktivität sein.

Zur Überprüfung dieser Hypothese müsste eine Deletion des Gens *geh* in der  $\Delta rho$ -Mutante erfolgen und anschließend analysiert werden, ob es in Abwesenheit der Lipase nicht zur Aktivierung des Sae-Systems kommt. Dabei könnten entweder Northern Blot-Analysen für einzelne Gene oder globale Analysen auf Transkriptom- und Proteomebene genutzt werden.

Zu den Proteinen, die in der  $\Delta rho$ -Mutante ebenfalls erhöhte Mengen aufwiesen, gehörten die *staphylococcal superantigen-like proteins* Ssl1-9 sowie Ssl11-14. Diese Erhöhung trat insbesondere während des Wachstums im RPMI-Medium auf, bei Ssl9, Ssl11 und Ssl13 jedoch auch im TSB-Medium. Die Ssls sind in die *immune evasion* von *S. aureus* involviert (Lewis & Surewaard 2018). Während für drei der kodierenden Gene (*ssl7*, *ssl9*, *ssl11*) gezeigt wurde, dass sie zum SaeR-Regulon gehören (Benson *et al.* 2012), ist die Regulation der anderen Gene nicht bekannt und müsste unter Verwendung einer *saeRS*-Mutante untersucht werden.

Unter den Proteinen, die erhöhte Proteinmengen in der  $\Delta rho$ -Mutante aufwiesen, zeigte das Protein SAOUHSC\_00622 in allen Bedingungen die stärksten Unterschiede zwischen dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258. SAOUHSC\_00622 kodiert für ein 74 Aminosäuren langes Protein mit unbekannter Funktion. Auch in der Studie von Mäder *et al.* (2016) wurde für dieses Gen eine signifikant höhere mRNA-Menge in der  $\Delta rho$ -Mutante gefunden. In dem Datensatz, der in einem Daten-abhängigen Analyseverfahren zur Erweiterung der Spektrenbibliothek generiert wurde, konnte dieses Protein in allen biologischen Replikaten im Wildtyp HG001, der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 sowie der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 pMKX mit dem Leerplasmid und dem Komplementationsstamm ST1258 pMKX::*rho* detektiert werden (Tabelle A8). In Abbildung 46 sind die mittleren Proteinintensitäten beispielhaft für die Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase im RPMI-Medium dargestellt. In der  $\Delta rho$ -Mutante und der Mutante mit Leerplasmid wurden im Vergleich zum Wildtyp ca. 10.000-fach höhere Intensitäten für dieses

Protein detektiert, während der Komplementationstamm eine deutlich niedrigere Intensität als die  $\Delta rho$ -Mutante zeigte.

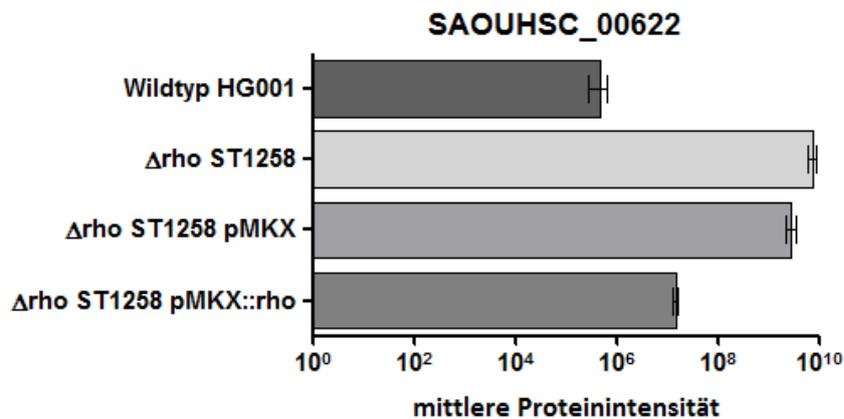


Abbildung 46 Mittlere Proteinintensität des Proteins SAOUHSC\_00622 in RPMI-Medium in der exponentiellen Wachstumsphase für die *S. aureus*-Stämme HG001, ST1258, ST1258 pMKX und ST1258 pMKX::rho dreier biologischer Replikate.

Zu den Proteinen, die in geringeren Mengen in der  $\Delta rho$ -Mutante detektiert wurden, gehört das *serine-aspartate repeat protein* SdrD (Verhältnis  $\leq 0,08$  in RPMI-Medium in der exponentiellen Wachstumsphase). Bei diesem handelt es sich um ein Zellwand-verankertes Adhäsion (Josefsson *et al.* 1998). In einer Studie von Kuroda *et al.* (2007) zur Identifizierung von SaeRS-abhängig regulierten Genen wurde gezeigt, dass die Expression von *sdrD* und *sdrE* nach Behandlung von *S. aureus* N315 mit Cefoxitin im Wildtyp, aber nicht in einer *saeRS*-Mutante abnahm. Dieser Befund legt nahe, dass die geringere SdrD-Proteinmenge in der  $\Delta rho$ -Mutante mit der Aktivierung des Sae-Systems verknüpft ist und unterstützt somit zusätzlich den Zusammenhang zwischen der Aktivität von Rho und der Aktivität des Sae-Systems.

Ebenfalls in signifikant verringerten Proteinmengen wurden die vier  $\alpha$ -PSMs, die zwei  $\beta$ -PSMs, das Protein A und EsxA in der  $\Delta rho$ -Mutante detektiert. Mit Ausnahme von *esxA* werden die kodierenden Gene durch das AgrAC Zweikomponentensystem reguliert (Novick & Geisinger 2008; Queck *et al.* 2008). Jedoch gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass durch die Aktivierung des SaeR-Regulons andere Regulatoren, wie Agr, SigB, SarA oder Rot in ihrer Expression oder Aktivität beeinflusst werden (Liu *et al.* 2016). Für die Gene *psm* $\beta$ 1 und *psm* $\beta$ 2 sowie *esxA* wurden in der Tiling Array-Analyse von Mäder *et al.* (2016) signifikant erhöhte Transkriptlevel auf dem Gegenstrang der kodierenden Gene detektiert. Im Fall von *esxA* konnte dabei auch ein Effekt auf die mRNA-Level verzeichnet werden, die im Wildtyp deutlich geringer als in der  $\Delta rho$ -Mutante waren (Mäder *et al.* 2016). Die *psm* $\alpha$ -Gene und *spa* zeigten keine erhöhten *Antisense*-Transkriptlevel in der Tiling Array-Studie.

In der Untersuchung des zellulären und extrazellulären Proteoms der *S. aureus*  $\Delta rho$ -Mutante konnte gezeigt werden, dass es in Abwesenheit von Rho zu einer Aktivierung des SaeRS-Zweikomponentensystems in *S. aureus* kommt. Diese Aktivierung ist mit erhöhten Mengen an SaeRS-abhängigen Virulenzfaktoren verbunden. Im Zuge der Aktivierung des Sae-Systems wird auch die Expression von anderen Proteinen, wie z. B. SdrD beeinflusst. Die Ergebnisse der Proteomanalyse konnten die Ergebnisse der Tiling Array-Studie von Mäder *et al.* (2016) bestätigen, und es wurden die erhöhten Mengen an sekretierten Virulenzfaktoren im extrazellulären Proteom der  $\Delta rho$ -Mutante direkt nachgewiesen. Es konnten außerdem Hinweise dafür gefunden werden, dass die erhöhte *Antisense*-Transkription in der  $\Delta rho$ -Mutante auch einen Einfluss auf die Proteinmengen hat, entweder durch Verringerung der *Sense*-Transkriptmenge oder eine mögliche Interferenz der asRNA mit der mRNA des spezifischen Gens, was zur Hemmung der Translation führen kann.

## 5.2 Der Einfluss von Rho auf das Infektionsverhalten von *S. aureus* in verschiedenen Infektionsmodellen

Die Proteomanalysen von *in vitro*-Kulturen des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 zeigten signifikante Unterschiede in der Menge SaeRS-abhängiger Virulenzfaktoren im Kulturüberstand. Es kann davon ausgegangen werden, dass die verstärkte Synthese von Virulenzfaktoren einen Einfluss auf das Infektionsverhalten der  $\Delta rho$ -Mutante hat.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein *in vivo*-Infektionsexperiment durch Dr. Tobias Hertlein in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Knut Ohlsen an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt. Hierbei wurde ein murines Bakteriämie-Modell verwendet und die Mäuse mit dem *S. aureus* Wildtyp HG001, der isogenen  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 oder dem Rho-komplementierten Stamm ST1258 pMKX::*rho* infiziert. Eine Inaktivierung von Rho führte dabei zu einer signifikant erhöhten Virulenz von *S. aureus*, welche sich in einer reduzierten Überlebensrate der Mäuse äußerte (Abbildung 26). Diese Beobachtung stimmt mit einer früheren Studie überein, in der ein *S. aureus* USA300 LAC-Stamm, der eine konstitutiv aktive Form des SaeS-Proteins besitzt, ebenfalls eine gesteigerte Virulenz in einem murinen Bakteriämie-Modell zeigte (Beenken *et al.* 2014). Im *S. aureus* Newman-Stamm, der eine Variante von *saeS* besitzt, die zu einer starken konstitutiven Kinaseaktivität und damit zu einer erhöhten Expression von SaeRS-abhängigen Virulenzfaktoren unter nicht-induzierten Bedingungen führt (Mainiero *et al.* 2010). Das SaeS-Protein von *S. aureus* Newman besitzt einen Einzelaminosäureaustausch in der ersten Transmembranschleife. Eine andere Studie von Liang *et al.* (2006) konnte zeigen, dass die Infektion mit einer *S. aureus saeS*-Mutante zu einer verringerten Virulenz bei Mäusen führt. Dabei wurde ein murines Modell hämatogener Pyelonephritis genutzt und die Mäuse mit dem *S. aureus*-Stamm WCUH29, bei dem es sich um ein klinisches Isolat handelt, sowie einer entsprechenden *saeS*-Mutante infiziert. Drei Tage nach Infektion wurde die Zahl der in der Niere angereicherten *S. aureus*-Zellen bestimmt. Die Mäuse, die mit der *saeS*-Mutante infiziert wurden, zeigten dabei eine reduzierte Bakterienzahl (um ca. 30 %) in den Nieren im Vergleich zum Wildtyp-Stamm WCUH29.

In zahlreichen Studien wurde beschrieben, dass SaeRS-abhängige Virulenzfaktoren eine wichtige Rolle bei Infektionen der Blutbahn mit *S. aureus* spielen (Thomer *et al.* 2016). Dabei wird beispielsweise die Koagulation durch die Interaktion des Proteins Coa mit Prothrombin aktiviert, wodurch es zur Ausbildung von Fibrin-Gerinnseln kommt. Zur Auflösung dieser Fibrin-Gerinnsel werden vom Wirt spezifische Proteasen, wie Plasmin, gebildet. Diese werden jedoch von der Staphylokinase Sak inhibiert, wobei Sak spezifisch Plasmin bindet und das aktive Zentrum des

Proteins blockiert (Parry *et al.* 1998). Die Gene *sak*, *scn* und *chp* gehören zu einem *immune evasion* Gen-Cluster (van Wamel *et al.* 2006).

Andere SaeRS-abhängige Virulenzfaktoren helfen *S. aureus*, die Chemotaxis von Immunzellen bzw. die Aktivierung des Komplement-Systems zu beeinflussen und damit der Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen zu entgehen (Spaan *et al.* 2013). Hierbei spielt unter anderem das Protein Eap eine wichtige Rolle, welches die Interaktion von Neutrophilen mit Endothelzellen durch die Bindung von ICAM-1 verhindert (Chavakis *et al.* 2002). Das Protein CHIPS interferiert mit der Chemotaxis von Neutrophilen (Haas *et al.* 2005), während SCIN durch Blockade der Komplement-Kaskade die Phagozytose verhindert (Rooijackers *et al.* 2009).

Ebenfalls wichtig bei *S. aureus* Infektionen sind die sogenannten MSCRAMM-Proteine (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), die die Adhäsion an Wirtszellen vermitteln (Foster *et al.* 2014). Hierzu gehören unter anderem die SaeRS-abhängigen Proteine FnbAB, welche entscheidend für die Anheftung von *S. aureus* an Endothelzellen und die damit verbundene Invasion in die Wirtszellen sind (Peacock *et al.* 1999; Kerdudou *et al.* 2006). Zusätzlich wird die Endothelbarriere durch das Protein Hla geschädigt (Powers *et al.* 2012).

Darüber hinaus sind das Protein Eap und die *fibronectin-binding proteins* FnbA und FnbB wichtig für die Invasion von *S. aureus* in nicht-professionell phagozytierende Zellen, wie Epithel- und Endothelzellen sind (Sinha & Fraunholz 2010).

Da eine Studie außerdem gezeigt hatte, dass die Inaktivierung des Sae-Systems die Invasion von *S. aureus* in Lungenepithelzellen beeinträchtigt (Sinha & Fraunholz 2010; Liang *et al.* 2006), wurde anschließend das Infektionsverhalten des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 in *in vitro*-Infektionsexperimenten untersucht. Dabei sollte zunächst das Überleben der *S. aureus*-Zellen in humanen Lungenepithelzellen untersucht werden. Für die Versuche wurden 16HBE14o- Zellen verwendet, die ein differenziertes polarisiertes Epithelium ausbilden (Forbes *et al.* 2003). Es handelt sich dabei um eine Zelllinie, die vielfach zur Analyse der Absorptionseffizienz von inhalativen Medikamenten durch das Lungenepithel (Forbes & Ehrhardt 2005) genutzt wird. Jedoch gibt es auch Studien, die die Infektion mit zahlreichen Erregern des respiratorischen Trakts untersucht haben, wie zum Beispiel *S. aureus* (Richter *et al.* 2016), *Haemophilus influenzae* (Hartwig *et al.* 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (Buyck *et al.* 2013) oder *Neisseria meningitidis* (Vianzon *et al.* 2017).

Die Ergebnisse des hier durchgeführten Infektionsexperiments zeigen, dass keine Unterschiede in der Zahl lebender oder toter 16HBE14o- Zellen nach Infektion mit dem Wildtyp-Stamm und der  $\Delta\rho$ -Mutante festgestellt werden konnten. Die Zahl der toten 16HBE14o- Zellen nahm wie

erwartet im Verlauf der Infektion zu, jedoch gleichermaßen für beide *S. aureus*-Stämme. Auch die Zahl der intrazellulären Bakterien stieg wie erwartet bis 8,5 h p. i. stark an und sank 24 h und 48 h p. i. deutlich ab. Es konnte auch kein signifikanter Unterschied in der Bakterienzahl zwischen der  $\Delta rho$ -Mutante und dem Wildtyp nach Infektion von 16HBE14o- Zellen festgestellt werden.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen unterstützen die Ergebnisse der Bakterienzahl-Bestimmung mit dem Guava® easyCyte Durchflusszytometer. Auch hier konnte eine Zunahme der Zahl intrazellulärer Bakterien in den humanen Epithelzellen beobachtet werden. Zudem verdeutlichen die Aufnahmen, dass die Zahl der intrazellulären Bakterien stark variiert. Diese Variation der Bakterienzahl in einer infizierten humanen Epithelzelle konnte auch in der Arbeit von Pförtner *et al.* (2014) gezeigt werden. Ein Vergleich der intrazellulären Bakterienzahl pro infizierter Wirtszelle des Wildtyps und der  $\Delta rho$ -Mutante ist mit den vorliegenden Aufnahmen nur bedingt möglich. Ein Großteil der humanen Zellen lag in verschiedenen Fokusebenen, wodurch eine exakte Bestimmung der Zahl intrazellulärer Bakterien erschwert wird. Für eine solche Analyse müsste konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie verwendet werden. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie bietet den Vorteil, dass ein fokussierter Laserstrahl das Präparat abrastert sowohl in waagrecht und senkrechter Ausrichtung, sodass ein dreidimensionales Bild aus mehreren Fokusebenen erstellt wird. Auf diese Weise wird die quantitative Auswertung der Daten verbessert.

Bei der Infektion von 16HBE14o- Zellen konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 festgestellt werden. Da auch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen keine Hinweise auf einen Unterschied im Replikationsverhalten der Bakterien lieferten, wurden keine weiteren biologischen Replikate untersucht.

Um mögliche Unterschiede in der Internalisierungsrate und dem Replikationsverhalten beider Stämme besser erfassen zu können, wurde anschließend ein Infektionsexperiment mit A549-Zellen durchgeführt, bei dem Bakterien eingesetzt wurden, die ein Plasmid mit dem *gfp*-Gen trugen. Durch die Fluoreszenzmarkierung der Bakterien ist es möglich, zwischen infizierten und nicht-infizierten humanen Epithelzellen mittels Durchflusszytometrie zu unterscheiden.

Die Fluoreszenzmarkierung sollte möglichst geringe Auswirkungen auf die Zellphysiologie haben, da sonst mögliche Unterschiede im Infektionsverhalten zwischen dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 neben der fehlenden Rho-Aktivität auch auf andere Faktoren zurückzuführen sein könnten. Aus diesem Grund wurde eine entsprechende Sequenzoptimierung des *gfp*-Gens vorgenommen.

Um einen möglichen Einfluss der konstitutiven *gfp*-Expression zu untersuchen, wurde zunächst das Wachstumsverhalten des *S. aureus* Wildtyps HG001, des Wildtyps mit Leerplasmid (pJL-sar) und des Wildtyps mit Plasmiden, die drei verschiedene *gfp*-Varianten (Tabelle 5) trugen, in pMEM- und TSB-Medium untersucht. Im chemisch definierten pMEM-Medium konnten keine Wachstumsunterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden, mit Ausnahme des Stammes, der das Plasmid pJL-sar-GFP mit einer nicht Codon-optimierte *gfp*-Variante trug (Abb 30A). Dieser Stamm wies ein geringfügig reduziertes Wachstum sowie eine geringere maximale optische Dichte auf. Im Vollmedium TSB konnten hingegen keine Unterschiede im Wachstum zwischen dem Wildtyp ohne Plasmid und mit dem Leerplasmid sowie den Derivaten mit verschiedenen *gfp*-Varianten festgestellt werden (Abbildung 30B).

Dies zeigt, dass die nicht Codon-optimierte Sequenz des *gfp*-Gens bereits einen Einfluss auf das Wachstum von *S. aureus* HG001 hat. Dieser Einfluss ist jedoch nur im chemisch definiertem Medium und nicht im Vollmedium detektierbar.

Die Expressionsstärke von Genen hängt von vielen Faktoren, wie der Promotorsequenz und regulatorischen Elementen, ab. Außerdem spielt die Codon-Nutzung eine wichtige Rolle (Lithwick & Margalit 2003). Eine optimale Translation ist nur durch die Nutzung von Codonen gewährleistet, die von den am häufigsten vorkommenden tRNA-Spezies erkannt werden (Rocha 2004). Wenn in einer Gensequenz Codons vorhanden sind, die im Organismus nur selten vorkommen, wird eine effiziente Translation des Gens verhindert, und insbesondere bei schnell wachsenden Bakterien findet man eine ausgeprägte Präferenz für bestimmte Codons (Sharp *et al.* 2005).

Eine vom Zielorganismus abweichende Codon-Nutzung kann bei einem stark exprimierten Fremdgen zu einem vermehrten Auftreten von unbeladenen tRNAs führen, welche ein intrazelluläres Signal für Aminosäurelimitation darstellen und zur Induktion der *stringent response* führen. Im Zuge der *stringent response* nimmt die zelluläre GTP-Konzentration ab und es kommt zur Derepression des CodY-Regulons (Geiger *et al.* 2010). Aus diesem Grund wurde neben der phänotypischen Charakterisierung der Stämme mit den verschiedenen *gfp*-Varianten mittels Northern Blot-Analysen die Expression der CodY-abhängigen Gene *butA*, *serA* und SAOUHSC\_02888 in pMEM-Medium untersucht. Diese Gene sind an der Synthese von Aminosäuren, aber auch an vielen anderen zellulären Prozessen beteiligt. Viele CodY-abhängige Gene von *S. aureus* sind in die Anpassung an Nährstofflimitationen involviert, wozu insbesondere Gene gehören, die für Aminosäuresynthese-Enzyme kodieren (Majerczyk *et al.* 2010).

Die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse zeigen, dass die Sequenz des *gfp*-Gens einen Einfluss auf die Expression CodY-abhängiger Gene hat. Die Expression dieser Gene war im *S. aureus* Stamm HG001 pJL-sar-GFP erhöht (Abbildung 33). Bei dieser *gfp*-Variante handelt es sich um eine nicht

an die spezifische Codon-Nutzung von *S. aureus* HG001 angepasste Variante. In den *S. aureus*-Stämmen mit dem Leerplasmid sowie den zwei verschiedenen sequenzoptimierten *gfp*-Varianten auf dem Plasmid wurde kein Transkript (*serA* & SAOUHSC\_02888) bzw. eine gegenüber dem *S. aureus*-Stamm ohne Plasmid nicht veränderte niedrige Transkriptmenge (*butA*) detektiert.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die nicht Codon-optimierte Variante des *gfp*-Gens zu einer Induktion von CodY-abhängigen Genen führt.

Die *gfp*-Sequenz im Plasmid pJL-sar-GFP von Liese *et al.* (2013) entspricht der ursprünglichen Sequenz des *gfp*-Gens von *Aequorea victoria* (Charpentier *et al.* 2004). In der von Dr. Henrike Pförtner optimierten *gfp*-Variante wurde die Gensequenz an die Codon-Nutzung von *S. aureus* angepasst. In diesem Schritt wurden jedoch die tatsächlich kodierten tRNAs des Organismus nicht berücksichtigt. Dies erfolgte in der Sequenzanpassung durch Dr. Alexander Reder, wodurch das Plasmid pJL-sar-GFPredopt entstand. Die Häufigkeit der Nutzung von Codons und der tatsächlich kodierten tRNAs ist für den jeweiligen Organismus sehr spezifisch. Es wurde für verschiedene Organismen gezeigt, dass die maximale Zahl an verschiedenen tRNAs deutlich kleiner als die Zahl der kodierenden Triplets (61) ist und im Durchschnitt nur 37 beträgt (Rocha 2004). Bakterienspezies, die ein schnelles Wachstum aufweisen, besitzen zwar mehr tRNA-Gene, aber weniger verschiedene tRNAs als langsam wachsende Bakterien (Rocha 2004).

Die Untersuchung der Stabilität des in dieser Arbeit konstruierten Plasmids pJL-sar-GFPredopt im *S. aureus* Wildtyp HG001 erfolgte über sieben Tage in TSB-Medium ohne Zugabe von Antibiotika (Abbildung 31). Dabei zeigte sich in der FACS-Analyse, dass nur ein geringer Teil (5-13 %) der Bakterien keine Fluoreszenz aufwies. Mit Hilfe der FACS-Analyse konnte jedoch nicht zwischen lebenden und toten *S. aureus* Bakterien unterschieden werden, sodass keine Aussage getroffen werden konnte, ob diese Bakterien tatsächlich alle das Plasmid verloren hatten. Aus diesem Grund wurden die Bakterien zusätzlich alle 24 h über einen Zeitraum von sieben Tagen auf TSB-Agarplatten ohne Antibiotikum ausplattiert und anschließend die Fluoreszenz der Kolonien analysiert (Abbildung 31). Nur 1-2 % der Kolonien wiesen kein Fluoreszenzsignal auf (Abbildung 32). In der Dissertation von Henrike Pförtner wurde die Stabilität des Plasmids pJL-sar-CFPopt über einen Zeitraum von 50 h untersucht. Auch in dieser Analyse wiesen 99 % der Zellen ein Fluoreszenzsignal auf.

Für die Infektion von A549-Epithelzellen wurden daraufhin der Wildtyp HG001 und die  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 mit dem Plasmid pJL-sar-GFPredopt genutzt. Im Vergleich zur Infektion von 16HBE14o- Zellen wurden frühere Zeitpunkte nach Infektion von A549-Zellen untersucht und

häufiger Proben genommen, um den zeitlichen Verlauf der Infektion besser auflösen zu können und das Internalisierungs- bzw. Replikationsverhalten zu analysieren. Ein weiterer Unterschied zum Infektionsexperiment mit 16HBE14o- Zellen bestand in der Probennahme. Bei der Infektion der 16HBE14o- Zellen wurde die Zahl der Wirts- und *S. aureus*-Zellen aus verschiedenen Wells bestimmt. Im Experiment mit den A549-Zellen sollte ein Vergleich der ermittelten Zellzahlen erfolgen. Deshalb wurden Proben zur Bestimmung der Zahl bakterieller und humaner Zellen aus einem Well entnommen. Eine Unterscheidung zwischen infizierten (fluoreszierenden) und nicht-infizierten Wirtszellen erfolgte mit dem Guava® easyCyte Durchflusszytometer.

Die Analyse der humanen A549-Epithelzellen nach Infektion mit den *S. aureus*-Stämmen zeigte 1,5 h p. i. eine Internalisierungsrate von etwa 70 % für beide Stämme. Lediglich 30 % der Epithelzellen wiesen keine Fluoreszenzsignale auf (Abbildung 34). Die Zahl der GFP-positiven humanen Zellen nahm im Verlauf der Infektion ebenso wie die der GFP-negativen Zellen ab. Zu späteren Zeitpunkten (9,5 h & 10,5 h p. i.) stagnierte die Zahl der infizierten Zellen, wohingegen eine weitere Abnahme der Zahl der nicht-infizierten Epithelzellen zu verzeichnen war. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zahl infizierter und nicht-Infizierter A549-Epithelzellen nach Infektion mit dem Wildtyp und der  $\Delta rho$ -Mutante detektiert werden.

Die Replikation der Bakterien in den Wirtszellen führt zu deren Lyse. Die gleichzeitige Abnahme der Zahl nicht-infizierter Epithelzellen deutet darauf hin, dass die dabei freiwerdenden lytischen Toxine, wie z. B.  $\alpha$ -Hämolysin Hla, möglicherweise auch einen Einfluss auf die nicht-infizierten Zellen haben. Ein solcher Effekt von Hla auf Epithelzellen wurde in einer Studie von R ath *et al.* (2013) untersucht. Dabei wurde rekombinant hergestelltes Hla von *S. aureus* zur Stimulation von 16HBE14o-, S9- und A549-Zellen genutzt und die Menge an produzierten Chemo- und Cytokinen untersucht. Durch die Zugabe von rekombinatem Hla konnte eine signifikant höhere Menge an Interleukin 6 und 8 im Zellkulturüberstand von 16HBE14o- und S9-Zellen sowie Interleukin 8 für A549-Zellen nachgewiesen werden.

Nach 24 h war die Zahl der infizierten A549-Zellen, vermutlich durch deren Lyse, stark gesunken und im Gegensatz dazu ein Anstieg der nicht-infizierten Zellen zu beobachten, der darauf zurückzuführen ist, dass nicht-infizierte Zellen nach 24 h erneut mit der Proliferation beginnen, da durch die Anwesenheit von Lysostaphin im Zellkulturmedium eine Reinfektion der Zellen verhindert wird (Kumar 2008; Schindler & Schuhardt 1964).

Die hohe Internalisierungsrate von ca. 70 % infizierter Epithelzellen steht im Widerspruch zu den Ergebnissen einer Studie von Surmann *et al.* (2015), in der A549-Epithelzellen mit *S. aureus* HG001 pMV158GFP infiziert und das Proteom von Bakterien und Wirtszellen untersucht wurden.

Zusätzlich wurden 2,5 h, 4,5 h und 6,5 h p. i. mittels Transmissionselektronmikroskopie die Zahl intrazellulärer *S. aureus*-Zellen bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass ca. 15 % der Epithelzellen mit Bakterien infiziert wurden, wobei die Zahl der Bakterien in einer Wirtszelle stark zwischen den infizierten Wirtszellen schwankt. Der Versuchsaufbau der Studie von Surmann *et al.* (2015) entsprach dem in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsexperiment. Unterschiede gab es in dem in *S. aureus* HG001 genutzten Plasmid zur Expression des GFPs sowie in der Größe der Zellkulturplatten und der Menge an FCS im eMEM-Medium, mit dem die A549-Zellen kultiviert wurden. In der Studie wurden Ø 10 cm Zellkulturschalen und eMEM-Medium mit 4 % FCS verwendet, während in dieser Arbeit 6-Well-Platten genutzt wurden und eMEM-Medium mit 10 % FCS supplementiert wurde. Der Einfluss der Menge an FCS im Zellkulturmedium und der Größe der Zellkulturschale auf die Internalisierungsrate wurde daraufhin in einem Infektionsexperiment mit A549-Zellen und dem Wildtyp HG001 pJL-sar-GFPredopt untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der FCS-Anteil im Medium keinen Einfluss auf die Internalisierungsrate von *S. aureus*-Zellen auf humane Lungenepithelzellen hat. Die niedrigere Infektionsrate der Studie von Surmann *et al.* (2015) konnten in 10 cm Zellkulturschalen reproduziert werden. Als mögliche Ursache für die höhere Internalisierungsrate in 6-Well- und 12-Well-Platten konnte die Zelldichte identifiziert werden, da in diesen Platten eine größere Zahl von A549-Zellen pro Fläche ermittelt wurde als in 10 cm-Schalen. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste getestet werden, ob die Zahl von A549-Zellen in einer 10 cm-Schale erhöht werden kann und dies dann tatsächlich zu einer gesteigerten Internalisierungsrate führt.

Bei der Infektion von A549-Zellen mit dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 wurde die Zahl der intrazellulären Bakterien mit dem Guava® easyCyte Durchflusszytometer bestimmt. Im Verlauf der Infektion stieg die Zahl der intrazellulären Bakterien stark an und erreichte nach 7,5 h den Maximalwert. Bis 10,5 h p. i. ändert sich die Zahl der Bakterien kaum und nahm anschließend bis 24,5 h p. i. stark ab. In der Anzahl intrazellulärer *S. aureus*-Zellen konnte kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta\rho$ -Mutante detektiert werden.

In einer Arbeit von Liang *et al.* (2006) konnte gezeigt werden, dass SaeRS-abhängige Virulenzfaktoren wichtig für die Internalisierung von *S. aureus* in A549-Zellen sind. Dabei wurden der *S. aureus*-Stamm WCUH29, bei dem es sich um ein klinisches Isolat handelt, sowie eine entsprechende *saeS*-Mutante untersucht. Nach Infektion von A549-Zellen mit beiden *S. aureus*-Stämmen wurde die relative Invasionsrate bestimmt. Dabei konnte eine signifikant reduzierte Zahl internalisierter *S. aureus*-Zellen ( $\leq 10\%$ ) beim *saeS*-defizienten Stamm im Vergleich zum WCUH29-Wildtyp festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Münzenmayer

*et al.* (2016). In dieser Arbeit wurden THP-1- und HeLa-Zellen mit einem *S. aureus* USA300-Stamm bzw. einer *saePQRS*-Mutante infiziert und das intrazelluläre Überleben der *S. aureus*-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion untersucht. Die Zahl intrazellulärer *S. aureus*-Zellen unmittelbar nach Infektion von THP-1-Zellen zeigte dabei eine zweifach höhere Zahl intrazellulärer Bakterien im Wildtyp USA300-Stamm im Vergleich zur *saePQRS*-Mutante. Es konnte außerdem eine stärkere Replikation der *S. aureus*-Zellen, die eine Deletion des *saePQRS*-Operons aufwies, in den THP-1-Zellen 3 h und 24 h p. i. nachgewiesen werden. Im Infektionsexperiment mit HeLa-Zellen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Zahl intrazellulärer *S. aureus*-Zellen beider Stämme nachgewiesen werden.

In dem in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsexperiment mit dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante wäre, aufgrund der erhöhten Mengen SaeRS-abhängiger Virulenzfaktoren in der  $\Delta\rho$ -Mutante eine erhöhte Internalisierungsrate zu erwarten gewesen. Jedoch konnte ein solcher Unterschied zwischen den beiden *S. aureus*-Stämmen nicht detektiert werden. Wie die Daten von Münzenmayer *et al.* (2016) demonstrieren, kann die Verwendung verschiedener Zelllinien zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Effizienz der Internalisierung und der anschließenden Überlebensrate der *S. aureus*-Zellen führen. Ebenfalls wurde von Münzenmayer *et al.* (2016) gezeigt, dass bestimmte SaeRS-abhängige Proteine, wie die Leukozidine LukAB (auch als LukGH bezeichnet) oder das Pantone-Valentine Leukozidin PVL für die Lyse von Wirtszellen verantwortlich sind, wodurch die stärkere intrazelluläre Replikation der *saePQRS*-Mutante erklärt werden kann. Der in dieser Arbeit verwendete *S. aureus*-Stamm HG001 besitzt zwar die *lukGH*-Gene, jedoch nicht die *pvl*-Gene. Die unterschiedliche genetische Ausstattung verschiedener *S. aureus*-Stämme könnte auch die mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht übereinstimmenden Ergebnisse von Liang *et al.* (2006) erklären, in deren Studie ein klinisches Isolat (WCUH29) für die Analyse des Einflusses SaeRS-abhängiger Virulenzfaktoren auf die Internalisierung von *S. aureus* in A549-Zellen verwendet wurde.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von Rho zu einer signifikant erhöhten Virulenz von *S. aureus* bei Mäusen und einer damit verbundenen reduzierten Überlebensrate führt. In *in vitro*-Infektionsexperimenten mit humanen Lungenepithelzellen konnten jedoch keine Unterschiede in der Internalisierungsrate und dem Replikationsverhalten zwischen dem Wildtyp HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 beobachtet werden.

### 5.3 Die Effekte von Bicyclomycin auf die Expression von SaeRS-abhängigen Genen und *Antisense*-Transkription in *S. aureus*

Das Antibiotikum Bicyclomycin (BCM) ist ein spezifischer Inhibitor des Transkriptionsterminationsfaktor Rho. Die Hemmung der Rho-Aktivität erfolgt über die Bindung von BCM an Rho und die damit verbundene Interferenz mit der Bewegung von Rho entlang der RNA (Zwiefka *et al.* 1993; Kohn & Widger 2005). Da Rho in Gram-negativen Bakterien essentiell ist (Das *et al.* 1976), wurde BCM in Studien zur Untersuchung der Rho-abhängigen Transkriptionstermination in diesen Bakterien genutzt. Diese Studien trugen zur Aufklärung der physiologischen Rolle von Rho in *E. coli* bei. Hierzu zählen unter anderem das *Silencing* von horizontal erworbenen Genen (Cardinale *et al.* 2008), die Verhinderung von DNA-Doppelstrangbrüchen (Washburn & Gottesman 2011) und die Unterdrückung der *Antisense*-Transkription (Peters *et al.* 2012).

Da Rho in den meisten Gram-positiven Bakterien nicht essentiell ist, hat auch der Einsatz von BCM keinen Einfluss auf das Wachstum dieser Bakterien. In der Studie von Washburn *et al.* (2001) wurde die minimal inhibierende Konzentration (MIC) von BCM für den *S. aureus*-Stamm RN4220 bestimmt, wobei diese bei mehr als 2,5 mg/ml BCM lag. In der vorliegenden Arbeit wurde auf der Grundlage der Studie von Ederth *et al.* (2006) zunächst eine Konzentration von 20 µg/ml BCM genutzt, um Effekte auf die Transkription von SaeRS-abhängigen Genen und asRNAs zu untersuchen. Bei *E. coli* zeigte diese Konzentration einen deutlichen Effekt auf das Transkriptom, beeinflusste jedoch das Wachstum der Bakterien nicht (Ederth *et al.* 2006). Auch die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen von 20, 40 und 80 µg/ml BCM hatten keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. aureus*. Die Northern Blot-Analyse der SaeRS-abhängigen Gene *saeP*, *coa* und *chp* zeigte, dass nach Behandlung des HG001-Wildtyps mit 20 oder 40 µg/ml BCM die mRNA-Menge aller drei Gene zunahm. Während bei *saeP* und *coa* keine Unterschiede zwischen 20 und 40 µg/ml BCM auftraten, war bei *chp* eine deutliche dosisabhängige Expression zu verzeichnen (Abbildung 39). Die Northern-Blot-Analyse der asRNA S597 zeigte, dass 40 µg/ml BCM einen Effekt auf die *Antisense*-Transkription im *S. aureus*-Wildtyp haben, der jedoch bei Behandlung mit 80 µg/ml BCM deutlich stärker war (Abbildung 40). Durch die Northern Blot-Analysen in dieser Arbeit konnten die dosisabhängigen Effekte der BCM-Behandlung des Wildtyps und die damit verbundene erhöhte Expression von SaeRS-abhängigen Genen und einer asRNA in BCM-behandelten Wildtyp-Zellen gezeigt werden. Zudem konnten für das Gen *chp* in der  $\Delta\rho$ -Mutante neben der erhöhten Expression des Gens zusätzliche längere Transkripte detektiert werden, die darauf zurückzuführen sind, dass in Abwesenheit von Rho nur eine partielle Termination der Transkription von *chp* stattfindet. Die Verlängerung dieses Transkripts in der  $\Delta\rho$ -Mutante zeigte

sich auch in der Tiling Array-Analyse von Mäder *et al.* (2016). Auch nach der Behandlung mit BCM konnten einige dieser zusätzlichen Banden im Wildtyp im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp detektiert werden (Abbildung 39). Auf der Grundlage der Ergebnisse der Northern Blot-Analysen wurden Microarray-Analysen und Untersuchungen des extrazellulären Proteoms des Wildtyps HG001 nach Zugabe von 40 bzw. 80 µg/ml BCM im Vergleich zur  $\Delta rho$ -Mutante durchgeführt.

In Studien zur genomweiten Analyse des Einflusses des Transkriptionsterminationsfaktors Rho in *E. coli*, *B. subtilis* und *S. aureus* konnte festgestellt werden, dass Rho eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung von *Antisense*-Transkription spielt (Peters *et al.* 2012; Nicolas *et al.* 2012; Mäder *et al.* 2016; Bidnenko *et al.* 2017). In der Analyse von Mäder *et al.* (2016) konnten 26 asRNAs identifiziert werden, die erhöhte Mengen in der *S. aureus*  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 im Vergleich zum Wildtyp HG001 aufwiesen. Von diesen 26 asRNAs waren 21 asRNAs auf dem in dieser Arbeit verwendeten Microarray abgebildet. Die Analyse der Mengen dieser asRNAs zeigte wie erwartet eine dosisabhängige Zunahme nach Behandlung des Wildtyps mit 40 bzw. 80 µg/ml BCM (Abbildung 42). Für die Mehrzahl der asRNAs konnte mit 80 µg/ml BCM eine erhöhte Expression im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp (Verhältnis  $\geq 1,5$ ) verzeichnet werden. Diese Daten zeigen erstmals, dass die Behandlung von *S. aureus* mit dem Antibiotikum BCM zur Inhibition des Transkriptionsterminationsfaktors Rho und damit zu vermehrter *Antisense*-Transkription führt.

In den durchgeführten Transkriptom- und Proteomanalysen des *S. aureus* Wildtyps HG001 mit und ohne Zugabe von BCM sowie der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 konnten die Ergebnisse der vorangegangenen Proteomanalysen des Wildtyps und der  $\Delta rho$ -Mutante bestätigt werden. Neben erhöhten Mengen von SaeRS-abhängigen Virulenzfaktoren in der  $\Delta rho$ -Mutante zählte hierzu unter anderem die sehr starke Expression des Gens SAOUHSC\_00622, welches für ein 74 Aminosäuren langes Protein mit unbekannter Funktion kodiert, in der  $\Delta rho$ -Mutante. Überraschenderweise hatte die Zugabe von BCM keinen bzw. einen nur sehr geringen Einfluss auf die Expression von SAOUHSC\_00622

Tabelle 35 Verhältnis der mittleren Expressionswerte und Proteinintensitäten zwischen  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 und Wildtyp HG001 sowie zwischen Wildtyp nach Zugabe von BCM und unbehandeltem Wildtyp für SAOUHSC\_00622. Die Kultivierung erfolgte im RPMI-Medium, die Probenahme in der frühen exponentiellen Wachstumsphase und der exponentiellen Wachstumsphase.

	$\Delta rho$ /WT frühe exp	WT + BCM/WT 40 µg BCM	WT + BCM/WT 80 µg BCM	$\Delta rho$ /WT exp
Expressionswerte	194,32	1,30	2,14	138,84
Proteinintensität	290,78	-	1,01	163,69

Diese Daten zeigen, dass die Expression des Gens SAOUHSC\_00622 nur bei Abwesenheit von Rho stark induziert ist. Die Inhibition der Rho-Aktivität führt hingegen zu keiner signifikant erhöhten Proteinmenge in behandelten Wildtyp-Zellen. Die stark erhöhten Proteinmengen von SAOUHSC\_00622, die bei Fehlen des Rho-Proteins auftreten, deuten darauf hin, dass Rho neben seiner Funktion als Transkriptionsterminationsfaktor eine weitere spezifische zelluläre Funktion in *S. aureus* haben könnte.

Im Gegensatz dazu konnte die stark verringerte Expression des Gens *sdrD* in der  $\Delta rho$ -Mutante, auch nach Zugabe von BCM sowohl durch die Microarray-Daten als auch in der Proteomanalyse bestätigt werden. Die Unterschiede sind im Wildtyp mit und ohne Zugabe von BCM geringer als zwischen  $\Delta rho$ -Mutante und Wildtyp. Ähnliches gilt für die *staphylococcal superantigen-like proteins* Ssls, die im RPMI-Medium stark erhöhte Transkript- und Proteinmengen in der  $\Delta rho$ -Mutante und im BCM-behandelten Wildtyp aufweisen. In den Microarray-Daten ließ sich auch hier ein dosisabhängiger Effekt feststellen.

Die stark erhöhten Mengen von Fur-abhängigen Proteinen nach der Behandlung mit BCM, die in der  $\Delta rho$ -Mutante nicht beobachtet wurden, waren jedoch ein neuer Befund dieser Analyse. In der Genexpressionsanalyse konnten ebenfalls keine erhöhten mRNA-Level dieser Gene im Wildtyp nach Zugabe von BCM detektiert werden, was auf einen Effekt von BCM auf die Expression des Fur-Regulons hingewiesen hätte. Es scheint sich demnach hier um eine artifizielle Anreicherung dieser Proteine in der Kombination von BCM und StrataClean™ Resin *Beads* zu handeln. Die StrataClean™ Resin *Beads* wurden in dieser Analyse anstelle der TCA-Fällung genutzt, da die Menge der Kulturüberstände limitiert war. Die Anreicherung der Proteine erfolgt dabei über eine Interaktion von Hydroxylgruppen mit den *Beads* (Bonn *et al.* 2014).

Einer der wichtigsten Befunde der Transkriptomanalysen von Mäder *et al.* (2016) und der in dieser Arbeit durchgeführten Proteomanalyse waren die erhöhten Mengen von SaeRS-abhängigen Virulenzfaktoren in der *S. aureus*  $\Delta rho$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Auch in dieser Analyse wiesen die SaeRS-abhängigen Gene und Proteine stark erhöhte Mengen auf, sowohl in der  $\Delta rho$ -Mutante als auch nach Behandlung des Wildtyps mit BCM (Abbildung 47). Während in der Proteomanalyse nur Proben des Wildtyps nach Behandlung mit 80 µg/ml BCM untersucht wurden, konnte in der Microarray-Analyse auch ein dosisabhängiger Effekt von BCM auf die Expression dieser Gene nachgewiesen werden.

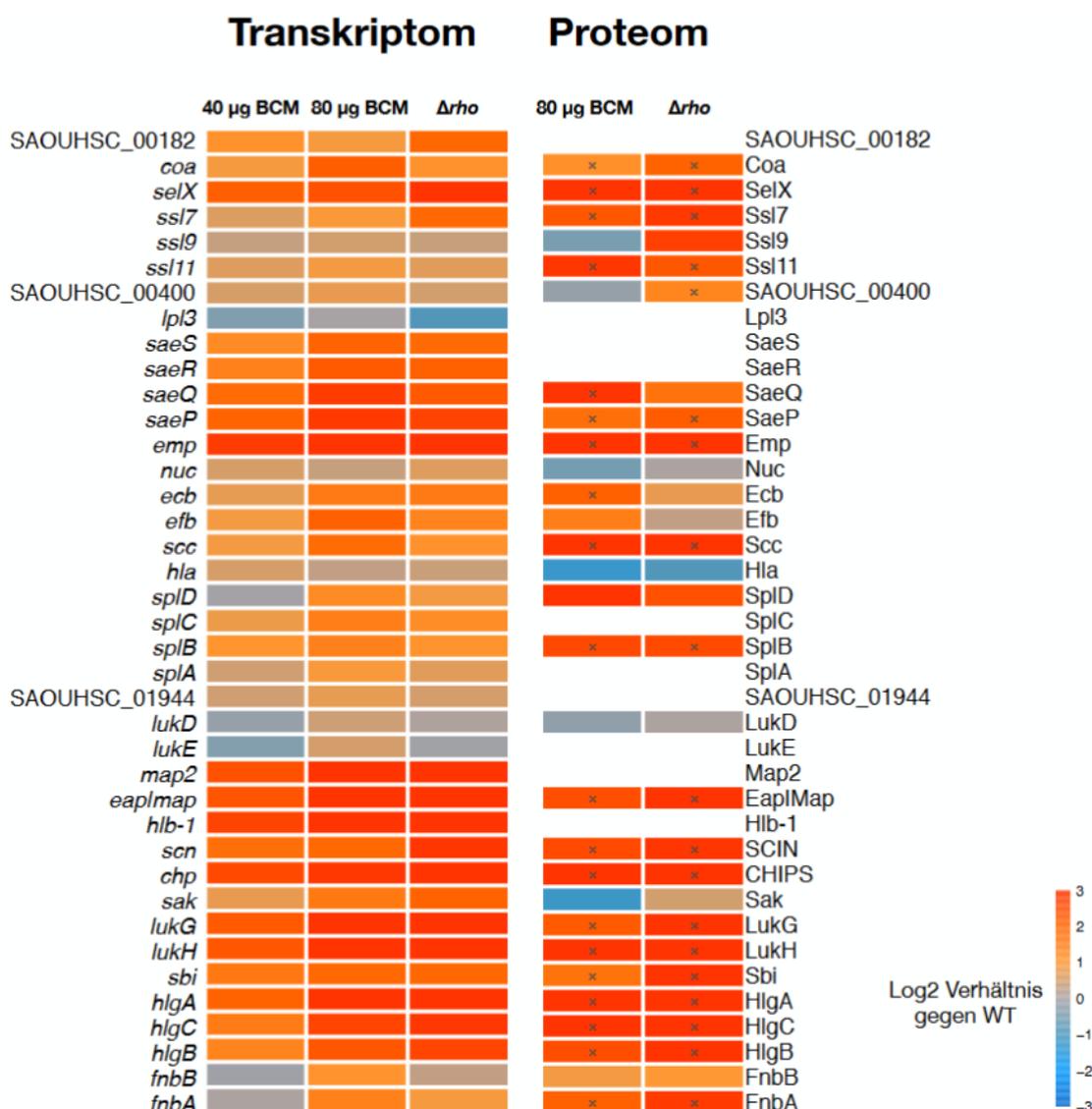


Abbildung 47 Heatmap von Transkriptom- und Proteomdaten des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258 für das SaeR-Regulon. Die Proben des Wildtyps wurden 70 min nach Zugabe von BCM (0, 40 oder 80 µg/ml) in der exponentiellen Wachstumsphase und die Proben der  $\Delta\rho$ -Mutante zum gleichen Zeitpunkt gewonnen. Dargestellt ist das Verhältnis (log<sub>2</sub> transformiert) der mittleren Expressionswerte oder mittleren Proteinintensitäten zweier biologischer Replikate zwischen BCM-behandeltem Wildtyp oder  $\Delta\rho$ -Mutante und unbehandeltem Wildtyp. Signifikante Änderungen der Proteinmenge zwischen den Stämmen sind mit einem Kreuz markiert.

Auch in der Analyse des Einflusses von BCM auf den *S. aureus*-Wildtyp konnten erhöhte mRNA- und Proteinmengen für die Lipase Geh gefunden werden (Tabelle A6; Tabelle A7). Diese Ergebnisse unterstützen ebenfalls den in Abschnitt 5.1 diskutierten möglichen Zusammenhang zwischen einer Änderung in der Struktur der zytoplasmatischen Membran infolge erhöhter Lipaseaktivität und der Aktivierung des Sae-Systems.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Sae-Systems unter Rho-defizienten Bedingungen direkt mit der Transkriptionsterminationsaktivität von Rho verbunden ist und somit

eine neue Verbindung zwischen der Wirkung eines Antibiotikums und der Virulenzgenexpression in *S. aureus* hergestellt werden. Dies zeigt, dass ein Antibiotikum, welches keine bakterizide oder bakteriostatische Wirkung auf *S. aureus* ausübt (Washburn *et al.* 2001), trotzdem einen starken Effekt auf die Expression spezifischer Gene haben kann.

In einigen Studien wurden Effekte auf die Expression von Virulenzfaktoren in *S. aureus* durch Antibiotika untersucht (Hodille *et al.* 2017). Die meisten *in vitro*-Daten zeigen eine verringerte Genexpression von Virulenzgenen nach Behandlung von *S. aureus* mit Antibiotika, die die Ribosomenaktivität verringern, wie Linezolid und Clindamycin (Hodille *et al.* 2017).

Die Expression der Gene, die für das Panton-Valentine Leukozidin (PVL), welche zu den Porenformenden Toxinen gehört, kodieren, wurde in einer Studie von Dumitrescu *et al.* (2011) untersucht. Es wurde der Einfluss von subinhibitorischen Mengen der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika Oxacillin, Imipenem, Cefotaxim, Cefaclor und Cefoxitin auf die Expression der *pvl*-Gene analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Menge an PVLs im Kulturüberstand stark vom verwendeten Antibiotikum abhängt. Nur bei den Antibiotika Oxacillin und Imipenem, die an das *penicillin-binding protein 1* (PBP1) binden, wurden signifikant erhöhte Mengen detektiert. Diese Ergebnisse wurden mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene validiert (Dumitrescu *et al.* 2011). An der Induktion der *pvl*-Gene durch Oxacillin und Imipenem sind die Virulenzregulatoren SarA und Rot beteiligt (Hodille *et al.* 2017).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch die  $\beta$ -Laktam Antibiotika Imipenem, Flucloxacillin oder Cefamandole die Toxin-Produktion in *S. aureus* erhöht wird (Nau & Eiffert 2002). Zu den Auswirkungen von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika auf die Aktivierung des Sae-Systems gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass das Antibiotikum Cefoxitin, ein PBP4-selektives  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum, zur Aktivierung des Sae-Systems in *S. aureus* führt (Kuroda *et al.* 2007). In der Studie wurden Microarrays genutzt, um die Effekte auf die Genexpression im *S. aureus* N315 und einer isogenen *saeRS*-Mutante zu untersuchen. In der Studie von Liu *et al.* (2016) war hingegen keine Wirkung des Antibiotikums Oxacillin auf die Expression des Sae-Systems nachweisbar.

In all diesen Studien wurden die Effekte von Antibiotika untersucht, die gegen Staphylokokken wirksam sind. Im Gegensatz dazu handelt es sich im Fall von BCM um ein Antibiotikum, das gegen Gram-negative Bakterien wirksam ist und dennoch die Expression von Virulenzfaktoren in *S. aureus* beeinflusst. Diese Untersuchungen könnten damit auch klinische Relevanz haben, einerseits hinsichtlich der Behandlung von Patienten, die an gemischten Infektionen mit verschiedenen Bakterienarten leiden, und andererseits in Bezug auf Patienten mit einer Gram-negativen bakteriellen Infektion, die Träger von *S. aureus* sind.

---

## 6 REFERENZEN

- Arbuthnott, J. P.; Coleman, D. C.; Azavedo, J. S. de (1990): Staphylococcal toxins in human disease. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 19, 101S-107S.
- Barrett, J. F.; Hoch, J. A. (1998): Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 42 (7), pp. 1529–1536.
- Beenken, Karen E.; Mrak, Lara N.; Zielinska, Agnieszka K.; Atwood, Danielle N.; Loughran, Allister J.; Griffin, Linda M. *et al.* (2014): Impact of the functional status of *saeRS* on in vivo phenotypes of *Staphylococcus aureus* *sarA* mutants. *Mol Microbiol* 92 (6), pp. 1299–1312. DOI: 10.1111/mmi.12629.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995): Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* Vol. 57, No 1 : 289-300.
- Benson, Meredith A.; Lilo, Sarit; Nygaard, Tyler; Voyich, Jovanka M.; Torres, Victor J. (2012): Rot and *SaeRS* cooperate to activate expression of the staphylococcal superantigen-like exoproteins. *J Bacteriol* 194 (16), pp. 4355–4365. DOI: 10.1128/JB.00706-12.
- Bidnenko, Vladimir; Nicolas, Pierre; Grylak-Mielnicka, Aleksandra; Delumeau, Olivier; Auger, Sandrine; Aucoeur, Anne *et al.* (2017): Termination factor Rho. From the control of pervasive transcription to cell fate determination in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* 13 (7), e1006909. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006909.
- Bischoff, Markus; Dunman, Paul; Kormanec, Jan; Macapagal, Daphne; Murphy, Ellen; Mounts, William *et al.* (2004): Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* *sigmaB* regulon. *J Bacteriol* 186 (13), pp. 4085–4099. DOI: 10.1128/JB.186.13.4085-4099.2004.
- Biswas, Raja; Voggu, Lalitha; Simon, Uwe Karsten; Hentschel, Petra; Thumm, Günther; Götz, Friedrich (2006): Activity of the major staphylococcal autolysin *Atl*. *FEMS Microbiol Lett* 259 (2), pp. 260–268. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00281.x.
- Bode, Lonneke G. M.; Kluytmans, Jan A. J. W.; Wertheim, Heiman F. L.; Bogaers, Diana; Vandembroucke-Grauls, Christina M. J. E.; Roosendaal, Robert *et al.* (2010): Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 362 (1), pp. 9–17. DOI: 10.1056/NEJMoa0808939.
- Boerlin, Patrick; Kuhnert, Peter; Hüsey, Daniela; Schaellibaum, Melchior (2003): Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *J Clin Microbiol* 41 (2), pp. 767–771.
- Boisset, Sandrine; Geissmann, Thomas; Huntzinger, Eric; Fechter, Pierre; Bendridi, Nadia; Possedko, Maria *et al.* (2007): *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the

- synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* 21 (11), pp. 1353–1366. DOI: 10.1101/gad.423507.
- Bonn, Florian; Bartel, Jürgen; Büttner, Knut; Hecker, Michael; Otto, Andreas; Becher, Dörte (2014): Picking vanished proteins from the void. How to collect and ship/share extremely dilute proteins in a reproducible and highly efficient manner. *Anal Chem* 86 (15), pp. 7421–7427. DOI: 10.1021/ac501189j.
- Botella, Laure; Vaubourgeix, Julien; Livny, Jonathan; Schnappinger, Dirk (2017): Depleting *Mycobacterium tuberculosis* of the transcription termination factor Rho causes pervasive transcription and rapid death. *Nat Commun* 8, p. 14731. DOI: 10.1038/ncomms14731.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, pp. 248–254.
- Brinsmade, Shaun R. (2017): CodY, a master integrator of metabolism and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr Genet* 63 (3), pp. 417–425. DOI: 10.1007/s00294-016-0656-5.
- Bronner, Stéphane; Monteil, Henri; Prévost, Gilles (2004): Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. Complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* 28 (2), pp. 183–200. DOI: 10.1016/j.femsre.2003.09.003.
- Bruderer, Roland; Bernhardt, Oliver M.; Gandhi, Tejas; Miladinović, Saša M.; Cheng, Lin-Yang; Messner, Simon *et al.* (2015): Extending the limits of quantitative proteome profiling with data-independent acquisition and application to acetaminophen-treated three-dimensional liver microtissues. *Mol Cell Proteomics* 14 (5), pp. 1400–1410. DOI: 10.1074/mcp.M114.044305.
- Buyck, J. M.; Verriere, V.; Benmahdi, R.; Higgins, G.; Guery, B.; Matran, R. *et al.* (2013): P. aeruginosa LPS stimulates calcium signaling and chloride secretion via CFTR in human bronchial epithelial cells. *J Cyst Fibros* 12 (1), pp. 60–67. DOI: 10.1016/j.jcf.2012.06.007.
- Cardinale, Christopher J.; Washburn, Robert S.; Tadigotla, Vasisht R.; Brown, Lewis M.; Gottesman, Max E.; Nudler, Evgeny (2008): Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli*. *Science* 320 (5878), pp. 935–938. DOI: 10.1126/science.1152763.
- Charpentier, Emmanuelle; Anton, Ana I.; Barry, Peter; Alfonso, Berenice; Fang, Yuan; Novick, Richard P. (2004): Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70 (10), pp. 6076–6085. DOI: 10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004.
- Chavakis, Triantafyllos; Hussain, Muzaffar; Kanse, Sandip M.; Peters, Georg; Bretzel, Reinhard G.; Flock, Jan-Ingmar *et al.* (2002): *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 8 (7), pp. 687–693. DOI: 10.1038/nm728.
- Cheung, A. L.; Projan, S. J. (1994): Cloning and sequencing of sarA of *Staphylococcus aureus*, a gene required for the expression of agr. *J Bacteriol* 176 (13), pp. 4168–4172.
- Cheung, Ambrose L.; Zhang, Gongyi (2002): Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA protein family. *Front Biosci* 7, d1825-42.
- Cho, Hoonsik; Jeong, Do-Won; Liu, Qian; Yeo, Won-Sik; Vogl, Thomas; Skaar, Eric P. *et al.* (2015): Calprotectin Increases the Activity of the SaeRS Two Component System and Murine Mortality during *Staphylococcus aureus* Infections. *PLoS Pathog* 11 (7), e1005026. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005026.

- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1), pp. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
- Cozens, A. L.; Yezzi, M. J.; Chin, L.; Simon, E. M.; Finkbeiner, W. E.; Wagner, J. A.; Gruenert, D. C. (1992): Characterization of immortal cystic fibrosis tracheobronchial gland epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (11), pp. 5171–5175.
- Cozens, A. L.; Yezzi, M. J.; Kunzelmann, K.; Ohrui, T.; Chin, L.; Eng, K. *et al.* (1994): CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10 (1), pp. 38–47. DOI: 10.1165/ajrcmb.10.1.7507342.
- Das, A.; Court, D.; Adhya, S. (1976): Isolation and characterization of conditional lethal mutants of *Escherichia coli* defective in transcription termination factor rho. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (6), pp. 1959–1963.
- Delauné, Aurélie; Dubrac, Sarah; Blanchet, Charlene; Poupel, Olivier; Mäder, Ulrike; Hiron, Aurélie *et al.* (2012): The WalkR system controls major staphylococcal virulence genes and is involved in triggering the host inflammatory response. *Infect Immun* 80 (10), pp. 3438–3453. DOI: 10.1128/IAI.00195-12.
- DeLeo, Frank R.; Otto, Michael; Kreiswirth, Barry N.; Chambers, Henry F. (2010): Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375 (9725), pp. 1557–1568. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61999-1.
- Deora, R.; Misra, T. K. (1996): Characterization of the primary sigma factor of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 271 (36), pp. 21828–21834.
- Deutsch, Eric W.; Mendoza, Luis; Shteynberg, David; Farrah, Terry; Lam, Henry; Tasman, Natalie *et al.* (2010): A guided tour of the Trans-Proteomic Pipeline. *Proteomics* 10 (6), pp. 1150–1159. DOI: 10.1002/pmic.200900375.
- Doerr, Allison (2014): DIA mass spectrometry. *Nature Methods* 12, 35 EP -. DOI: 10.1038/nmeth.3234.
- Dumitrescu, Oana; Choudhury, Priya; Boisset, Sandrine; Badiou, Cédric; Bes, Michele; Benito, Yvonne *et al.* (2011): Beta-lactams interfering with PBP1 induce Panton-Valentine leukocidin expression by triggering sarA and rot global regulators of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 55 (7), pp. 3261–3271. DOI: 10.1128/AAC.01401-10.
- Durand, Sylvain; Gilet, Laetitia; Condon, Ciarán (2012): The essential function of *B. subtilis* RNase III is to silence foreign toxin genes. *PLoS Genet* 8 (12), e1003181. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003181.
- Ebner, Patrick; Luqman, Arif; Reichert, Sebastian; Hauf, Ksenia; Popella, Peter; Forchhammer, Karl *et al.* (2017): Non-classical Protein Excretion Is Boosted by PSM $\alpha$ -Induced Cell Leakage. *Cell Rep* 20 (6), pp. 1278–1286. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.045.
- Ederth, Josefine; Mooney, Rachel A.; Isaksson, Leif A.; Landick, Robert (2006): Functional interplay between the jaw domain of bacterial RNA polymerase and allele-specific residues in the product RNA-binding pocket. *J Mol Biol* 356 (5), pp. 1163–1179. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.11.080.
- Eiff, C. von; Becker, K.; Machka, K.; Stammer, H.; Peters, G. (2001): Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344 (1), pp. 11–16. DOI: 10.1056/NEJM200101043440102.

- Eng, Jimmy K.; Jahan, Tahmina A.; Hoopmann, Michael R. (2013): Comet. An open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics* 13 (1), pp. 22–24. DOI: 10.1002/pmic.201200439.
- Epshtein, Vitaly; Dutta, Dipak; Wade, Joseph; Nudler, Evgeny (2010): An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination. *Nature* 463 (7278), pp. 245–249. DOI: 10.1038/nature08669.
- Ericsson, C. D.; DuPont, H. L.; Sullivan, P.; Galindo, E.; Evans, D. G.; Evans, D. J. (1983): Bicozamycin, a poorly absorbable antibiotic, effectively treats travelers' diarrhea. *Ann Intern Med* 98 (1), pp. 20–25.
- Forbes, Ben; Ehrhardt, Carsten (2005): Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm* 60 (2), pp. 193–205. DOI: 10.1016/j.ejpb.2005.02.010.
- Forbes, Ben; Shah, Atiya; Martin, Gary P.; Lansley, Alison B. (2003): The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- as a model system of the airways for studying drug transport. *Int J Pharm* 257 (1-2), pp. 161–167.
- Foster, Timothy J.; Geoghegan, Joan A.; Ganesh, Vannakambadi K.; Höök, Magnus (2014): Adhesion, invasion and evasion. The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* 12 (1), pp. 49–62. DOI: 10.1038/nrmicro3161.
- Fowler, Vance G.; Miro, Jose M.; Hoen, Bruno; Cabell, Christopher H.; Abrutyn, Elias; Rubinstein, Ethan *et al.* (2005): *Staphylococcus aureus* endocarditis. A consequence of medical progress. *JAMA* 293 (24), pp. 3012–3021. DOI: 10.1001/jama.293.24.3012.
- Fuchs, Stephan; Mehlan, Henry; Bernhardt, Jörg; Hennig, André; Michalik, Stephan; Surmann, Kristin *et al.* (2017): AureoWiki-The repository of the *Staphylococcus aureus* research and annotation community. *Int J Med Microbiol*. DOI: 10.1016/j.ijmm.2017.11.011.
- Geiger, Tobias; Goerke, Christiane; Fritz, Michaela; Schäfer, Tina; Ohlsen, Knut; Liebeke, Manuel *et al.* (2010): Role of the (p)ppGpp synthase RSH, a RelA/SpoT homolog, in stringent response and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 78 (5), pp. 1873–1883. DOI: 10.1128/IAI.01439-09.
- Geiger, Tobias; Goerke, Christiane; Mainiero, Markus; Kraus, Dirk; Wolz, Christiane (2008): The virulence regulator Sae of *Staphylococcus aureus*. Promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J Bacteriol* 190 (10), pp. 3419–3428. DOI: 10.1128/JB.01927-07.
- Geiger, Tobias; Wolz, Christiane (2014): Intersection of the stringent response and the CodY regulon in low GC Gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol* 304 (2), pp. 150–155. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.11.013.
- Gertz, S.; Engelmann, S.; Schmid, R.; Ohlsen, K.; Hacker, J.; Hecker, M. (1999): Regulation of sigmaB-dependent transcription of sigB and asp23 in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol Gen Genet* 261 (3), pp. 558–566.
- Gillaspy A, Worrell V, Orvis J, Roe B, Dyer D, Iandolo J. (2006): The *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 Genome, p 381-412. In Fischetti V, Novick R, Ferretti J, Portnoy D, Rood J (ed), *Gram-Positive Pathogens, Second Edition*. ASM Press, Washington, DC. DOI: 10.1128/9781555816513.ch32
- Giraudou, A. T.; Calzolari, A.; Cataldi, A. A.; Bogni, C.; Nagel, R. (1999): The sae locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol Lett* 177 (1), pp. 15–22.

- Haas, Pieter-Jan; Haas, Carla J. C. de; Poppelier, Miriam J. J. C.; van Kessel, Kok P. M.; van Strijp, Jos A. G.; Dijkstra, Klaas *et al.* (2005): The structure of the C5a receptor-blocking domain of chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* is related to a group of immune evasive molecules. *J Mol Biol* 353 (4), pp. 859–872. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.09.014.
- Harraghy, Niamh; Kormanec, Jan; Wolz, Christiane; Homerova, Dagmar; Goerke, Christiane; Ohlsen, Knut *et al.* (2005): sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology (Reading, Engl )* 151 (Pt 6), pp. 1789–1800. DOI: 10.1099/mic.0.27902-0.
- Hartwig, Stacey M.; Ketterer, Margaret; Apicella, Michael A.; Varga, Steven M. (2016): Non-typeable *Haemophilus influenzae* protects human airway epithelial cells from a subsequent respiratory syncytial virus challenge. *Virology* 498, pp. 128–135. DOI: 10.1016/j.virol.2016.08.020.
- Hecker, Michael; Pané-Farré, Jan; Völker, Uwe (2007): SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61, pp. 215–236. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093445.
- Herbert, Silvia; Ziebandt, Anne-Kathrin; Ohlsen, Knut; Schäfer, Tina; Hecker, Michael; Albrecht, Dirk *et al.* (2010): Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect Immun* 78 (6), pp. 2877–2889. DOI: 10.1128/IAI.00088-10.
- Hildebrandt, Petra; Surmann, Kristin; Salazar, Manuela Gesell; Normann, Nicole; Völker, Uwe; Schmidt, Frank (2016): Alternative fluorescent labeling strategies for characterizing gram-positive pathogenic bacteria. Flow cytometry supported counting, sorting, and proteome analysis of *Staphylococcus aureus* retrieved from infected host cells. *Cytometry A* 89 (10), pp. 932–940. DOI: 10.1002/cyto.a.22981.
- Hodille, Elisabeth; Rose, Warren; Diep, Binh An; Goutelle, Sylvain; Lina, Gerard; Dumitrescu, Oana (2017): The Role of Antibiotics in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 30 (4), pp. 887–917. DOI: 10.1128/CMR.00120-16.
- Janzon, L.; Löfdahl, S.; Arvidson, S. (1989): Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, hld, adjacent to the accessory gene regulator (agr) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 219 (3), pp. 480–485.
- Jeong, Do-Won; Cho, Hoonsik; Jones, Marcus B.; Shatzkes, Kenneth; Sun, Fei; Ji, Quanjiang *et al.* (2012): The auxiliary protein complex SaePQ activates the phosphatase activity of sensor kinase SaeS in the SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 86 (2), pp. 331–348. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08198.x.
- Josefsson, E.; McCrea, K. W.; Ní Eidhin, D.; O’Connell, D.; Cox, J.; Höök, M.; Foster, T. J. (1998): Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading, Engl )* 144 (Pt 12), pp. 3387–3395. DOI: 10.1099/00221287-144-12-3387.
- Karlsson, A.; Saravia-Otten, P.; Tegmark, K.; Morfeldt, E.; Arvidson, S. (2001): Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* sarA mutants due to up-regulation of extracellular proteases. *Infect Immun* 69 (8), pp. 4742–4748. DOI: 10.1128/IAI.69.8.4742-4748.2001.
- Kawano, Mitsuoki; Aravind, L.; Storz, Gisela (2007): An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol Microbiol* 64 (3), pp. 738–754. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05688.x.

- Keller, Andrew; Nesvizhskii, Alexey I.; Kolker, Eugene; Aebersold, Ruedi (2002): Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74 (20), pp. 5383–5392.
- Kerdudou, Sylvain; Laschke, Matthias W.; Sinha, Bhanu; Preissner, Klaus T.; Menger, Michael D.; Herrmann, Mathias (2006): Fibronectin binding proteins contribute to the adherence of *Staphylococcus aureus* to intact endothelium in vivo. *Thromb Haemost* 96 (2), pp. 183–189.
- Kluytmans, J.; van Belkum, A.; Verbrugh, H. (1997): Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10 (3), pp. 505–520.
- Koenig, Robbin L.; Ray, Jessica L.; Maleki, Soheila J.; Smeltzer, Mark S.; Hurlburt, Barry K. (2004): *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-agr regulatory region. *J Bacteriol* 186 (22), pp. 7549–7555. DOI: 10.1128/JB.186.22.7549-7555.2004.
- Kohn, Harold; Widger, William (2005): The molecular basis for the mode of action of bicyclomycin. *Curr Drug Targets Infect Disord* 5 (3), pp. 273–295.
- Kumar, Jaspal K. (2008): Lysostaphin. An antistaphylococcal agent. *Appl Microbiol Biotechnol* 80 (4), pp. 555–561. DOI: 10.1007/s00253-008-1579-y.
- Kuroda, Hiroko; Kuroda, Makoto; Cui, Longzhu; Hiramatsu, Keiichi (2007): Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol Lett* 268 (1), pp. 98–105. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00568.x.
- Lasa, Iñigo; Toledo-Arana, Alejandro; Gingeras, Thomas R. (2012): An effort to make sense of antisense transcription in bacteria. *RNA Biol* 9 (8), pp. 1039–1044. DOI: 10.4161/rna.21167.
- Leela, J. Krishna; Syeda, Aisha H.; Anupama, K.; Gowrishankar, J. (2013): Rho-dependent transcription termination is essential to prevent excessive genome-wide R-loops in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (1), pp. 258–263. DOI: 10.1073/pnas.1213123110.
- Lewis, Megan L.; Surewaard, Bas G. J. (2018): Neutrophil evasion strategies by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. *Cell Tissue Res* 371 (3), pp. 489–503. DOI: 10.1007/s00441-017-2737-2.
- Li, S.; Arvidson, S.; Möllby, R. (1997): Variation in the agr-dependent expression of alpha-toxin and protein A among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from patients with septicemia. *FEMS Microbiol Lett* 152 (1), pp. 155–161.
- Liang, Xudong; Yu, Chuanxin; Sun, Junsong; Liu, Hong; Landwehr, Christina; Holmes, David; Ji, Yinduo (2006): Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 74 (8), pp. 4655–4665. DOI: 10.1128/IAI.00322-06.
- Lieber, M.; Smith, B.; Szakal, A.; Nelson-Rees, W.; Todaro, G. (1976): A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17 (1), pp. 62–70.
- Liese, Jan; Rooijackers, Suzan H. M.; van Strijp, Jos A. G.; Novick, Richard P.; Dustin, Michael L. (2013): Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of *Staphylococcus aureus* skin abscess formation. *Cell Microbiol* 15 (6), pp. 891–909. DOI: 10.1111/cmi.12085.

- Lina, G.; Jarraud, S.; Ji, G.; Greenland, T.; Pedraza, A.; Etienne, J. *et al.* (1998): Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the agr signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 28 (3), pp. 655–662.
- Lithwick, Gila; Margalit, Hanah (2003): Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. *Genome Res* 13 (12), pp. 2665–2673. DOI: 10.1101/gr.1485203.
- Liu, Qian; Cho, Hoonsik; Yeo, Won-Sik; Bae, Taeok (2015): The extracytoplasmic linker peptide of the sensor protein SaeS tunes the kinase activity required for staphylococcal virulence in response to host signals. *PLoS Pathog* 11 (4), e1004799. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004799.
- Liu, Qian; Yeo, Won-Sik; Bae, Taeok (2016): The SaeRS Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *Genes (Basel)* 7 (10). DOI: 10.3390/genes7100081.
- Liu, Yingfang; Manna, Adhar C.; Pan, Cheol-Ho; Kriksunov, Irina A.; Thiel, Daniel J.; Cheung, Ambrose L.; Zhang, Gongyi (2006): Structural and function analyses of the global regulatory protein SarA from *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (7), pp. 2392–2397. DOI: 10.1073/pnas.0510439103.
- Lowy, F. D. (1998): *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339 (8), pp. 520–532. DOI: 10.1056/NEJM199808203390806.
- Mäder, Ulrike; Nicolas, Pierre; Depke, Maren; Pané-Farré, Jan; Debarbouille, Michel; van der Kooi-Pol, Magdalena M. *et al.* (2016): *Staphylococcus aureus* Transcriptome Architecture. From Laboratory to Infection-Mimicking Conditions. *PLoS Genet* 12 (4), e1005962. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005962.
- Madigan MT & Martinko JM (2006): In *Brock Biology of Microorganisms Eleventh International Edition*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall
- Mainiero, Markus; Goerke, Christiane; Geiger, Tobias; Gonser, Christoph; Herbert, Silvia; Wolz, Christiane (2010): Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system saeRS. *J Bacteriol* 192 (3), pp. 613–623. DOI: 10.1128/JB.01242-09.
- Majerczyk, Charlotte D.; Dunman, Paul M.; Luong, Thanh T.; Lee, Chia Y.; Sadykov, Marat R.; Somerville, Greg A. *et al.* (2010): Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 192 (11), pp. 2861–2877. DOI: 10.1128/JB.00220-10.
- Malik, Muhammad; Li, Liping; Zhao, Xilin; Kerns, Robert J.; Berger, James M.; Drlica, Karl (2014): Lethal synergy involving bicyclomycin. An approach for reviving old antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 69 (12), pp. 3227–3235. DOI: 10.1093/jac/dku285.
- Manna, Adhar C.; Cheung, Ambrose L. (2006): Transcriptional regulation of the agr locus and the identification of DNA binding residues of the global regulatory protein SarR in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 60 (5), pp. 1289–1301. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05171.x.
- Marrack, P.; Kappler, J. (1990): The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248 (4956), pp. 705–711.
- Marshall, J. H.; Wilmoth, G. J. (1981): Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *J Bacteriol* 147 (3), pp. 900–913.
- Mascher, Thorsten (2014): Bacterial (intramembrane-sensing) histidine kinases. Signal transfer rather than stimulus perception. *Trends Microbiol* 22 (10), pp. 559–565. DOI: 10.1016/j.tim.2014.05.006.

- Mayville, P.; Ji, G.; Beavis, R.; Yang, H.; Goger, M.; Novick, R. P.; Muir, T. W. (1999): Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (4), pp. 1218–1223.
- Michalik, Stephan; Depke, Maren; Murr, Annette; Gesell Salazar, Manuela; Kusebauch, Ulrike; Sun, Zhi *et al.* (2017): A global *Staphylococcus aureus* proteome resource applied to the in vivo characterization of host-pathogen interactions. *Sci Rep* 7 (1), p. 9718. DOI: 10.1038/s41598-017-10059-w.
- Mitchell, Gabriel; Brouillette, Eric; Séguin, David Lalonde; Asselin, Ann-Elise; Jacob, Christian Lebeau; Malouin, François (2010): A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. *Microb Pathog* 48 (1), pp. 18–27. DOI: 10.1016/j.micpath.2009.10.003.
- Miyamura, S.; Ogasawara, N.; Otsuka, H.; Niwayama, S.; Tanaka, H. (1973): Antibiotic 5879 produced by *Streptomyces aizunensis*, identical with bicyclomycin. *J Antibiot* 26 (9), pp. 479–484.
- Miyoshi, T.; Miyairi, N.; Aoki, H.; Kosaka, M.; Sakai, H. (1972): Bicyclomycin, a new antibiotic. I. Taxonomy, isolation and characterization. *J Antibiot* 25 (10), pp. 569–575.
- Morikawa, Kazuya; Inose, Yumiko; Okamura, Hideyuki; Maruyama, Atsushi; Hayashi, Hideo; Takeyasu, Kunio; Ohta, Toshiko (2003): A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette. Functional significance and implication for the evolutionary processes. *Genes Cells* 8 (8), pp. 699–712.
- Münzenmayer, Lisa; Geiger, Tobias; Daiber, Ellen; Schulte, Berit; Autenrieth, Stella E.; Fraunholz, Martin; Wolz, Christiane (2016): Influence of Sae-regulated and Agr-regulated factors on the escape of *Staphylococcus aureus* from human macrophages. *Cell Microbiol* 18 (8), pp. 1172–1183. DOI: 10.1111/cmi.12577.
- Nau, Roland; Eiffert, Helmut (2002): Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials. Potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin Microbiol Rev* 15 (1), pp. 95–110.
- Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P. H. (1982): Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1 (7), pp. 841–845.
- Nguyen, Minh-Thu; Luqman, Arif; Bitschar, Katharina; Hertlein, Tobias; Dick, Johannes; Ohlsen, Knut *et al.* (2017): Staphylococcal (phospho)lipases promote biofilm formation and host cell invasion. *Int J Med Microbiol*. DOI: 10.1016/j.ijmm.2017.11.013.
- Nicolas, Pierre; Mäder, Ulrike; Dervyn, Etienne; Rochat, Tatiana; Leduc, Aurélie; Pigeonneau, Nathalie *et al.* (2012): Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* 335 (6072), pp. 1103–1106. DOI: 10.1126/science.1206848.
- Nishida, M.; Mine, Y.; Matsubara, T.; Goto, S.; Kuwahara, S. (1972): Bicyclomycin, a new antibiotic. 3. In vitro and in vivo antimicrobial activity. *J Antibiot* 25 (10), pp. 582–593.
- Novick, R. P.; Projan, S. J.; Kornblum, J.; Ross, H. F.; Ji, G.; Kreiswirth, B. *et al.* (1995): The agr P2 operon. An autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 248 (4), pp. 446–458.
- Novick, R. P.; Ross, H. F.; Projan, S. J.; Kornblum, J.; Kreiswirth, B.; Moghazeh, S. (1993): Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 12 (10), pp. 3967–3975.

- Novick, Richard P.; Geisinger, Edward (2008): Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* 42, pp. 541–564. DOI: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091640.
- Novick, Richard P.; Jiang, Dunrong (2003): The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology (Reading, Engl )* 149 (Pt 10), pp. 2709–2717. DOI: 10.1099/mic.0.26575-0.
- Ochi, K.; Saito, Y.; Umehara, K.; Ueda, I.; Kohsaka, M. (1984): Restoration of aerial mycelium and antibiotic production in a *Streptomyces griseoflavus* arginine auxotroph. *J Gen Microbiol* 130 (8), pp. 2007–2013. DOI: 10.1099/00221287-130-8-2007.
- Olson, Michael E.; Nygaard, Tyler K.; Ackermann, Laynez; Watkins, Robert L.; Zurek, Oliwia W.; Pallister, Kyler B. *et al.* (2013): *Staphylococcus aureus* nuclease is an SaeRS-dependent virulence factor. *Infect Immun* 81 (4), pp. 1316–1324. DOI: 10.1128/IAI.01242-12.
- Overbeek, Ross; Begley, Tadhg; Butler, Ralph M.; Choudhuri, Jomuna V.; Chuang, Han-Yu; Cohoon, Matthew *et al.* (2005): The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res* 33 (17), pp. 5691–5702. DOI: 10.1093/nar/gki866.
- Pané-Farré, Jan; Jonas, Beate; Förstner, Konrad; Engelmann, Susanne; Hecker, Michael (2006): The sigmaB regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int J Med Microbiol* 296 (4-5), pp. 237–258. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.11.011.
- Park, Joo-Seop; Roberts, Jeffrey W. (2006): Role of DNA bubble rewinding in enzymatic transcription termination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (13), pp. 4870–4875. DOI: 10.1073/pnas.0600145103.
- Parry, M. A.; Fernandez-Catalan, C.; Bergner, A.; Huber, R.; Hopfner, K. P.; Schlott, B. *et al.* (1998): The ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex is a proteinase-cofactor-substrate complex in action. *Nat Struct Biol* 5 (10), pp. 917–923.
- Peacock, S. J.; Foster, T. J.; Cameron, B. J.; Berendt, A. R. (1999): Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology (Reading, Engl )* 145 (Pt 12), pp. 3477–3486. DOI: 10.1099/00221287-145-12-3477.
- Peng, H. L.; Novick, R. P.; Kreiswirth, B.; Kornblum, J.; Schlievert, P. (1988): Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 170 (9), pp. 4365–4372.
- Penno, Christophe; Sharma, Virag; Coakley, Arthur; O’Connell Motherway, Mary; van Sinderen, Douwe; Lubkowska, Lucyna *et al.* (2015): Productive mRNA stem loop-mediated transcriptional slippage. Crucial features in common with intrinsic terminators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (16), E1984-93. DOI: 10.1073/pnas.1418384112.
- Perocchi, Fabiana; Xu, Zhenyu; Clauder-Münster, Sandra; Steinmetz, Lars M. (2007): Antisense artifacts in transcriptome microarray experiments are resolved by actinomycin D. *Nucleic Acids Res* 35 (19), e128. DOI: 10.1093/nar/gkm683.
- Peters, Jason M.; Mooney, Rachel A.; Grass, Jeffrey A.; Jessen, Erik D.; Tran, Frances; Landick, Robert (2012): Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 26 (23), pp. 2621–2633. DOI: 10.1101/gad.196741.112.
- Peters, Jason M.; Vangeloff, Abbey D.; Landick, Robert (2011): Bacterial transcription terminators. The RNA 3’-end chronicles. *J Mol Biol* 412 (5), pp. 793–813. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.03.036.

- Pförtner, Henrike; Burian, Marc S.; Michalik, Stephan; Depke, Maren; Hildebrandt, Petra; Dhople, Vishnu M. *et al.* (2014): Activation of the alternative sigma factor SigB of *Staphylococcus aureus* following internalization by epithelial cells - an in vivo proteomics perspective. *Int J Med Microbiol* 304 (2), pp. 177–187. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.11.014.
- Powers, Michael E.; Kim, Hwan Keun; Wang, Yang; Bubeck Wardenburg, Juliane (2012): ADAM10 mediates vascular injury induced by *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin. *J Infect Dis* 206 (3), pp. 352–356. DOI: 10.1093/infdis/jis192.
- Priest, Nicholas K.; Rudkin, Justine K.; Feil, Edward J.; van den Elsen, Jean M. H.; Cheung, Ambrose; Peacock, Sharon J. *et al.* (2012): From genotype to phenotype. Can systems biology be used to predict *Staphylococcus aureus* virulence? *Nat Rev Microbiol* 10 (11), pp. 791–797. DOI: 10.1038/nrmicro2880.
- Puigbò, Pere; Guzmán, Eduard; Romeu, Antoni; Garcia-Vallvé, Santiago (2007): OPTIMIZER. A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 35 (Web Server issue), W126–31. DOI: 10.1093/nar/gkm219.
- Qiu, Rongde; Pei, Wuhong; Zhang, Linsheng; Lin, Jianqun; Ji, Guangyong (2005): Identification of the putative staphylococcal AgrB catalytic residues involving the proteolytic cleavage of AgrD to generate autoinducing peptide. *J Biol Chem* 280 (17), pp. 16695–16704. DOI: 10.1074/jbc.M411372200.
- Queck, Shu Y.; Jameson-Lee, Max; Villaruz, Amer E.; Bach, Thanh-Huy L.; Khan, Burhan A.; Sturdevant, Daniel E. *et al.* (2008): RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system. Insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell* 32 (1), pp. 150–158. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.08.005.
- Quirk, P. G.; Dunkley, E. A.; Lee, P.; Krulwich, T. A. (1993): Identification of a putative *Bacillus subtilis* rho gene. *J Bacteriol* 175 (3), pp. 647–654.
- Räth, Susann; Zieseimer, Sabine; Witte, Amelie; Konkel, Anne; Müller, Christian; Hildebrandt, Petra *et al.* (2013): *S. aureus* haemolysin A-induced IL-8 and IL-6 release from human airway epithelial cells is mediated by activation of p38- and Erk-MAP kinases and additional, cell type-specific signalling mechanisms. *Cell Microbiol* 15 (7), pp. 1253–1265. DOI: 10.1111/cmi.12113.
- Ray-Soni, Ananya; Bellecourt, Michael J.; Landick, Robert (2016): Mechanisms of Bacterial Transcription Termination. All Good Things Must End. *Annu Rev Biochem* 85, pp. 319–347. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014844.
- Reiter, Lukas; Claassen, Manfred; Schimpf, Sabine P.; Jovanovic, Marko; Schmidt, Alexander; Buhmann, Joachim M. *et al.* (2009): Protein identification false discovery rates for very large proteomics data sets generated by tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 8 (11), pp. 2405–2417. DOI: 10.1074/mcp.M900317-MCP200.
- Richardson, John P. (2002): Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochim Biophys Acta* 1577 (2), pp. 251–260.
- Richter, Erik; Harms, Manuela; Ventz, Katharina; Nölker, Rolf; Fraunholz, Martin J.; Mostertz, Jörg; Hochgräfe, Falko (2016): Quantitative Proteomics Reveals the Dynamics of Protein Phosphorylation in Human Bronchial Epithelial Cells during Internalization, Phagosomal Escape, and Intracellular Replication of *Staphylococcus aureus*. *J Proteome Res* 15 (12), pp. 4369–4386. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00421.
- Roberson, J. R.; Fox, L. K.; Hancock, D. D.; Besser, T. E. (1992): Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol* 30 (12), pp. 3217–3219.

- Rocha, Eduardo P. C. (2004): Codon usage bias from tRNA's point of view. Redundancy, specialization, and efficient decoding for translation optimization. *Genome Res* 14 (11), pp. 2279–2286. DOI: 10.1101/gr.2896904.
- Rogasch, Kathrin; Rühmling, Vanessa; Pané-Farré, Jan; Höper, Dirk; Weinberg, Christin; Fuchs, Stephan *et al.* (2006): Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* 188 (22), pp. 7742–7758. DOI: 10.1128/JB.00555-06.
- Rooijackers, Suzan H. M.; Ruyken, Maartje; van Roon, Jos; van Kessel, Kok P. M.; van Strijp, Jos A. G.; van Wamel, Willem J. B. (2006): Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol* 8 (8), pp. 1282–1293. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00709.x.
- Rooijackers, Suzan H. M.; Wu, Jin; Ruyken, Maartje; van Domselaar, Robert; Planken, Karel L.; Tzekou, Apostolia *et al.* (2009): Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor. *Nat Immunol* 10 (7), pp. 721–727. DOI: 10.1038/ni.1756.
- Sassetti, Christopher M.; Rubin, Eric J. (2003): Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (22), pp. 12989–12994. DOI: 10.1073/pnas.2134250100.
- Schindler, C. A.; Schuhradt, V. T. (1964): Lysostaphin. A new bacteriolytic agent for the staphylococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, pp. 414–421.
- Sharp, Paul M.; Bailes, Elizabeth; Grocock, Russell J.; Peden, John F.; Sockett, R. Elizabeth (2005): Variation in the strength of selected codon usage bias among bacteria. *Nucleic Acids Res* 33 (4), pp. 1141–1153. DOI: 10.1093/nar/gki242.
- Shaw, Lindsey N.; Lindholm, Catharina; Prajsnar, Tomasz K.; Miller, Halie K.; Brown, Melanie C.; Golonka, Ewa *et al.* (2008): Identification and characterization of sigma, a novel component of the *Staphylococcus aureus* stress and virulence responses. *PLoS ONE* 3 (12), e3844. DOI: 10.1371/journal.pone.0003844.
- Shteynberg, David; Deutsch, Eric W.; Lam, Henry; Eng, Jimmy K.; Sun, Zhi; Tasman, Natalie *et al.* (2011): iProphet. Multi-level integrative analysis of shotgun proteomic data improves peptide and protein identification rates and error estimates. *Mol Cell Proteomics* 10 (12), M111.007690. DOI: 10.1074/mcp.M111.007690.
- Silvaggi, Jessica M.; Perkins, John B.; Losick, Richard (2005): Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 187 (19), pp. 6641–6650. DOI: 10.1128/JB.187.19.6641-6650.2005.
- Sinha, Bhanu; Fraunholz, Martin (2010): *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol* 300 (2-3), pp. 170–175. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.08.019.
- Sizemore, C.; Buchner, E.; Rygus, T.; Witke, C.; Götz, F.; Hillen, W. (1991): Organization, promoter analysis and transcriptional regulation of the *Staphylococcus xylosus* xylose utilization operon. *Mol Gen Genet* 227 (3), pp. 377–384.
- Sonenshein, Abraham L. (2005): CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* 8 (2), pp. 203–207. DOI: 10.1016/j.mib.2005.01.001.
- Spaan, Andrés N.; Surewaard, Bas G. J.; Nijland, Reindert; van Strijp, Jos A. G. (2013): Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*. A biological tug of war. *Annu Rev Microbiol* 67, pp. 629–650. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155746.

- Steinhuber, Andrea; Goerke, Christiane; Bayer, Manfred G.; Döring, Gerd; Wolz, Christiane (2003): Molecular architecture of the regulatory Locus sae of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J Bacteriol* 185 (21), pp. 6278–6286.
- Struhl, Kevin (2007): Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* 14 (2), pp. 103–105. DOI: 10.1038/nsmb0207-103.
- Sullivan, M. A.; Yasbin, R. E.; Young, F. E. (1984): New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments. *Gene* 29 (1-2), pp. 21–26.
- Surmann, Kristin; Simon, Marjolaine; Hildebrandt, Petra; Pförtner, Henrike; Michalik, Stephan; Stentzel, Sebastian *et al.* (2015): A proteomic perspective of the interplay of *Staphylococcus aureus* and human alveolar epithelial cells during infection. *J Proteomics* 128, pp. 203–217. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.07.034.
- Thomason, Maureen Kiley; Storz, Gisela (2010): Bacterial antisense RNAs. How many are there, and what are they doing? *Annu Rev Genet* 44, pp. 167–188. DOI: 10.1146/annurev-genet-102209-163523.
- Thomer, Lena; Schneewind, Olaf; Missiakas, Dominique (2016): Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Annu Rev Pathol* 11, pp. 343–364. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012615-044351.
- Thomsen, Nathan D.; Berger, James M. (2009): Running in reverse. The structural basis for translocation polarity in hexameric helicases. *Cell* 139 (3), pp. 523–534. DOI: 10.1016/j.cell.2009.08.043.
- Tomasini, Arnaud; François, Patrice; Howden, Benjamin P.; Fechter, Pierre; Romby, Pascale; Caldelari, Isabelle (2014): The importance of regulatory RNAs in *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 21, pp. 616–626. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.11.016.
- Tuchscher, Lorena; Bischoff, Markus; Lattar, Santiago M.; Noto Llana, Mariangeles; Pförtner, Henrike; Niemann, Silke *et al.* (2015): Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog* 11 (4), e1004870. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004870.
- van Wamel, Willem J. B.; Rooijackers, Suzan H. M.; Ruyken, Maartje; van Kessel, Kok P. M.; van Strijp, Jos A. G. (2006): The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* 188 (4), pp. 1310–1315. DOI: 10.1128/JB.188.4.1310-1315.2006.
- Vianzon, Vianca; Illek, Beate; Moe, Gregory R. (2017): Effect of vaccine-elicited antibodies on colonization of *Neisseria meningitidis* serogroup B and C strains in a human bronchial epithelial cell culture model. *Clin Vaccine Immunol*. DOI: 10.1128/CVI.00188-17.
- Washburn, R. S.; Marra, A.; Bryant, A. P.; Rosenberg, M.; Gentry, D. R. (2001): rho is not essential for viability or virulence in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 45 (4), pp. 1099–1103. DOI: 10.1128/AAC.45.4.1099-1103.2001.
- Washburn, Robert S.; Gottesman, Max E. (2011): Transcription termination maintains chromosome integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2), pp. 792–797. DOI: 10.1073/pnas.1009564108.
- Wen, Yi; Feng, Jing; Sachs, George (2013): *Helicobacter pylori* 5' ureB-sRNA, a cis-encoded antisense small RNA, negatively regulates ureAB expression by transcription termination. *J Bacteriol* 195 (3), pp. 444–452. DOI: 10.1128/JB.01022-12.

- Wertheim, Heiman F. L.; Melles, Damian C.; Vos, Margreet C.; van Leeuwen, Willem; van Belkum, Alex; Verbrugh, Henri A.; Nouwen, Jan L. (2005): The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5 (12), pp. 751–762. DOI: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4.
- Wertheim, Heiman F. L.; Vos, Margreet C.; Ott, Alewijn; van Belkum, Alex; Voss, Andreas; Kluytmans, Jan A. J. W. *et al.* (2004): Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 364 (9435), pp. 703–705. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16897-9.
- Wu, S.; Lencastre, H. de; Tomasz, A. (1996): Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase. Molecular cloning and DNA sequencing. *J Bacteriol* 178 (20), pp. 6036–6042.
- Yu, Nancy Y.; Laird, Matthew R.; Spencer, Cory; Brinkman, Fiona S. L. (2011): PSORTdb—an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea. *Nucleic Acids Res* 39 (Database issue), D241-4. DOI: 10.1093/nar/gkq1093.
- Zhang, Linsheng; Gray, Lillian; Novick, Richard P.; Ji, Guangyong (2002): Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 277 (38), pp. 34736–34742. DOI: 10.1074/jbc.M205367200.
- Zwiefka, A.; Kohn, H.; Widger, W. R. (1993): Transcription termination factor rho. The site of bicyclomycin inhibition in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 32 (14), pp. 3564–3570.

---

## ANHANG

## Abbildungen

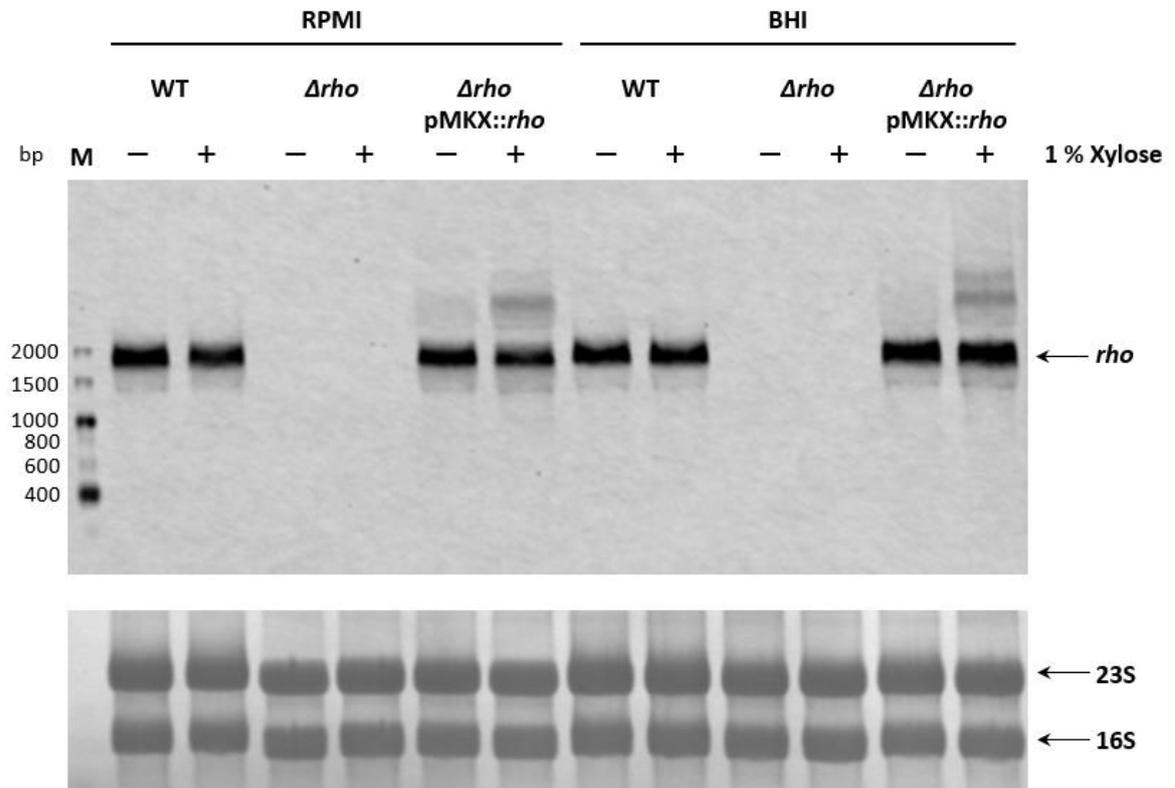


Abbildung A1 Northern Blot-Analyse des *rho*-Transkripts im *S. aureus* Wildtyp HG001, der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 und dem Komplementationsstamm ST1258 pMKX::*rho* unter Zugabe von 1 % Xylose. Die Stämme wurden in RPMI- und BHI-Medium bis zu einer OD600nm von 0,4 mit und ohne 1 % Xylose kultiviert. Es wurden 5  $\mu$ g RNA pro Spur aufgetragen. Unterhalb des Northern Blots befindet sich die Beladungskontrolle.

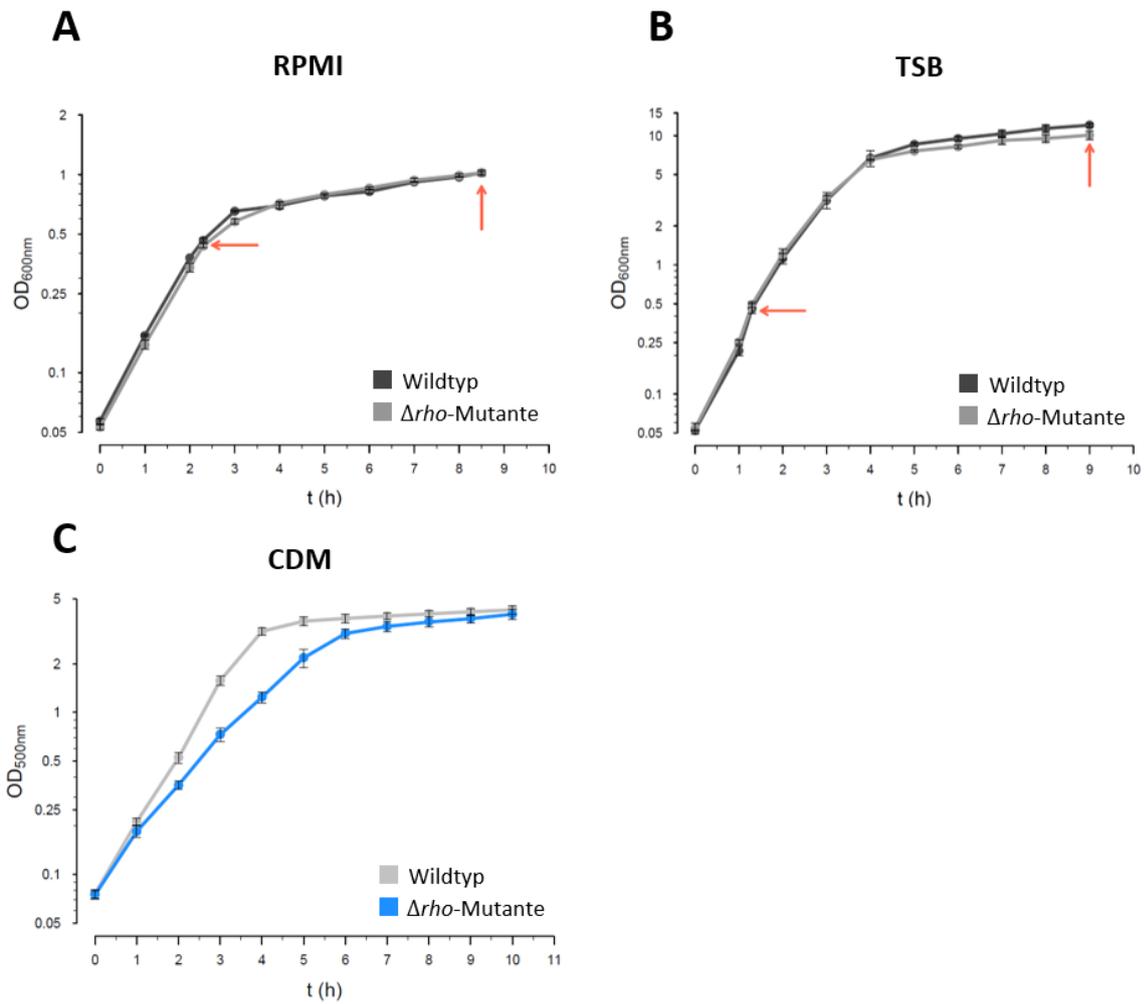


Abbildung A2 Wachstumskurven des Wildtyps HG001 und der  $\Delta\rho$ -Mutante ST1258. Dargestellt sind das Wachstum in **(A)** RPMI- und **(B)** TSB-Medium sowie in **(C)** chemisch definiertem Medium (CDM) von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung.





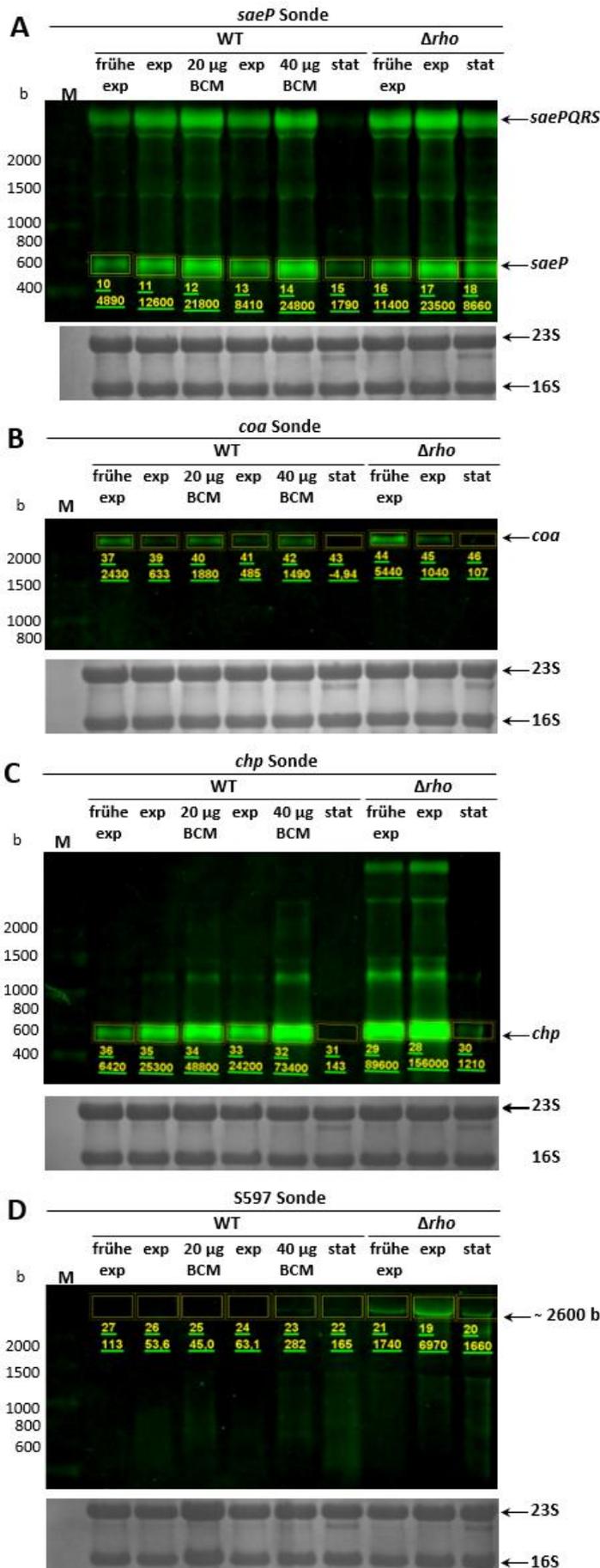


Abbildung A5 Quantifizierung der Northern Blot-Analyse der Transkripte *saeP* (A), *coa* (B), *chp* (C) und der Antisense-RNA S597 (D) unter Zugabe von 20 und 40  $\mu$ g/ml BCM. Die Stämme wurden in RPMI kultiviert, in den frühen exponentiellen Wachstumsphasen ( $OD_{600nm}$  0,2) wurden Proben vom Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 gewonnen. Die Kultur des Wildtyps wurde geteilt und ein Teil der Kultur mit 40  $\mu$ g/ml BCM versetzt. In der exponentiellen Wachstumsphase, 70 min nach Zugabe von BCM, wurden Zellen des Wildtyps und der  $\Delta rho$ -Mutante für die Analyse gewonnen. Es wurden 5  $\mu$ g RNA pro Spur aufgetragen. Unterhalb des Northern Blots befindet sich die jeweilige Beladungskontrolle.

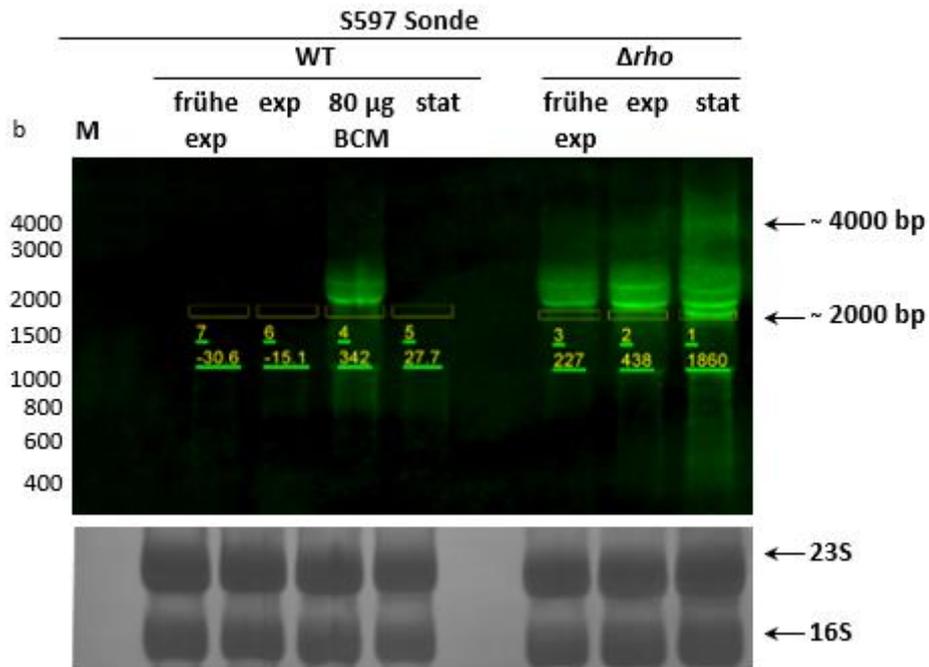


Abbildung A6 Quantifizierung der Northern Blot-Analyse der *Antisense*-RNA S597 unter Zugabe von 80 µg/ml BCM. Die Stämme wurden in RPMI kultiviert, in den frühen exponentiellen Wachstumsphasen ( $OD_{600nm}$  0,2) wurden Proben vom Wildtyp HG001 und der *Δrho*-Mutante ST1258 gewonnen. Die Kultur des Wildtyps wurde geteilt und ein Teil der Kultur mit 80 µg/ml BCM versetzt. In der exponentiellen Wachstumsphase, 70 min nach Zugabe von BCM, wurden Zellen des Wildtyps und der *Δrho*-Mutante für die Analyse gewonnen. Es wurden 7 µg RNA pro Spur aufgetragen. Unterhalb des Northern Blots befindet sich die Beladungskontrolle.

## Tabellen

Tabelle A1 Regulatoren von *S. aureus*, denen die Gene unter Nutzung von RegPrecise und AureoWiki zugeordnet wurden.

Tabelle A2 FASTA-Datei zur Analyse der Proteomdaten des *S. aureus* Wildtyps HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 sowie des Leervektor-Stammes ST1258 pMKX und des Komplementationsstammes ST1258 pMKX::*rho*.

Tabelle A3 Datensätze zur Erweiterung der Spektrenbibliothek des *S. aureus* Wildtyps HG001.

Tabelle A4 Gewichtsmessung und klinische Symptome der Mäuse während der Infektion mit verschiedenen *S. aureus*-Stämmen. Ein grau hinterlegter Wert markiert dabei Tiere, deren Infektion einen Schweregrad Level 4 (Kriterien siehe Tabelle 23) erreicht hatte, was als Endpunkt definiert wurde und somit zur Tötung der entsprechenden Tiere führte.

Tabelle A5 Proteine, die im zellulären und extrazellulären Proteom im Wildtyp HG001 und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 quantifiziert wurden. Dargestellt ist das Verhältnis von  $\Delta rho$ -Mutante zu Wildtyp der gemittelten Proteinintensitäten dreier biologischer Replikate sowie deren p-Werte. Informationen zum Regulator wurden RegPrecise und dem AureoWiki entnommen, die Lokalisation der Proteine erfolgte nach PSORTb sowieso die funktionelle Klassifizierung mittels TheSEED Datenbank.

Tabelle A6 Gene und *Antisense*-RNAs, die mittels Microarray-Analysen im Wildtyp HG001 (mit und ohne Zugabe von Bicyclomycin) und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 identifiziert wurden. Dargestellt ist das Verhältnis der relativen Expressionslevel von  $\Delta rho$ -Mutante zu Wildtyp bzw. vom Wildtyp mit Bicyclomycin gegen den unbehandelten Wildtyp.

Tabelle A7 Proteine, die im Wildtyp HG001 (mit und ohne Zugabe von Bicyclomycin) und der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 quantifiziert wurden. Dargestellt ist das Verhältnis der relativen Expressionshöhen von  $\Delta rho$ -Mutante zu Wildtyp bzw. vom Wildtyp mit Bicyclomycin gegen den unbehandelten Wildtyp der gemittelten Proteinintensitäten zweier biologischer Replikate sowie deren p-Werte. Informationen zum Regulator wurden RegPrecise und dem AureoWiki entnommen, die Lokalisation der Proteine erfolgte nach PSORTb sowieso die funktionelle Klassifizierung mittels TheSEED Datenbank.

Tabelle A8 Proteine des *S. aureus* Wildtyps HG001, der  $\Delta rho$ -Mutante ST1258,  $\Delta rho$ -Mutante ST1258 pMKX mit dem Leerplasmid und des Komplementationsstammes ST1258 pMKX::*rho* in RPMI- und TSB-Medium in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Dargestellt sind die Proteinintensitäten der Proteine des zellulären Proteoms nach Analyse in einem Daten-abhängigen Analyseverfahren.

---

## EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

---

Anna Nagel

---

## CURRICULUM VITAE

---

### Persönliche Daten

Name	Anna Nagel
Geburtsdatum	23. April 1991
Geburtsort	Neubrandenburg
Nationalität	Deutsch

---

### Ausbildung

09/1997 – 06/2001	Grundschule in Neubrandenburg
09/2001 – 07/2009	Gotthold-Ephraim-Lessing-Gymnasium, Neubrandenburg
10/2009 – 10/2012	Bachelor of Science in Humanbiologie Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald Titel: "Bestimmung der Größe bakterieller Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie"
10/2012 – 01/2015	Master of Science in Humanbiologie Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald Title: "Untersuchungen zur physiologischen Rolle des Transkriptionsterminationsfaktors Rho in <i>Staphylococcus aureus</i> "

---

### Internship

08/2012 – 10/2012	Institut für experimentelle Tumorforschung Sektion für Molekulare Onkologie im Krebszentrum Nord-CCC, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel
-------------------	---

---

### Promotionsarbeit

seit 01/2015	Promotionsstudent am Center for Functional Genomics of Microbes, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Abteilung Funktionelle Genomforschung, Universitätsmedizin Greifswald
--------------	---

---

Anna Nagel

## PUBLIKATIONEN

### Fachzeitschriftenartikel

**Anna Nagel**, Stephan Michalik, Michel Debarbouille, Tobias Hertlein, Manuela Gesell Salazar, Hermann Rath, Tarek Msadek, Knut Ohlsen, Jan Maarten van Dijl, Uwe Völker, Ulrike Mäder (2018) Inhibition of Rho Activity Increases Expression of SaeRS-Dependent Virulence Factor Genes in *Staphylococcus aureus*, Showing a Link between Transcription Termination, Antibiotic Action, and Virulence

mBio 9:e01332-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01332-18>.

### Beiträge zu wissenschaftlichen Konferenzen

#### Vorträge

**Anna Nagel**, Pierre Nicolas, Michel Debarbouille, Stephan Michalik, Tobias Hertlein, Maren Depke, Cyprien Guerin, Aurelia Hiron, Magdalena M. van der Kooi-Pol, Laura M. Palma Medina, Annette Murr, Jan Pané-Farré, Michael Hecker, Knut Ohlsen, Tarek Msadek, Jan Maarten van Dijl, Uwe Völker, and Ulrike Mäder

Insights into the role of the transcription termination factor Rho of *Staphylococcus aureus*

“1th Summerschool “Infection Biology”” 28.09.-30.09.2016, Greifswald, Deutschland

**Anna Nagel**, Pierre Nicolas, Michel Debarbouille, Cyprien Guerin, Stephan Michalik, Maren Depke, Tobias Hertlein, Aurelia Hiron, Annette Murr, Jan Pané-Farré, Magdalena M. van der Kooi-Pol, Ewoud Reilman, Philippe Bessières, Knut Ohlsen, Michael Hecker, Tarek Msadek, Jan Maarten van Dijl, Uwe Völker, Ulrike Mäder

Inhibition of the transcription termination factor Rho by bicyclomycin affects expression of SaeSR-dependent virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*

“MICROBIOLOGY AND INFECTION 2017, 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM” 05.03.-08.03.2017, Würzburg, Deutschland

**Anna Nagel**, Stephan Michalik, Pierre Nicolas, Michel Debarbouille, Cyprien Guerin, Maren Depke, Tobias Hertlein, Manuela Gesell Salazar, Jan Pané-Farré, Philippe Bessières, Knut Ohlsen, Michael Hecker, Tarek Msadek, Jan Maarten van Dijl, Uwe Völker, Ulrike Mäder

Inhibition of the transcription termination factor Rho by bicyclomycin affects expression of SaeSR-dependent virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*

“1st International Conference on Respiratory Pathogens (ICoRP)” 01.11.-03.11.2017, Rostock, Deutschland

### Poster

**Anna Nagel**, Pierre Nicolas, Michel Debarbouille, Cyprien Guerin, Stephan Michalik, Maren Depke, Tobias Hertlein, Aurelia Hiron, Annette Murr, Jan Pané-Farré, Magdalena M. van der Kooi-Pol, Ewoud Reilman, Philippe Bessières, Knut Ohlsen, Michael Hecker, Tarek Msadek, Jan Maarten van Dijl, Uwe Völker, Ulrike Mäder

Insights into the role of the transcription termination factor Rho of *Staphylococcus aureus*

“VAAM Jahrestagung 2016” 13.03.-16.03.2016, Jena, Deutschland

**Hermann Rath**, **Anna Nagel**, Tamara Hoffmann, Jan Pané-Farré, Praveen K. Sappa, Leif Steil, Erhard Bremer, Ulrike Mäder, Uwe Völker

Glycine betaine influences the cytoplasmic volume of *B. subtilis* cells under high-salinity conditions

“BACELL 2016” 26.04-27.04.2016, Paris, Frankreich

**Anna Nagel**, Pierre Nicolas, Michel Debarbouille, Stephan Michalik, Tobias Hertlein, Maren Depke, Cyprien Guerin, Aurelia Hiron, Magdalena M. van der Kooi-Pol, Laura M. Palma Medina, Annette Murr, Jan Pané-Farré, Michael Hecker, Knut Ohlsen, Tarek Msadek, Jan Maarten van Dijl, Uwe Völker, and Ulrike Mäder

Insights into the role of the transcription termination factor Rho of *Staphylococcus aureus*

“3rd International Conference on the Pathophysiology of Staphylococci” 15.09.-17.09.2016, Tübingen, Deutschland

**Anna Nagel**, Pierre Nicolas, Michel Debarbouille, Cyprien Guerin, Stephan Michalik, Maren Depke, Tobias Hertlein, Aurelia Hiron, Annette Murr, Jan Pané-Farré, Magdalena M. van der Kooi-Pol, Ewoud Reilman, Philippe Bessières, Knut Ohlsen, Michael Hecker, Tarek Msadek, Jan Maarten van Dijl, Uwe Völker, Ulrike Mäder

Inhibition of the transcription termination factor Rho by bicyclomycin affects expression of SaeSR-dependent virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*

“19th International Conference on Bacilli & Gram-Positive Bacteria” 11.06.-15.06.2017, Berlin, Deutschland

Tobias Warnemünde, Stephan Michalik, Annette Murr, Stephan Fuchs, **Anna Nagel**, Frank Schmidt, Ulrike Mäder and Uwe Völker

Highly sensitive detection of adaptation in *Staphylococcus aureus* applying chemical tagging of newly synthesized proteins

“HUPO 2017 | 16th Human Proteome Organisation World Congress” 17.09.-21.09.2017, Dublin, Irland

präsentierender Autor

## DANKSAGUNG

*"Es kommt in der Welt vor allem auf die Helfer an - und auf die Helfer der Helfer."*

Albert Schweizer

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Uwe Völker für die Möglichkeit an diesem sehr interessanten Thema zu arbeiten und für die zahlreichen hilfreichen Diskussionen bedanken. Ebenfalls möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe vielfältige Methoden erlernen zu dürfen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Ulrike Mäder, die mich bereits während meiner Bachelor- und Masterarbeit unterstützt hat und mir während der Promotion ebenfalls stets mit Rat zur Seite stand. Durch Ihre geduldige Art, die unendlich vielen Anregungen, Vorschläge und Korrekturen wurde diese Arbeit maßgeblich vorangetrieben.

Stephan Michalik danke ich für die große Hilfe bei der Auswertung der MS-Daten und der Erweiterung meines Horizonts, was das Erstellen von Abbildungen mit R angeht.

Dr. Manuela Gesell Salazar und Annette Murr danke ich für die Messung meiner zahlreichen MS-Proben.

Bei Hermann Rath, Anja Wiechert und Marc Schaffer möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Microarray- und Northern Blot-Analysen bedanken.

Dr. Alexander Reder und Dr. Henrike Pförtner danke ich für die Hilfe bei der Konstruktion der GFP-optimierten *S. aureus*-Stämme und ihre zahlreichen Anregungen bei der Planung der Experimente.

Ich danke weiterhin den Kooperationspartnern der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, namentlich PD Dr. Knut Ohlsen und Dr. Tobias Hertlein für die Durchführung der *in vivo*-Infektionsexperimente. Ebenso möchte ich mich bei Michel Debarbouille und Tarek Msadek vom Institut Pasteur Paris für die Bereitstellung der  $\Delta\rho$ -Mutante, der  $\Delta\rho$ -Mutante mit dem Leerplasmid und des Komplementationstammes bedanken.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch dem Gradiertenkolleg 1870 „Bacterial Respiratory Infections“ und der DFG für die Bereitstellung der Mittel für dieses Projekt.

Ich möchte mich auch bei den großartigen Kollegen der Funktionellen Genomforschung bedanken ohne die das Arbeiten nur halb so schön und halb so erfolgreich gewesen wäre. Besonders bei

Alexander Ganske, Beatrice Engelmann, Denise Dittmar, Georg Homuth, Janine Golchert, Katrin Schoknecht, Katrin Stark, Kirsten Bartels, Kristin Surmann, Maren Depke, Mathilda Guerin, Petra Hildebrandt, Sophie Eisenlöffel, Tanja Meyer und Ulrike Lissner.

Auch möchte ich nicht die Freunde vergessen, die mich außerhalb des Instituts unterstützt haben. Dabei danke ich besonders Annett Juretzko, Nicole Normann und Julia Ickler sowie Julia Freyer, die mich daran erinnern haben, dass es noch eine Welt außerhalb des Labors gibt.

Ebenso danke ich Sascha Blankenburg, der immer mit viel Liebe und Verständnis für mich da war und dafür gesorgt hat, dass ich das Ziel vor Augen nicht verliere.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern und Großeltern. Bei Euch möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken, dass Ihr mich in all der Zeit immer unterstützt habt und stets an mich geglaubt habt. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen.