
Untersuchung zellulärer Effekte von zellwandsynthesehemmenden Antibiotika

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Dominik Brajtenbach
aus
Köln

Bonn, Mai 2025

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Gutachter/Betreuer: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck

Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel

Tag der Promotion: 18.07.2025

Erscheinungsjahr: 2025

Zusammenfassung

Die Antibiotikakrise erschwert seit Jahren den effektiven Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe. Inzwischen werden Breitbandantibiotika eingesetzt, die ursprünglich als Reserve gegen multiresistente Erreger vorgesehen waren. Um dieser Entwicklung zu begegnen, ist ein tiefgreifendes Verständnis sowohl der Wirkmechanismen der Antibiotika als auch der grundlegenden Funktionsweise und Proliferation von Bakterien von entscheidender Bedeutung.

Für die Beobachtung zellulärer Effekte wurden zwei Typen zeitaufgelöster, fluoreszenzmikroskopischer Experimente entwickelt, um Effekte von Zellwandsynthesehemmenden Antibiotika auf *Staphylococcus aureus* zu beobachten. Diese Experimente gestatten Einblicke in kurzfristig auftretende Effekte der Antibiotika und eine längerfristige Beobachtung der Bakterien. Beide Experimententypen ermöglichen die Beobachtung des Verhaltens einzelner Bakterien sowie die Visualisierung und Auswertung ihrer Veränderungen. Eine wesentliche Besonderheit der Experimente war die Immobilisierung der Bakterien über Antikörper, die von Zellwandproteinen gebunden werden.

Im ersten Experimenttyp wurden *S. aureus*-Zellen über einen Zeitraum von unter zwei Stunden beobachtet, wobei Antibiotika während der laufenden Aufnahme appliziert wurden. Die Beobachtung der fluoreszenzmarkierten Proteine FtsZ und PBP2 in *S. aureus* ermöglichte die Feststellung, dass die Glykopeptid-Antibiotika Vancomycin und Telavancin den Schließprozess des Septums von *S. aureus* mit höchster Effizienz inhibieren. Zudem konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Zellwandsynthese bei *S. aureus* zu jedem Zeitpunkt essenziell für den Schließprozess ist. Darüber hinaus konnte unter dem Einfluss des Beta-Laktams Oxacillin festgestellt werden, dass die richtige Lokalisierung von PBP2 in *S. aureus* bei der Schließung des Septums von entscheidender Bedeutung ist. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Oxacillin das PBP2 nicht aktiv delokalisiert, sondern den Rekrutierungsprozess des Proteins zum Septum hin hemmt.

Die längerfristige Beobachtung von *S. aureus* im zweiten Experimenttypus ermöglichte die Untersuchung persistenter Bakterien nach Behandlung mit dem Beta-Laktam Oxacillin. Die Realisierung des Experiments erfolgte durch einen kontinuierlichen Austausch des Probenvolumens mit frischem Medium. Persistente Bakterien zeigen eine Toleranz gegenüber tödlichen Konzentrationen einiger Antibiotika. Sie bilden eine Subpopulation der behandelten Population, die allerdings keine genetische Variante darstellt. Die längerfristige Beobachtung ermöglichte eine Einordnung des Verhaltens einzelner persistenter Bakterien und die Untersuchung von Unterschieden zur gesamten Population. Eine Vermessung der Z-Ringe ergab, dass die Bakterien sich in einer ähnlichen Teilungsphase befinden. Es konnte zudem festgestellt werden, dass sich nahezu alle persistenten Bakterien erst nach der Zugabe des Antibiotikums geteilt haben. Die vorliegende Beobachtung stützt die Hypothese, dass persistente Bakterien sich bei der Zugabe des Antibiotikums in einer bestimmten Teilungsphase befinden müssen. Es erscheint nötig, dass die Bakterien in der Lage sein müssen eine bestimmte Phase nach der Teilung zu erreichen, nachdem sie mit Oxacillin in Kontakt kommen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung	7
1.1. Antibiotika und Bakterien	7
1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.1.2. Zellwand und Zellwandbiosynthese von <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.1.3. Der Teilungsprozess von <i>Staphylococcus aureus</i> und die Proteinorganisation des Zellwandsyntheseapparats	10
1.1.4. Bedeutung des Zellwandabbaus.....	12
1.1.5. Zellwandsynthesehemmende Antibiotika	13
1.1.6. Persistenz und persistierende Bakterien.....	15
1.1.7. Oberflächenprotein A.....	16
2. Motivation und Zielsetzung	17
3. Physikalische Grundlagen	19
3.1.1. Fluoreszenzmikroskopie und HILO-Beleuchtung.....	19
3.1.2. Punktspreizfunktion und Dekonvolution.....	20
3.1.3. Phasenkontrast.....	21
4. Material und Methoden	23
4.1. Material	23
4.1.1. Chemikalien	23
4.1.2. Spezielle Verbrauchsmaterialien	24
4.1.3. Geräte, Bauteile und optische Elemente	24
4.1.4. Stammlösungen, Medien und Puffer	26
4.1.5. Programme und Erweiterungen	26
4.1.6. Bakterienstämme	27
4.2. Versuchsaufbau	28
4.2.1. Aufbau des inversen Mikroskops	28
4.2.2. Vermessung von Nanopartikeln	32
4.2.3. Einfluss der 60-Fachen Aufweitung des Anregungslaserstrahls.....	33
4.2.4. Inkubationseinsätze für zeitaufgelöste Experimente mit Bakterien und Austausch des Probenvolumens	33
4.2.5. Pumpsystem	36
4.2.6. Messung der Temperaturstabilität.....	37
4.2.7. Austausch des Probenvolumens	39

4.3.	Versuchsprotokolle	41
4.3.1.	Lagerung und Vorbereitung der Bakterienkulturen	41
4.3.2.	Vorbereitung zeitaufgelöster Experimente	41
4.3.3.	Zeitaufgelöste Experimente mit einfachem Volumenaustausch	42
4.3.4.	Zeitaufgelöste Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch	45
4.3.5.	Reinigung der wiederverwendbaren Materialien nach zeitaufgelösten Experimenten	48
4.4.	Datenverarbeitung und Auswertung	49
4.4.1.	Experimente mit einfachem Volumenaustausch	49
4.4.2.	Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch	56
5.	Ergebnisse	65
5.1.	Charakterisierung und Evaluation des Versuchsaufbaus	65
5.1.1.	Die Punktspreizfunktion des Mikroskops	65
5.1.2.	Auflösungsgrenzen	67
5.1.3.	Intensitätsverteilung und gleichmäßige Beleuchtungsintensität	68
5.1.4.	HILO-Beleuchtung im GFP-Kanal	70
5.1.5.	Lösungsaustausch	72
5.1.6.	Temperaturstabilität der Inkubationseinsätze	74
5.2.	Effekte von zellwandsynthesehemmenden Antibiotika auf FtsZ und PBP2	78
5.2.1.	Kontrollexperimente zur Einschätzung der zeitaufgelösten Experimente	78
5.2.2.	Einfluss der Antibiotika auf die FtsZ-Ringgrößendynamik	80
5.2.3.	Einfluss der Antibiotika auf die PBP2-Lokalisierung	86
5.2.4.	Effekte der Antibiotika auf die Z-Ringgrößendynamik und PBP2-Lokalisierung	88
5.3.	Untersuchung persistierender <i>Staphylococcus aureus</i> -Zellen	89
5.3.1.	Test des Einsatzes für einfachen Volumenaustausch und Veränderung des Versuchsprotokolls	89
5.3.2.	Überlebenswahrscheinlichkeit nach Zugabe von Oxacillin	93
5.3.3.	Z-Ringgröße persistenter Bakterien während der Zugabe von Oxacillin	93
5.3.4.	Teilungszeitraum persistenter und nicht überlebender Bakterien unter Oxacillinzugabe ...	95
6.	Diskussion	97
6.1.	Einfluss der eingesetzten Methoden auf die Experimente mit <i>Staphylococcus aureus</i>	97
6.1.1.	Auflösung und Kontrast profitieren von der Dekonvolution	97
6.1.2.	Die homogene HILO-Beleuchtung ermöglicht Experimente mit fluoreszierenden Nährmedien	98
6.1.3.	Ein vollständiger Austausch des Probenvolumens ist möglich	98

6.1.4.	Die Verwendung einer Objektivheizung und einer Abdeckung verbessern die Temperaturstabilität	99
6.1.5.	Die entwickelten Versuchsprotokolle eignen sich zur Kultivierung von <i>Staphylococcus aureus</i> auf dem Mikroskop	99
6.1.6.	Wieso mikrofluidische Systeme keine Verwendung fanden	100
6.2.	Beobachtete zelluläre Effekte der Antibiotika auf <i>Staphylococcus aureus</i>	101
6.2.1.	Antibiotika wirken sich unterschiedlich auf die Z-Ringgrößendynamik aus	101
6.2.2.	Oxacillin hindert den Rekrutierungsprozess von PBP2 zum Septum	102
6.2.3.	Einfluss von Vancomycin, Telavancin und Oxacillin auf den Teilungszyklus von <i>Staphylococcus aureus</i>	103
6.2.4.	Die optimierte Auswertung ist effizienter und bildet die Gesamtpopulation besser ab	104
6.2.5.	Notwendigkeit der Klassifizierung zur differenzierten Wirkungserfassung	105
6.3.	Einblicke in die Persistenz von <i>Staphylococcus aureus</i>	106
6.3.1.	Ein kontinuierlicher Volumenaustausch stabilisiert die Sterberate	106
6.3.2.	Die überlebenden Bakterien befinden sich in einer ähnlichen Teilungsphase	107
6.3.3.	Persistierende <i>Staphylococcus aureus</i> -Zellen müssen sich vermutlich teilen, um zu überleben	108
6.3.4.	Beta-Laktam-induzierter Zelltod durch PG-Hydrolasen	108
6.3.5.	Persistierende Bakterien überleben nur durch Zufall	109
7.	Fazit und Ausblick	111
8.	Anhang	113
	Abkürzungsverzeichnis	119
	Abbildungsverzeichnis	121
	Tabellenverzeichnis	123
	Literaturverzeichnis	125
	Danksagung	139

1. Einleitung

1.1. Antibiotika und Bakterien

Seit ihrer ersten breiten klinischen Anwendung in den 1940er Jahren stellen Antibiotika einen grundlegenden Baustein moderner medizinischer Maßnahmen dar.¹ Sie verringern das Risiko von Infektionen bei invasiven Eingriffen oder helfen, zuvor tödliche Infektionen und Krankheiten zu bekämpfen.^{2,3} Darüber hinaus ermöglichen sie Hochrisikoeingriffe und erleichtern das Leben von Patienten mit geschwächtem Immunsystem.² In diesem Zusammenhang ist festzuhalten, dass Antibiotika das Gebiet der Medizin grundlegend verändert haben und weitreichende Auswirkungen auf dieses haben.³⁻⁵ Seit des ersten massengefertigten Antibiotikums Penicillin wurden weitere Gruppen der Antibiotika vor allem um die Mitte des letzten Jahrhunderts herum erforscht und entdeckt. Aus diesem Grund wird der Zeitraum der 1950 bis 1970er Jahre als „goldenes Zeitalter“ (engl. „*golden age*“) bezeichnet.⁴⁻⁸ Trotz dieses Kurses stagniert die Entwicklung neuartiger und wirksamer Verbindungen gegen Mikroorganismen seit Jahrzehnten.² Dieser Zusammenhang hat wiederum erschreckende Auswirkungen im Kontext der weltweit wirkenden Antibiotikakrise. Wenn sich nichts an der bisherigen Herangehensweise ändert, werden wirtschaftliche Schäden in Höhe von 1 Billionen Dollar und jährlich Todeszahlen von 10 Millionen bis 2050 im Kontext der Antibiotikakrise prognostiziert.⁹ ¹⁰ Die Zunahme resistenter Erreger bedingt eine erhöhte Notwendigkeit wirksamer Antibiotika. Dies stellt damit eine Bedrohung für den Stand der modernen Medizin und ein globales Problem dar.^{2, 5, 11}

Die Gruppe der Antibiotika umfasst eine Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen, die teilweise ihren Ursprung in einer Reihe von Organismen, wie Pilzen oder konkurrierenden Bakterien, haben. Andere Verbindungen wurden auf semi-synthetischen, von der Natur inspirierten oder vollsynthetischen Wegen gewonnen.^{4, 6} Die Verbindungen werden typischerweise nach ihrer Zielstruktur oder ihrer chemischen Zusammensetzung gruppiert. Die von Antibiotika beeinflussten Zielstrukturen finden sich üblicherweise in Mechanismen wieder, die nicht oder in abgewandelter Form in Eukaryoten vorhanden sind.¹²⁻¹⁵ Ein bedeutendes Beispiel ist das erste in Massen produzierte und verabreichte Antibiotikum Penicillin, welches Zellwandsyntheseprozesse stört.¹⁶ Es gehört zu der Gruppe der Beta-Laktam-Antibiotika, deren strukturelles Merkmal der namensgebende Beta-Laktam-Ring ist. Sie imitieren die Struktur der Transpeptidase-Bindungstasche und verhindern somit die Transpeptidaseaktivität der PBPs (Penicillin-bindenden Proteine).¹⁷⁻²⁰ Die PBPs sind für den Aufbau und die Vernetzung der Zellwand zuständig.^{21, 22}

Infolge des evolutionären Drucks, der durch derartige Eingriffe in die essenziellen Funktionen der Bakterien ausgeübt wird, entwickeln Bakterien Mechanismen, die sie gegen ebenjene Antibiotika schützen.^{20, 23, 24} Zu den beobachteten Resistenzmustern zählen beispielsweise Veränderungen in den Zielproteinen,²⁰ welche inhibiert werden sollen, die Extraktion der Antibiotika mittels Proteinpumpen aus dem Zytoplasma²⁵ oder die Spaltung der Antibiotika mittels Enzymen.²⁰ Diese Mechanismen betreffen in ihrer Natur meist ganze Antibiotikagruppen. Der Anstieg der Zahl antibiotikaresistenter oder gar multiresistenter Keime stellt heutzutage eine Krise dar, in deren Kontext jährlich Millionen von Menschen sterben. Der Umstand, dass die Mehrzahl der gegenwärtig eingesetzten Antibiotika auf die Gruppen zurückzuführen sind, die während des sogenannten „goldenen Zeitalters“ entdeckt wurden,^{8, 7, 1} trägt zur Dramatisierung der Situation bei. Die Forschung an neuen Antibiotika mit innovativen Wirkmechanismen ist hoch gefragt, dennoch ist die Anzahl der Verbindungen und Therapien, welche in sich in der klinischen Prüfungen befinden, verschwindend gering.^{26, 27}

1.1.1. *Staphylococcus aureus*

Diese Arbeit beschäftigt sich vorwiegend mit dem grampositiven Prokaryoten *Staphylococcus aureus*, einem fakultativ pathogenen Erreger.²⁸ Seine Erscheinungsform wird als kugelförmig beschrieben und seine Größe beträgt üblicherweise zwischen 0,8 und 1,2 µm. *S. aureus* ist bei ca. 30 % der erwachsenen Bevölkerung in der Nasenschleimhaut oder bei ca. 20 % auf der Haut zu finden.^{29, 30} Im Jahr 2019 wurden über eine Millionen Todesfälle mit *S. aureus* in Verbindung gebracht, die auf Infektionen zurückzuführen waren. Er war in 135 Ländern die führende bakterielle Todesursache. Im selben Jahr waren antibiotikaresistente Varianten für die drittmeisten Todesfälle im Kontext von Infektionskrankheiten verantwortlich, wobei nur *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* eine höhere Zahl aufwiesen.³¹

Ein besonderes Gefahrenpotenzial von *S. aureus* liegt darin, dass die weltweit am weitesten verbreitete resistente Variante gegenüber Beta-Laktamen unempfindlich ist. Dieser Phänotyp wird auch als Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) bezeichnet.⁵ Dadurch wird diese Gruppe der Antibiotika, die mit einem Anteil von 60 % die am häufigsten verabreichte Gruppe darstellt, praktisch unwirksam.^{7, 8} Besonders besorgniserregend ist die Tatsache, dass die Zahl der Todesfälle, die direkt mit MRSA assoziiert wurden, seit 1990 um mehr als das Doppelte angestiegen ist.³¹

1.1.2. Zellwand und Zellwandbiosynthese von *Staphylococcus aureus*

Die Zellwand und seine Biosynthese sind attraktive Zielmechanismen von Antibiotika in Bakterien.^{22, 32} Die Zellwand ist ein zentraler Aspekt, der Bakterien, wie *S. aureus*, von vielen anderen Organismen unterscheidet. Sie bilden eine Zellwand außerhalb der zytoplasmatischen Membran, die als äußerste Schutzschicht bei grampositiven Bakterien fungiert. Gramnegative Bakterien bilden zusätzlich zur zytoplasmatischen Membran eine weitere äußere Membran um die Zellwand herum aus.³³ Die Hauptaufgabe der Zellwand besteht darin die bakterielle Membran strukturell entgegen dem osmotischen Druck, welcher von innen nach außen wirkt, zu stabilisieren und zu unterstützen.^{34–36} Die Zellwand des grampositiven Bakteriums *S. aureus* ist 20 nm bis 30 nm stark³⁷ und bildet eine dicke Schicht aus Peptidoglykan (PG) um die Zelle herum.^{34, 38–40}

Das PG setzt sich aus Polysaccharidsträngen zusammen, die aus alternierenden Zuckermolekülen bestehen. Diese sind wiederum über Peptidbrücken quervernetzt. Bei *S. aureus* handelt es sich bei den Saccharidsträngen um alternierender N-Acetylmuraminsäure(MurNAc)- und N-Acetylglucosamin(GlcNAc)-Gruppen. Die MurNAc-Gruppe ist an der Carboxygruppe mit dem Pentapeptid L-Ala–D-iso-Gln–L-Lys–D-Ala–D-Ala aminiert, während die ε-aminogruppe des Lysins einen Pentaglycin-Rest trägt.^{21, 22, 36, 41}

die essenziellen Proteine FtsW^{56–58} und PBP2^{59, 60} und die nicht essenziellen Proteine RodA⁶¹ und SgtA und SgtB^{62–65} zu den TGasen gezählt. Im Rahmen der TGase-Reaktion kommt es zur Abspaltung des Lipidankers C₅₅P und dessen erneuter Bereitstellung. Des Weiteren werden die Zuckerdimere über glykosidische Bindungen verbunden. Die wiederholte Durchführung der Reaktion führt zur Bildung der Polysaccharidstränge.^{58, 60, 62} Die Quervernetzung der Stränge erfolgt mittels der TPasen, die den Pentaglycinbrücken-Terminus mit dem D-Ala-D-Ala-Terminus verbindet. Bei *S. aureus* werden die vier PBPs (PBP1 bis PBP4, Penicillin-bindende Proteine, engl. *penicillin binding proteins*) den TPasen zugeordnet, wobei PBP1 und PBP2 als essenziell und PBP3 und PBP4 als nicht essenziell klassifiziert werden.^{63, 66–72} Unter den PBPs ist PBP2 die einzige bifunktionale TPase mit TGase-Aktivität und wurde als die Hauptpeptidoglykan-Synthase von *S. aureus* beschrieben.⁷³ Gerade die TPase-Aktivität der PBPs wird in ihrer Funktion von Beta-Laktamen gehindert,^{16, 19, 20, 74} was die Beobachtung von PBP2 besonders interessant macht.

Im Gegensatz zu den ersten Schritten der beschriebenen Zellwandsynthese, müssen die TPasen und TGasen ein komplexes zellkörperumspannendes Molekül erzeugen. Aus diesem Grund treten TPasen oft zusammen mit TGasen in makromolekularen Komplexen auf. Dies ist bei PBP1-FtsW und PBP3-RodA der Fall. Alternativ tragen sie beide Funktionen in sich selbst, wie es bei PBP2 der Fall ist, um einen fließbandähnlichen Ablauf zu ermöglichen.^{57, 75, 76}

1.1.3. Der Teilungsprozess von *Staphylococcus aureus* und die Proteinorganisation des Zellwandsyntheseapparats

Die Zellwandbiosynthese sowie die Zellteilung sind für Bakterien essenzielle Prozesse, die in zahlreichen Bakterien, darunter auch *S. aureus*, eng miteinander verknüpft sind. So findet auch die Peptidoglykansynthese (PGS) vorwiegend in der sich abschnürenden Ebene, dem Zellteilungsseptum, statt.^{73, 77–80} Dabei wird frisches Zellwandmaterial zwischen den sich bildenden Tochterzellen aufgebaut, wodurch sich die Tochterzellen nach Fertigstellung des Septums trennen können.^{73, 80, 77, 78} Für diesen Prozess ist eine Vielzahl von Proteinen erforderlich, die entweder selbst an der PGS beteiligt sind oder für die Koordination und Regulation des Teilungsprozesses notwendig sind.^{57, 71–73, 76, 78, 81–87} Daher finden sich auch viele Proteine, die für die letzten Schritte der PGS nach der Synthese von Lipid II zuständig sind, während des Abschnürens des Septums nahezu ausschließlich am Septum wieder.⁷³ Das Abschnüren des Septums wird oft als Septumprogression bezeichnet.

Im Hinblick auf die bakterielle Zellteilung sowie das Zellteilungsseptum ist das zytoplasmatische Protein FtsZ von zentraler Relevanz. FtsZ-Filamente werden an einem Ende aufgebaut und an dem anderen Ende abgebaut. Dieser Prozess wird durch die Guanosintriphosphat-Hydrolaseaktivität (GTPase-Aktivität) von FtsZ angetrieben und führt zu einer scheinbaren Kreisbewegung der Filamente. Diese Bewegung, auch als englisch „Treadmilling“ oder Tretmühlenmechanismus bezeichnet, erfolgt äquatorial auf zytoplasmatischer Seite der Zellmembran und kann schließlich zur Kondensierung eines Z-Rings führen. Der kondensierte Z-Ring fungiert als Grundgerüst für die PGS und Septumbildung und kann daher sehr gut als Referenzstruktur der Septumprogression verwendet werden.^{73, 80, 88–91} Die korrekte Bildung und nachfolgende Regulation des Z-Rings wird von mehr als 17 Proteinen in *S. aureus* beeinflusst. Daher spielt auch die Reorganisation von relevanten Proteinen zu definierten Zeitpunkten eine Rolle.^{78, 92, 79, 93, 86} Beispielsweise werden die TPasen-TGasen-Paare PBP1-FtsW und PBP3-RodA früh im Teilungsprozess zum Septum bewegt. Für PBP1-FtsW

konnte nachgewiesen werden, dass es für die korrekte Platzierung des Z-Rings und die frühe Septumbildung zuständig ist.^{72, 71, 57, 87} Dies verdeutlicht die Relevanz der präzisen Lokalisierung spezifischer Zellwandsyntheseproteine in den frühen Phasen der Zellteilung sowie das Zusammenspiel mit FtsZ während der Zellteilung. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Tretmühlenmechanismus des Z-Rings eine der treibenden Kräfte in der ersten Phase der Septumprogression ist.^{94–100} Wenn allerdings in Folge der ersten Phase an einem bestimmten Punkt die Lipid II-Flippase MurJ zum Septum hinbewegt wird, wird der Tretmühlenmechanismus in *S. aureus* redundant. Die verstärkte Lokalisierung der Flippase führt zu einem Anstieg der verfügbaren Lipid II-Menge am Septum. In der Folge steigt die PGS-Aktivität am Septum und ermöglicht die weitere Abschnürung des Septums und die Trennung der Tochterzellen auch ohne aktiven FtsZ-Tretmühlenmechanismus.⁷³

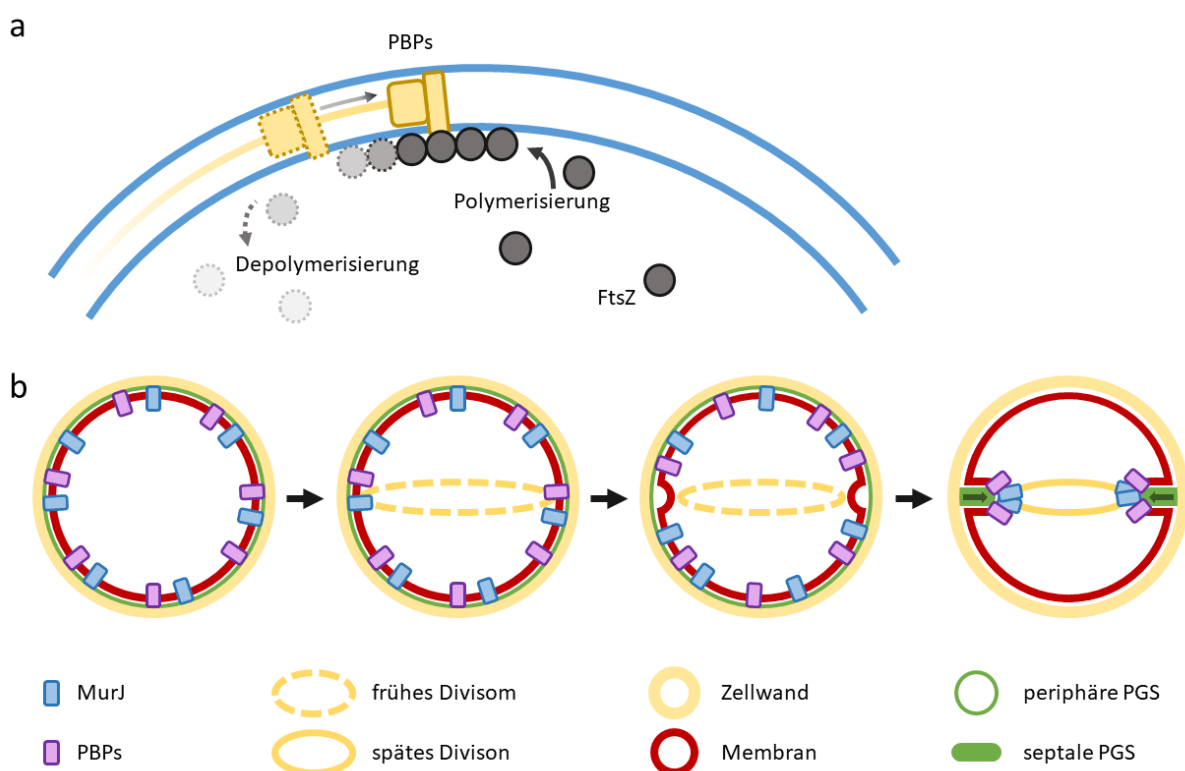


Abb. 2: Zusammenhang der Peptidoglykansynthese (PGS) mit der Zellteilung. (a) Polymerisierung und Depolymerisierung von FtsZ treibt den Tretmühlenmechanismus der FtsZ-Filamente an. Die Filamente dienen als Grundgerüst auf dem die PGS lokalisiert und stattfindet. (b) Schema der Organisation der PGS über den Teilungszyklus von *S. aureus* hinweg. Ist noch keine Teilungsebene vorhanden, lokalisieren die Proteine der PGS peripher und betreiben periphere PGS. Das frühe Divisom bildet sich und eine erste Abschnürphase des Septums findet statt, welche von den Bestandteilen des frühen Divisoms getrieben und von dem Tretmühlenmechanismus der FtsZ-Filamente abhängig ist. Die Lokalisierung des MurJ zum Septum hin leitet die Bildung des späten Divisoms ein. Zu diesem gehören auch die Proteine der Zellwandbiosynthese. Das führt zu weiterer PGS am Septum und eine von dem Tretmühlenmechanismus unabhängige Abschnürphase. ((a) Modifiziert nach Yang *et al.* 2017¹⁰¹. (b) Modifiziert nach Monteiro *et al.* 2018⁷³).

Es wird deutlich, wie eng die Aufgaben der Zellwandsynthese mit der Zellteilung selbst verknüpft sind. Nichtsdestotrotz sind zahlreiche Aufgaben der PGS-Proteine hinsichtlich der Reaktionen, die sie katalysie-

ren oder ihrer konkreten Aufgaben in der Zellteilung, nach wie vor unbekannt. Dies wiederum hat Konsequenzen für die Mechanismen und zellulären Effekte antibiotischer Wirkstoffe, welche die Zellwandsynthese hemmen und darüber hinaus auch wichtige regulatorische Mechanismen beeinträchtigen könnten.

1.1.4. Bedeutung des Zellwandabbaus

Neben der Zellwandsynthese ist die PG-Hydrolyse, also der Abbau der Zellwand, von wesentlicher Bedeutung für den korrekten Zellwandaufbau und die Zellteilung. PG-Hydrolasen katalysieren unterschiedliche Reaktionstypen, beispielsweise zerschneiden einige die Zuckerkette, während andere die Peptidbrücke auf andere Art zerschneiden.¹⁰² *S. aureus* verfügt über eine Vielzahl unterschiedlicher PG-Hydrolasen, die unterschiedlichen Aufgaben nachgehen.¹⁰³ Es wurde festgestellt, dass die Gene, die die PG-Hydrolasen kodieren, in vielen Bakterien extrem redundant vorhanden sind, wodurch die einzelnen Gene selten essenziell für die Bakterien sind.¹⁰² Die am besten charakterisierten PG-Hydrolasen, Atl und Sle1, werden primär mit der Trennung der Schwesterzellen assoziiert. Sie sollen selektiv die PG-Brücken zwischen den beiden gebildeten Zellwänden durchschneiden, wenn sie vollständig ausgebildet sind. Diese Reaktion führt zur Ausbildung eines Risses, der durch die Spannung aufgrund des osmotischen Drucks propagiert und zur Trennung der Tochterzellen führt.^{104, 105} Eine weitere Gruppe von PG-Hydrolasen, SagA, SagB, Atl und ScaH, wird mit der Ausdehnung der Zellen nach der Zellteilung in Verbindung gebracht.¹⁰⁶ LytH, eine membranständige Amidase, ist wiederum wichtig für die frühe Phase der Zellteilung und entfernt nicht vernetzte PGs. Dadurch soll die PGase- und TPase-Aktivität und die Ausdehnung der Zelle kontrolliert werden.¹⁰⁷ Um ein Gleichgewicht zwischen Abbau des PGs und Aufbau während des Wachstums oder der Teilung zu gewährleisten, wird die Aktivität der PG-Hydrolasen stark reguliert. Die Regulierung findet dabei vorwiegend auf dem Level der Transkription, der Protein-Protein-Interaktion oder der Proteolyse statt.^{108, 109} Es wird vermutet, dass genau diese Prozesse des Zellwandabbaus in Verbindung mit der Hemmung der Zellwandsynthese durch Beispielsweise Beta-Laktame zur Lyse der Bakterien führen.^{14, 110}

1.1.5. Zellwandsynthesehemmende Antibiotika

Wie in Kapitel 1.1.2 erwähnt ist die Zellwand für das Überleben von Bakterien essenziell. Aus diesem Grund stellt die Synthese der Zellwand einen außerordentlich interessanten Zielmechanismus für Antibiotika dar. Aufgrund der hohen chemischen Diversität in den Zwischenprodukten der Zellwandsynthese und Proteine existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Antibiotika, welche in diesen Metabolismus eingreifen.^{21, 22} Die Antibiotika, die in dieser Arbeit verwendet wurden, gehören zu dieser Gruppe und werden im Folgenden vorgestellt.

Glykopeptide

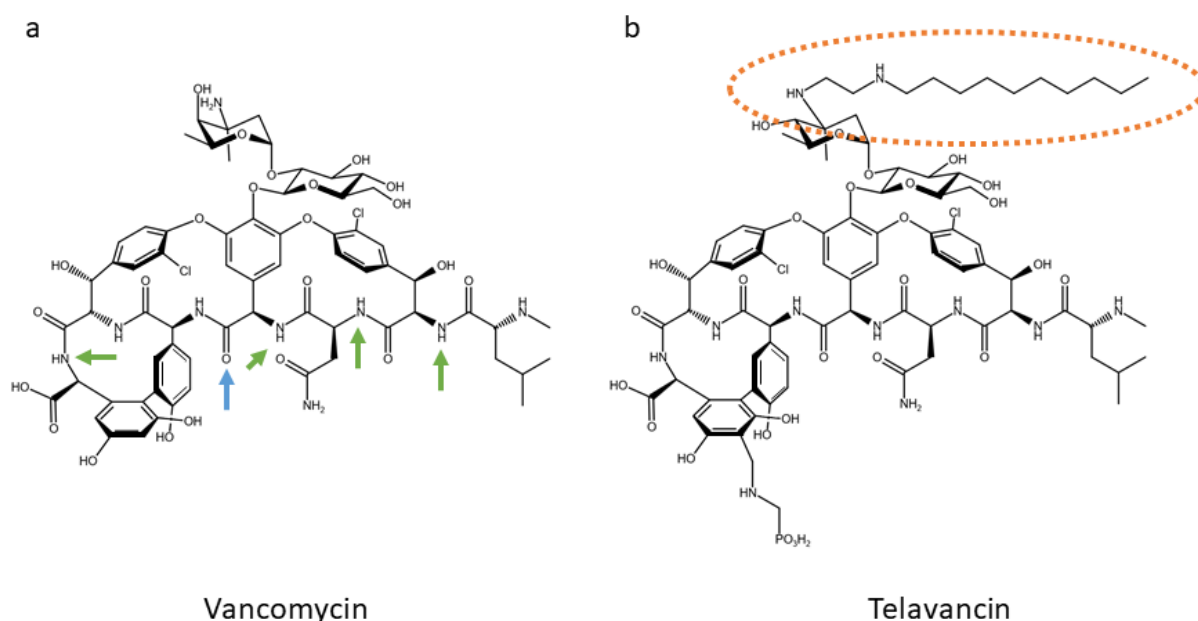


Abb. 3: Strukturformeln der Glykopeptide an zwei Beispielen. Strukturformeln der Glykopeptide Vancomycin (a) und Telavancin (b). Die Pfeile deuten auf die Stellen des Vancomycin-Moleküls, die Wasserstoffbrückenbindungen zu dem D-Ala-D-Ala-Terminus des Pentapeptids ausbilden. Die grünen Pfeile deuten negative Partialladungen an, während der blaue Pfeil eine positive Partialladung andeutet. Der gepunktete, orangene Kreis weist auf die zusätzliche Lipidgruppe hin, welche das Molekül in der Lipidschicht verankert. (Basierend auf Jensen *et al.* 2019¹¹¹ und Kirsch *et al.* 2021¹¹²)

Die Glykopeptide sind charakteristischerweise tri- oder tetracyclische Heptapeptide, die in der Regel glykosyliert sind und gelegentlich Lipidgruppen tragen.¹¹³ Im Vergleich zu Beta-Laktamen inhibieren Vancomycin und Telavancin (Abb. 3) nicht das aktive Zentrum der Enzyme, sondern verhindern sterisch, dass das Substrat an TGase- oder TPase-Reaktionen teilnimmt.^{49, 111, 114} Auf diese Weise reduzieren die meisten Glykopeptide – mit Ausnahme von Corbomycin und Complestatin – die Verfügbarkeit des Materials zum Aufbau oder zur Vernetzung des PGs.^{111, 115, 116} Das Bindungsmotiv der Glykopeptide, D-Ala-D-Ala, ist in Lipid II, in frisch synthetisiertem PG als auch bereits älterer Zellwand vorhanden. Die effektivste Hinderung wird allerdings erzielt, wenn Lipid II vor dem Einbau in die Zellwand gebunden wird. Einige *S. aureus* Stämme nutzen diesen Umstand und erzeugen dickere Zellwände mit einer verringerten Vernetzung, um Glykopeptide wie

Vancomycin weiter in den äußeren Bereichen zu binden und so die Wirksamkeit zu verringern.^{41, 117–120} In der Folge wurden Glykopeptide wie Telavancin entwickelt, welche Lipidgruppen tragen. Ihre Spezifität für Lipid II wird erhöht, da sie sich wegen der Lipidgruppen vorwiegend in der Membran wiederfinden (Abb. 3, b).^{112, 121–123}

Oxacillin

Oxacillin (5-methyl-3-phenyl-4-isoxazolyl Penicillin) ist ein Vertreter der halbsynthetischen Penicilline, die anhand des charakteristischen Beta-Laktam-Rings und ihrer Penicillin-ähnlichen Struktur klassifiziert werden können (Abb. 4). Es handelt sich bei Oxacillin um ein Methicillin-Derivat, welches Anfang der 1960er Jahre von Peter Doyle und John Naylor synthetisiert wurde.¹²⁴ Es zeichnet sich durch eine bessere Lagerstabilität und die Möglichkeit der oralen Applikation aus. Im Vergleich zu Penicillin ist sowohl bei Oxacillin als auch bei Methicillin der Abbau durch Beta-Laktamasen verringert, welche einen Resistenzmechanismus gegen viele Beta-Laktame darstellen.^{125, 126}

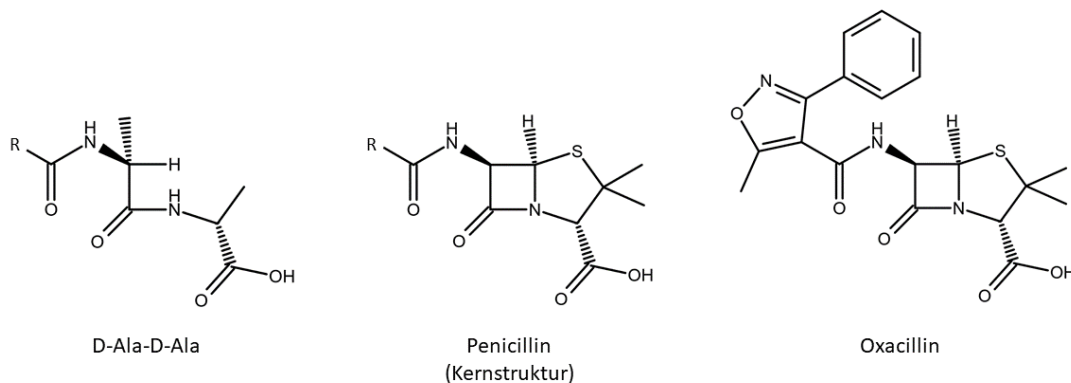


Abb. 4: Penicillin Kernstruktur und Oxacillin. Strukturformel des von Penicillinen imitierten D-Ala-D-Ala-Terminus, der Penicillin-Kernstruktur und Oxacillin. (Basierend auf Blumberg *et al.* 1971¹⁷, Eagle *et al.* 1954¹⁸ und Simon *et al.* 1962¹²⁵)

Die chemische Grundstruktur der Beta-Laktame, der sogenannte Beta-Laktam-Ring, imitiert die Struktur des D-Ala-D-Ala-Terminus des Pentapeptids. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Beta-Laktame irreversibel an das aktive Zentrum der TPasen binden.^{19, 20, 74} In der Folge wird die TPase-Aktivität aller PBPs reduziert. Wegen eines trotzdem stattfindenden Abbaus der Zellwand soll die Lyse der Bakterien stattfinden.^{14, 110}

1.1.6. Persistenz und persistierende Bakterien

Wenn Bakterienkulturen oder Infektionen mit tödlichen Konzentrationen antibiotischer Wirkstoffe behandelt werden, stirbt aufgrund des Effekts der Antibiotika ein Großteil der Bakterienpopulation. Bei der Verwendung einiger Antibiotika, wie beispielsweise den Beta-Laktamen, wird allerdings beobachtet, dass eine winzige Gruppe diese Behandlung überlebt. Das ist auch der Fall, wenn die Behandlung der Bakterien über längere Zeiträume durchgeführt wird. Dieses Phänomen wird als Persistenz und die Bakterien der überlebenden Subpopulation als persistente oder persistierende Bakterien bezeichnet.^{127, 128} Sie zeichnen sich durch einen nicht wachsenden Phänotypen und eine erhöhte Toleranz gegenüber den Antibiotika aus. Im Gegensatz zu Resistenz wird Persistenz nicht genetisch vererbt. Experimentell äußert sich die Anwesenheit persistenter Zellen in einer zweiphasigen Tötungskurve. Ein signifikanter Anteil der Zellen stirbt unmittelbar infolge der Antibiotika-Gabe, während ein geringer Anteil der Population erst deutlich später stirbt. Der zweiphasige Verlauf der Tötungskurve resultiert aus der Anwesenheit zweier Populationen die unterschiedlich schnell sterben. Wird das Antibiotikum daraufhin entfernt und die Bakterien kultiviert, ist die resultierende Population antibiotikasensibel. Das Verhalten der persistenten Zellen weicht von der Tötungskurve toleranter Zellen ab, da tolerante Bakterien eine verlangsamte Sterbegeschwindigkeit in der gesamten Population aufweisen, woraus eine einphasige Tötungskurve resultiert.¹²⁹ Zudem konnte in Einzelzellanalysen nachgewiesen werden, dass die persistenten Bakterien in einen nicht wachsenden Zustand übergehen.^{130–136} In Verbindung mit Experimenten, welche mit einer synchronisierten Kultur durchgeführt wurden, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der Mechanismus teilungsphasenabhängig ist.¹³⁷ Außerdem wurde festgestellt, dass metabolische Stressfaktoren, wie ein niedriger pH-Wert oder ein Mangel an Nährstoffen, das Wachstum der Zellen hemmen und so Persistenz induzieren können.^{130, 131, 138} Die klinische Relevanz des Auftretens persistenter Bakterien erklärt sich darüber, dass es experimentelle Hinweise darauf gibt, dass Persistenz Einfluss auf die Bildung von chronischen Infektionen und Resistenzmechanismen hat.¹³⁹

Obwohl die klinische Relevanz der Persistenz offensichtlich ist, ist erstaunlich wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen bekannt. Diese Situation ist auf zwei Faktoren zurückzuführen, die die Untersuchung persistenter Zellen deutlich erschweren. Einerseits manifestieren sich persistente Zellen nur in äußerst geringer Anzahl innerhalb der Gesamtpopulation. Oft stellen nur 10^{-6} bis 10^{-4} Zellen die Subpopulation der persistenten Bakterien dar. Aus diesem Grund wurde bereits früh daran gearbeitet den Zustand der Persistenz zu induzieren, wodurch der Anteil der persistenten Bakterien angehoben werden konnte.^{131, 137} Andererseits ist es schwierig individuelle Zellen, welche überleben von den anderen Zellen zu trennen, wenn es sich dabei um keinen genetischen Phänotypen handelt. Es können lediglich Informationen gesammelt werden, indem der Anteil persistenter Bakterien erhöht oder reduziert wird. Darüber können Schlüsse zu dem Mechanismus der Persistenz getroffen werden. Eine andere Möglichkeit sie zu untersuchen ist, sie von der Zugabe des Antibiotikums an zu beobachten und anschließend festzustellen, ob es sich um persistente Bakterien handelt.

1.1.7. Oberflächenprotein A

Neben ihrer Schutzfunktion übernimmt die Zellwand zudem die Funktion eines Gerüsts, auf dem sich weitere Moleküle und Proteine befinden, die zur Interaktion mit der Umgebung oder dem Schutz der Bakterien beitragen.^{140–144} Darunter befinden sich Proteine wie das Oberflächenprotein A (engl. *surface protein A*, SpA) und das zweite immunoglobulinbindende Protein (engl. *second binding protein of immunoglobulin*, Sbi), die dem Schutz gegen die Immunreaktion des Wirts dienen.¹⁴⁵ SpA sowie Sbi binden das kristallisierbare Fragment (engl. *Fragment crystallizable*, Fc) des humanen bzw. tierischen Immunoglobulin G-Antikörpers.^{146, 147} *S. aureus* umgeht auf diese Weise die Fc-Rezeptor-vermittelte Opsonierung und somit den Immunsysteminduzierten Zelltod.^{142, 143} Zusätzlich bindet SpA die Fab-Domäne einer Unterfamilie der Immunoglobulin M-Antikörper und löst im weiteren Verlauf den apoptotischen Kollaps in B-Lymphozyten aus.¹⁴⁴

Neben dem Verteidigungsmechanismus gibt es auch Hinweise darauf, dass *S. aureus* das Oberflächenprotein A anders nutzt. Beispielsweise soll es helfen Bakterienaggregate zu bilden, Adhäsion zu Gewebe zu gewährleisten oder die Biofilmproduktion zu fördern. Es konnte nachgewiesen werden, dass SpA bei dynamischer Scherbeanspruchung von Willebrand Faktor (vWF) bindet, welcher eine Rolle bei der Blutgerinnung spielt.^{148, 149} Dieser Prozess scheint mit der Adhäsion und Akkumulation der Bakterien an beschädigten Blutgefäßen assoziiert zu sein.^{150–152} Aus diesen Gründen könnte es dazu geeignet sein, um die Bakterien auf einer Oberfläche zu demobilisieren, um sie anschließend auf dem Mikroskop abzubilden.

2. Motivation und Zielsetzung

In Anbetracht der gegenwärtigen Antibiotikakrise besteht ein enormes Interesse daran, mehr über die Funktionsweise von Bakterien und antibiotischen Wirkstoffen zu erfahren. Eine weit verbreitete Zielstruktur unter den Antibiotika ist die Zellwandsynthese. Zahlreiche Prozesse der Zellwandsynthese als auch die Zellteilung von Bakterien sind nach wie vor nicht erforscht. *Staphylococcus aureus* eignet sich in diesem Kontext sehr gut als Modellorganismus, da *S. aureus* lediglich vier Transpeptidasen besitzt (PBP1 bis PBP4). Die Anzahl der Transpeptidasen ist demnach erheblich niedriger als die von *Escherichia coli*, die über mehr als zehn Transpeptidasen verfügt.¹⁵³ Allerdings standen zu Beginn des Projektes nur wenige Protokolle und Methoden zur Verfügung, um *S. aureus* auf dem Mikroskop zu untersuchen und gleichzeitig Antibiotika zu applizieren.

Daher war eine zentrale Motivation dieser Arbeit, mehr über die zellulären Effekte von zellwandsynthesehemmenden Antibiotika auf *S. aureus* in fluoreszenzmikroskopischen Experimenten in Erfahrung zu bringen. Das sollte erreicht werden, indem ein Aufbau und eine Auswertung entwickelt und realisiert werden, die sich nahe der Standards für Experimente der Antibiotikasuszeptibilitätsprüfung¹⁵⁴ (basierend auf den Veröffentlichungen des Instituts für Klinik- und Laborstandards, engl. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) bewegen. Das bedeutet, dass die Experimente bei 37 ± 1 °C in einem definierten Nährmedium, Mueller-Hinton-Bouillon, stattfinden mussten. Da die Antibiotika erst auf dem Mikroskop appliziert werden sollten, musste ein Aufbau entwickelt werden, der einen Volumenaustausch auf dem Mikroskop erlaubt. Außerdem war es wichtig den Bakterien zu ermöglichen direkten Kontakt mit dem umgebenden Medium zu haben. Die Temperatur sollte möglichst stabil genug sein, damit der Fokus nicht zu stark während der Experimente abdriftet. Da es sich um fluoreszenzmikroskopische Experimente handelte, musste festgestellt werden, welche Daten aus den Mikrogrammen extrahiert werden sollten. Da zeitaufgelöste Daten große und komplexe Datenmengen erzeugen, war es nötig eine passende Auswertung und Analyse anzuschließen.

Im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie gibt es bereits vielversprechende Methoden, die die Mikroskopie von Bakterienkulturen über einen langen Zeitraum ermöglichen. So wurde in der näheren Vergangenheit vor allem mit mikrofluidischen Systemen gearbeitet. Diese bringen allerdings ihre eigenen Fallstricke mit. So gab es beispielsweise kein bekanntes System für Experimente mit *S. aureus* und die Entwicklung wäre mit zusätzlichen Herausforderungen verbunden.

Untersucht werden sollte mittels der *in-vivo* Experimente in erster Linie, welchen Einfluss die Antibiotika Vancomycin, Telavancin und Oxacillin auf *S. aureus* in den ersten 90 min haben. Mittels der zeitaufgelösten Experimente mit FtsZ-mCherry-exprimierenden Bakterien sollte erstmals konkret gezeigt werden, welchen Einfluss eine inhibierte Zellwandsynthese auf den Teilungsprozess individueller Zellen hat. Weitergehend sollten Unterschiede und Gemeinsamkeiten der unterschiedlichen Antibiotikaklassen (Glykopeptide und Beta-Laktame) auf die Zellteilung beleuchtet werden. Außerdem sollte der Einfluss der Antibiotika auf die Lokalisierung des Proteins PBP2 mittels PBP2-GFP-exprimierenden *S. aureus* untersucht werden.

Auf den Ergebnissen aufbauend war ein weiteres Ziel den Phänotypen der persistenten Bakterien weiter zu beleuchten. Ausgangspunkt war die Hypothese, dass die persistenten Bakterien in einer bestimmten Teilungsphase vorliegen müssen, um die Behandlung mit den antibiotischen Wirkstoffen zu überleben.¹³⁷ Dazu war geplant FtsZ-mCherry-exprimierende *S. aureus* über einen langen Zeitraum unter Zugabe von Oxacillin zu beobachten und das Antibiotikum anschließend zu entfernen. In der sich anschließenden Analyse sollten

die überlebenden Bakterien identifiziert werden, um Rückschlüsse über das Verhalten dieser Subpopulation im Vergleich zur Gesamtpopulation zu treffen.

3. Physikalische Grundlagen

Zur Untersuchung des *S. aureus* wurde sich für zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie entschieden. Die folgenden Kapitel beschreiben Hintergründe verwendeter Abbildungsmethoden, die den Aufbau und die Durchführung der Experimente möglich gemacht haben.

3.1.1. Fluoreszenzmikroskopie und HILO-Beleuchtung

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt Einblicke in komplexe Vorgänge biologischer Organismen. Dies erfolgt, indem spezifische Strukturen oder sogar einzelne Proteine mit fluoreszenten Molekülen markiert und anschließend vergrößert abgebildet werden. Im Unterschied zur konventionellen Durchlichtmikroskopie wird nicht die Absorption oder Streuung des durchtretenden Lichts abgebildet, sondern das von zuvor fluoreszenzmarkierten Strukturen emittierte Licht. Dies resultiert in einem höheren Kontrast und ermöglicht spezifischere Untersuchungen.

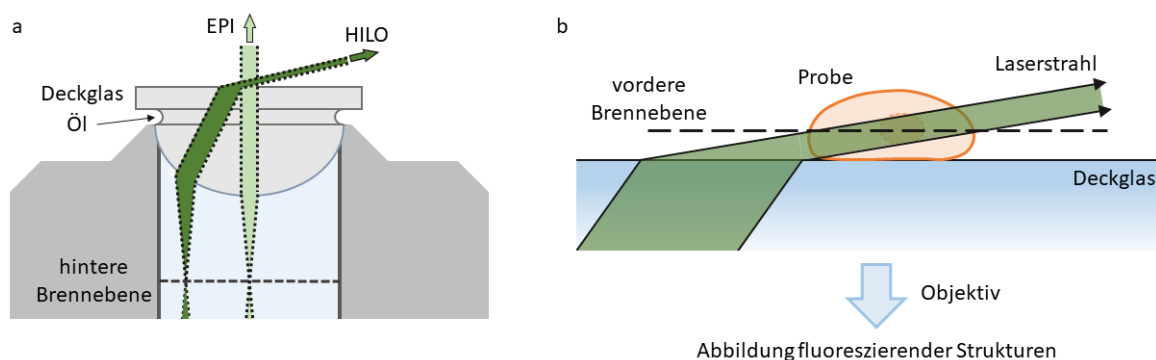


Abb. 5: Schema der HILO-Beleuchtung. (a) Geometrie des Strahlenganges von der hinteren Brennebene des Objektivs ausgehend, um EPI- (hellgrün) und HILO-Beleuchtung (dunkelgrün) zu ermöglichen. EPI-Beleuchtung bezeichnet hier die säulenförmige Beleuchtung der Probe, wie sie in Epifluoreszenzmikroskopie genutzt wird. Der Laserstrahl wird an den Grenzflächen der Objektivlinse gebeugt. Wird er in der hinteren Brennebene verschoben neigt sich der Laserstrahl in Folge oberhalb des Deckglases. **(b)** Vergrößerung des Bereichs der Probe auf dem Deckglas mit HILO-Lichtblatt. Die Geometrie der Linse und des Strahlenganges führt dazu, dass das Lichtblatt in der Fokalebene die gleiche Fläche beleuchtet, wie es bei der EPI-Beleuchtung der Fall wäre. (Modifiziert nach Tokunaga *et al.* 2008 ¹⁵⁵)

Die Probe wird bei der Epifluoreszenzmikroskopie säulenförmig ausgeleuchtet. Das wird erreicht, indem der Anregungslichtstrahl in der hinteren Brennebene des Objektivs fokussiert wird. Aufgrund der dreidimensionalen Ausdehnung der Probe wird bei dieser Beleuchtungsform allerdings nicht nur der im Fokus liegende Teil beleuchtet. Es kommt auch zu einer Beleuchtung von Bereichen, die sich vor oder hinter der Fokalebene befinden. Dies hat zur Folge, dass fluoreszierende Bestandteile außerhalb der Fokalebene als diffuses Hintergrundsignal in Aufnahmen erscheinen. Zusätzlich ist es möglich, dass die Lösung, die die Probe umgibt, auch fluoresziert und zusätzliches Signal im Hintergrund erzeugt. Das ist der Fall bei vielen Nährmedien, die bei der Kultivierung von Bakterien verwendet werden.¹⁵⁶

Optische Schichtbildgebung kann dieses Hintergrundsignal minimieren, indem möglichst nur in der Fokusebene befindliche Strukturen beleuchtet werden. Zu diesem Zweck ist es erforderlich das Anregungslicht auf alternative Weise durch die Probe zu leiten. Eine Methode, die dieses Ziel erreicht, ist die HILO-Beleuchtung (engl. *highly inclined laminar optical sheet illumination*), bei der die Geometrie des Objektivs und die Brechungseigenschaften des Lichts genutzt werden.¹⁵⁵

Die Verwendung von HILO-Beleuchtung erfordert den Einsatz von Lasern, die sich durch eine hohe Kohärenz und eine geringe Divergenz auszeichnen. Darüber hinaus muss die Probe in einem Medium mit einem kleineren Brechungsindex als Glas positioniert werden und das Objektiv muss darauf ausgelegt sein. Mittels Verschiebung der Position des Laserstrahls in der hinteren Brennebene des Objektivs kann eine Neigung des Laserstrahls in der Fokusebene erzielt werden. Infolge der Wechsel der Brechungsindizes wird der Laserstrahl an der rückseitigen Oberfläche der Objektivlinse zum Einfallslot hin und an der Grenzfläche zwischen Deckglas und Probenmedium von dem Einfallslot weg geneigt. Der Winkel und die Dicke des so entstandenen Lichtblattes können durch die Verschiebung des Strahls in der hinteren Brennebene verändert werden. Aufgrund der Verschiebung verändert sich nämlich der Einfallswinkel auf die Phasengrenze zwischen Deckglas und Probenmedium, wodurch sich der Winkel des ausfallenden Strahls verändert. Aufgrund der speziellen Geometrie des Objektivs durchdringt das Lichtblatt die Fokusebene im Zentrum des Objektivs mit einem steilen Winkel. Das erhöht damit den Kontrast durch das verringerte Hintergrundsignal.¹⁵⁵

Mit der HILO-Beleuchtung soll die Beleuchtung der Bakterien auf der Deckglasoberfläche in autofluoreszenztem Nährmedium¹⁵⁶ ermöglicht werden, ohne das vollständige Volumen über den Bakterien zu beleuchten. Der Kontrast sollte dadurch erhöht werden und Rauschen aufgrund des Hintergrundsignals unterdrückt werden.

3.1.2. Punktspreizfunktion und Dekonvolution

Die Erzeugung einer Abbildung mittels eines Mikroskops ist stets durch die endliche Größe der Aperturen der Linsensysteme beeinflusst. In der Abbildung kommt es daher zu einer Verbreiterung und „Verwischung“ des abgebildeten Objekts, wodurch das Mikroskop nie exakt das Objekt abbildet. Die Punktspreizfunktion (engl. *Point Spread Function*, PSF) gibt an, wie ein optisches System, beispielsweise ein Mikroskop, einen einzelnen Lichtpunkt abbildet. Sie gibt an, wie das Bild eines idealen Punktes aufgrund von Unschärfen und Aberrationen durch das System verzerrt wird. Die Messung dieser Funktion über Nanopartikel ermöglicht die Bestimmung der Auflösungsgrenzen, welche von der genutzten Wellenlänge abhängen. Darüber hinaus ist es möglich, eine PSF auf Grundlage der physikalischen Eigenschaften des Mikroskops, wie z.B. der numerischen Apertur und der Wellenlänge, zu simulieren. Allerdings vernachlässigen diese simulierten PSFs oft bestimmte Faktoren, wie die Polarisierung des Lichts oder den Zustand des Mikroskops. Sie dienen daher als Näherung der realen PSF. Eine simulierte oder gemessene PSF kann außerdem genutzt werden, um eine sogenannte Dekonvolution mit den Rohdaten aus Mikrogrammen durchzuführen. Bei Methoden wie der Richardson-Lucy-Dekonvolution (R-L-Dekonvolution) wird angenommen, dass sich die Probe aus der Summe vieler Punktlichtquellen zusammensetzt. Die Punktquellen erzeugen jeweils ein Intensitätsprofil, das der PSF entspricht. Das macht es möglich mittels der PSF einen Teil der „Verwischung“ rückgängig zu machen. Auf diese Weise kann Dekonvolution von Mikrogrammen die Auflösung und Kontrast verbessern und darauf aufbauende Auswertungen vereinfachen oder solider gestalten.^{157–159}

Aufgrund der Tatsache, dass Laserlicht durchaus bakterizid sein kann, sollte die Belastung der Bakterien möglichst gering ausfallen. Eine Dekonvolution ermöglicht uns mit geringerer Signalintensität zu arbeiten und die Belichtung der Bakterien weiter zu reduzieren.

3.1.3. Phasenkontrast

Da in den geplanten Experimenten die Zellwandsynthese mit den Antibiotika beeinflusst werden sollte, war der Einsatz von Membranfarbstoffen eingeschränkt, da diese potentiell den Effekt der Antibiotika verändern könnten. Dennoch sollte eine Referenzstruktur abgebildet werden, idealerweise ohne das Verhalten der Bakterien zu beeinflussen. Der Phasenkontrast (PC) stellt hierfür eine geeignete Methode dar, da er es ermöglicht, ungefärbte, wenig absorbierende Proben mit hohem Kontrast darzustellen, ohne invasiv in das System einzugreifen.^{72, 160–163}

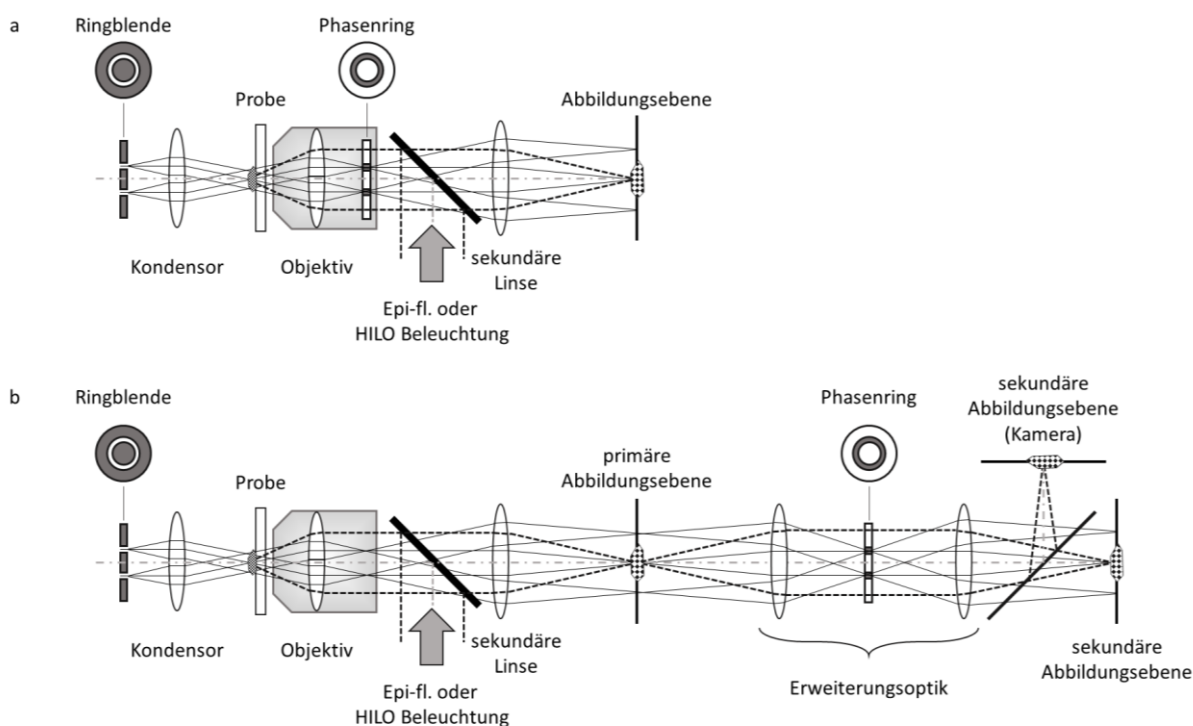


Abb. 6: Strahlengänge der Phasenkontrastmikroskopie. (a) Üblicher Strahlengang der Phasenkontrastmikroskopie mit einem Phasenring in der hinteren Fokusebene des Objektivs und daher fest verbautem Phasenring. **(b)** Das Bild der Ringblende wird mittels einer Erweiterungsoptik weiter entlang dem Strahlengang in einem Phasenring erzeugt. Dadurch ist es möglich, den Phasenring aus dem Objektiv zu entfernen. (Modifiziert nach¹⁶⁴)

Die Phasenkontrasttechnik basiert auf der konstruktiven und destruktiven Interferenz von phasenverschobenem Licht. Die Grundlage der Konfiguration bildet die Durchlichtkonfiguration nach dem Prinzip der Köhler'schen Beleuchtung. Der wesentliche Unterschied besteht in einer Ringapertur im Kondensor, die eine

ringförmige Beleuchtung der Probe erzeugt, sowie einem Phasenring in der hinteren Brennebene des Objektivs. Das durch die ringförmige Beleuchtung erzeugte Licht durchdringt die Probe und wird in der hinteren Brennebene des Objektivs ringförmig in dem Phasenring fokussiert. Das Licht, das die Probe unverändert passiert (z.B. durch das umgebende Medium), erfährt in dem umgebenden Medium eine Phasenverschiebung und wird im Phasenring gesammelt. Dort erfährt es eine weitere, definierte Phasenverschiebung und wird anschließend diffus auf der Abbildungsebene verteilt. Das an Strukturen der Probe gebrochene Licht hingegen erfährt dort eine von dem Brechungsindex der Struktur abhängige, andere Phasenverschiebung. Es wird daraufhin am Phasenring vorbei geleitet und über eine sekundäre Linse in der Abbildungsebene fokussiert.^{165, 166}

In der Abbildungsebene überlagern sich diese beiden Lichtanteile: Das diffus verteilte Hintergrundlicht und das in der Probe gebrochene und in der Abbildungsebene fokussierte Licht. Durch die resultierende konstruktive und destruktive Interferenz entsteht ein erhöhter Bildkontrast, der die Strukturen der ungefärbten Probe sichtbar macht. Dadurch entsteht ein erhöhter Kontrast zwischen den Strukturen der Probe und dem Hintergrund, deutlich stärker als in der konventionellen Durchlichtmikroskopie, die primär auf Absorption und Streuung beruht.^{165, 166}

Ein Nachteil der Methode des Phasenkontrasts besteht darin, dass der Phasenring in der hinteren Brennebene des Objektivs vorhanden sein muss. In der Regel ist dieser Ring in die Objektive eingelassen, was die Auswahl an Objektiven begrenzt. Da aufgrund der erhöhten Temperatur und Verwendung der HILO-Beleuchtung spezielle Objektive genutzt werden müssen, war eine Erweiterung des Strahlengangs nötig. Diese Erweiterung des Strahlengangs durch ein Linsenpaar fokussiert das Hintergrundlicht in einer weiteren Brennebene (siehe Abb. 6, b). Dadurch wird es möglich, die Position des Phasenrings weiter entlang des abbildenden Strahlengangs zu positionieren. Das eröffnet eine breitere Auswahl an Objektiven, da der Phasenring nicht mehr in dem Objektiv positioniert werden muss.¹⁶⁷ Darüber hinaus kann der Phasenring in fluoreszenzmikroskopischen Experimenten das Signal beeinflussen, da das Emissionslicht zu geringen Teilen durch den Phasenring tritt. In dem Phasenring ist ein Graufilter integriert, der das Hintergrundlicht um 75 bis 90 % reduzieren soll.¹⁶⁸ Das führt dazu, dass der Teil des Emissionslichts, der den Phasenring passiert, zu großen Teilen absorbiert wird.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in **Tabelle 4-1** aufgelistet.

Tabelle 4-1 – Verwendete Chemikalien und entsprechende Hersteller	
Chemikalien	Hersteller
Agar-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agarose (Roti®Garose Broad Range)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
BD Pharmingen™ Human BD Fc Block™	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Erythromycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fluorescein Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran, 500 kDa) in 32 % Succhrose	Sigma-Aldrich
Isopropyl-β-d-thiogalactopyranosid (IPTG)	Life Technologies, Carlsbad
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mueller-Hinton-Medium, trocken (MH)	Oxoid Deutschland GmbH, Wiesel
Nanopartikel (TetraSpeck™ Microspheres, 0,1 µm, fluorescent)	Invitrogen AG, Carlsbad, California, USA
Oxacillin (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Dulbecco's, trocken (engl. <i>phosphate buffered saline</i> , PBS)	Applichem GmbH, Darmstadt
Resione G217	Dongguan Godsaid Technology Co., Ltd, Dongguan City, Guangdong Province, China
Rinderserumalbumin (RSA)	Sigma-Aldrich
SNAP-Cell® 647-SiR	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
SNAP-Cell® Oregon Green	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
SNAP-Cell® TMR-Star	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Standardharz, engl. <i>Translucent</i> (durchscheinend)	Elegoo, Shenzhen, China
SYTOX™ Green	Invitrogen AG, Carlsbad, California, USA
Telavancin	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Köln
Vancomycin	Hikma, London, UK

4.1.2. Spezielle Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten speziellen Verbrauchsmaterialien sind in **Tabelle 4-2** aufgelistet.

Tabelle 4-2 – Spezielle Verbrauchsmaterialien und entsprechende Hersteller	
Bezeichnung	Hersteller
1 mL Spritzen (Inject-F Luer-Solo 0.01 – 1 mL)	B. Braun SE, Melsungen
1,5 mL semi-mikro Küvetten	Brand GmbH, Wertheim
35-mm- μ -Ibidi-Schalen	Ibidi, Gräfelting
50 mL Spritzen (Henke-Inject)	Henke Sass, Wolff GmbH, Tuttlingen
Kanüle (Neopoint®LUER; 0.9 x 40 mm/20G x 1 ½“)	Servoprax GmbH, Wesel
Kanüle (Sterican®; 0.8 x 120 mm, 21G x 4¾“)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanüle (Sterican®; 0.9 x 70 mm BL/LB 20G x 2¾“)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Schlauch (ROTILABO® Silikon Standardausführung, 0.5 mm, 2.5 mm)	Deutsch und Neumann GmbH, Henningsdorf
Spritzenfilter (ROTILABO®-Spritzenfilter, PVDF, steril; Porengröße 0.45 μ m, $\varnothing$ außen 33 mm)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

4.1.3. Geräte, Bauteile und optische Elemente

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Bauteile sind in **Tabelle 4-3** aufgeführt.

Tabelle 4-3 – Geräte/Bauteile und entsprechende Hersteller	
Gerät/ Bauteil	Hersteller
3D Drucker (Mars 4)	Elegoo, Shenzhen, China
3D Drucker (Mars Pro)	Elegoo, Shenzhen, China
Analysenwaage (Modell PBA124I-1S)	VWR International GmbH, Hilpertstraße
Inkubationsschüttler (Orbital incubator S150)	Stuart Scientific Co. Ltd, Redhill, England
Inkubator (Incu-Line IL23)	VWR International GmbH, Hilpertstraße
OD600	Implen, München
Pippettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präzisionsthermometer (GTH 175/MO)	Senseca Germany GmbH (Ehem. Greisinger electronic GmbH), Regenstauf
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex, Berlin
Vortexmischer Genius 2	IKA, Staufen
Waage (Modell ALC-810.2)	Sartorius AG, Göttingen

Alle zur Realisierung des zeitaufgelösten Mikroskopaufbaus verwendeten speziellen Geräte und Bauteile sind in **Tabelle 4-4** aufgeführt.

Tabelle 4-4 – Zur Realisierung des zeitaufgelösten Mikroskopaufbaus verwendeten speziellen Geräte und Bauteile	
Gerät/ Bauteil	Hersteller
Externer Phasenkontrast (TI-T-BPH Eyepiece Base Unit (for External Phase Contrast))	Nikon, Tokyo, Japan
Glasfaser (kineFlex)	Excelitas Technologies Corp., Pittsburgh, Pennsylvania, USA
HILO-Bühne	Eigenbau
Kamera (Photometrics Prime BSI)	Teledyne Photometrics, Tucson, Arizona, USA
Laserbox (C-FLEX C6 Lasercombiner)	HÜBNER Photonics, Solna, Schweden
LED-Beleuchtung (CoolLED pl100 white)	Advanced Imaging GmbH, Essen
Mikroskoptisch-Inkubator inklusive Steuergerät (Ibidi Heating System, Universal Fit)	Ibidi, Gräfelfing
Motorisierter Mikroskoptisch (PZ-2150FT mit MS-2000-WK Steuergerät)	Applied Scientific Instrumentation, Eugene, Oregon, USA
Nikon ECLIPSE Ti-E inverses Mikroskopstativ mit externem Phasenkontrast	Nikon, Tokyo, Japan
Objektiv (CFI Apochromat TIRF 100x Öl/1,49/ 0,12)	Nikon, Tokyo, Japan
Objektivheizung (OBJ-COLLAR-3342 Flexible Heated Collar + H401-T-PENNY, 1-Kanal Temperatur Steuergerät)	Okolab, Pozzuoli, Italien
Objektiv-Revolver inclusive Fokus Stabilisierung (Ti-ND6-PFS-S, engl. <i>Perfect Focus System</i> , PFS) und PFS-Versatz-Steuergerät (engl. <i>PFS offset controller</i>)	Nikon, Tokyo, Japan
Quadband-Filterset (ET 405/488/561/640nm Laser Quad Band Set)	Chroma Technology Corp, Bellow Falls, Vermont, USA
Spritzenpumpe (manuell)	Eigenbau
Spritzenpumpe (motorisiert)	Eigenbau

4.1.4. Stammlösungen, Medien und Puffer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Stammlösungen, Nährmedien- und Pufferzusammensetzungen sind in **Tabelle 4-5** in ihrer Zusammensetzung aufgeführt.

Tabelle 4-5 – Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen und Nährmedien	
Bezeichnung	Zusammensetzung
1xPBS	9,55 g/L PBS Puffer (1x, Dulbecco's, Applichem) in Reinstwasser (ddH ₂ O)
3 % RSA	30 g/L RSA in ddH ₂ O
Kationisch angepasstes Mueller-Hinton-Medium (engl. <i>Cation adjusted Mueller Hinton</i> , CAMH)	MH + 1,7 mL 10 mg/ml Ca ²⁺ (CaCl ₂ in ddH ₂ O; Endkonzentration = 21 mg/L Ca ²⁺) + 0.4 mL 10 mg/ml Mg ²⁺ (MgCl ₂ · 6 H ₂ O in ddH ₂ O; Endkonzentration = 10 mg/mL Mg ²⁺)
Mueller-Hinton-Medium (MH)	21 g/mL dehydriertes MH (Oxoid™, 3,72 mg/L Ca ²⁺ , 6,28 mg/L Mg ²⁺)
Nährmedium 1 (NM1)	100 mL CAMH + 20 µL (10 µg/mL Oxacillin in ddH ₂ O, Endkonzentration 2 µg/mL) + 10 µg/mL Erythromycin + 100 µmol/L IPTG
Nährmedium 2 (NM2)	70 mL CAMH + 10 µg/mL Erythromycin + 100 µmol/L IPTG

4.1.5. Programme und Erweiterungen

Alle in dieser Arbeit zur Verarbeitung und Auswertung verwendeten Programme und Erweiterungen sind in **Tabelle 4-6** aufgeführt. Python Skripte wurden in der Version 3.10.9 verfasst.

Tabelle 4-6 – Zur Verarbeitung und Auswertung verwendete Programme und Erweiterungen	
Bezeichnung	Hersteller/Referenz
eHooke_1.0	Saraiva <i>et al.</i> 2021 ¹⁶⁹
ImarisStitcher 10.2.0	Oxford Instruments, Abington, UK
Fiji (ImageJ 1.53h, Java 1.8.0_172 (64-bit))	Schindelin <i>et al.</i> 2012 ¹⁷⁰
DeconvolutionLab2 2.1.2	Sage <i>et al.</i> 2017 ¹⁷¹
PSF Generator (Version 18.12.2017 (for JRE 1.6))	Aguet <i>et al.</i> 2008 ¹⁷²
Huygens Professional 24.10	Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, Niederlande

4.1.6. Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme der Art *Staphylococcus aureus* und deren selektives Antibiotikum sind in **Tabelle 4-7** aufgeführt.

Tabelle 4-7 – Bezeichnungen für verwendete Bakterienstämme mit selektivem Antibiotikum		
Stamm	Selektives Antibiotikum	Referenz
RN4220	-	Herbert <i>et al.</i> 2010 ¹⁷³
RN4220 pcq11-FtsZ-mCherry	10 µg/mL Erythromycin	Puls <i>et al.</i> 2023 ¹⁷⁴
RN4220 pcq11-MurJ-nGreen	10 µg/mL Erythromycin	Puls <i>et al.</i> 2023 ¹⁷⁴
RN4220 RNpPBP2-31	10 µg/mL Erythromycin	Pinho <i>et al.</i> 2005 ⁸⁴

4.2. Versuchsaufbau

Im Folgenden erfolgt die Beschreibung des Mikroskopaufbaus sowie der für die im Anschluss beschriebenen Experimente konzipierten Inkubationseinsätze.

4.2.1. Aufbau des inversen Mikroskops

Für den Aufbau des Mikroskops wurde das Mikroskopstativ Eclipse Ti-E (Nikon) genutzt. Zum Einsatz kam ein Strahlengang, welcher dazu diente, Abbilder der Probe im Phasenkontrast zu erzeugen (Abb. 7). Ein weiterer Strahlengang ermöglichte die Durchführung fluoreszenzmikroskopischer Experimente (Abb. 8).

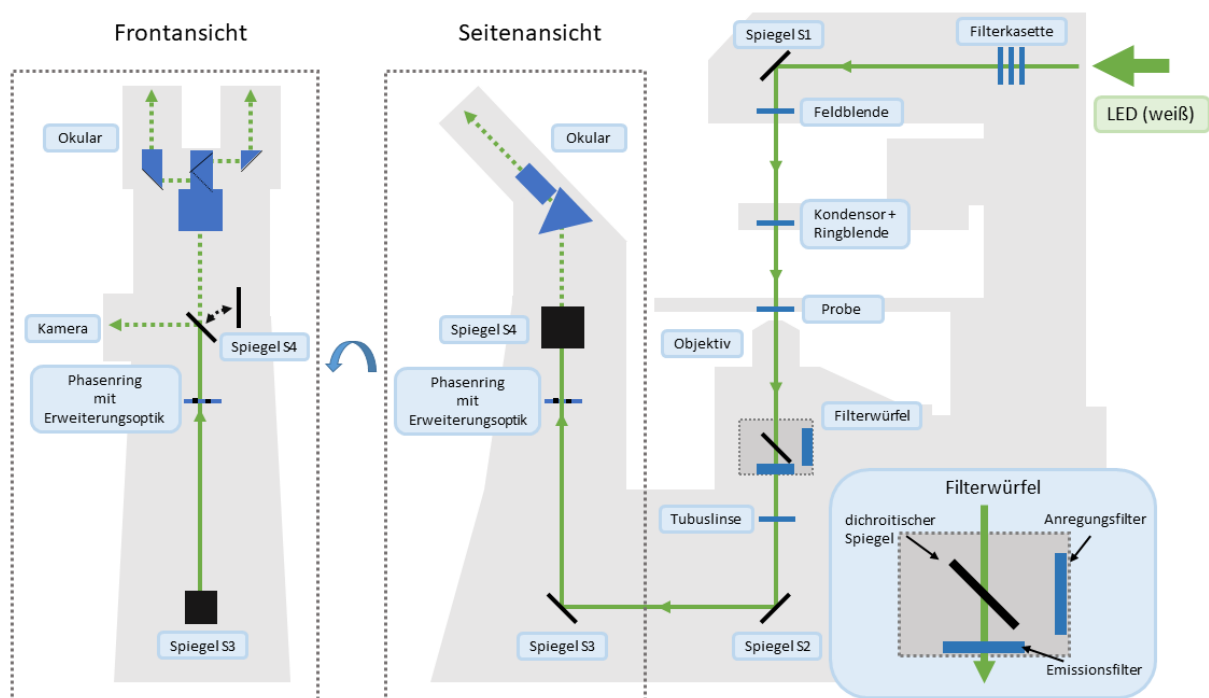


Abb. 7: Strahlengang Phasenkontrast. Die Ausbreitung des LED-Lichts ist in grüner Farbe dargestellt.

Der Phasenkontrast diente der unspezifischen Abbildung der Organismen als Referenzstruktur. Der Ausgangspunkt ist die Lichtquelle, eine weiße Licht-emittierende Dioden-Beleuchtung (LED-Beleuchtung, Cool LED, Advanced Imaging GmbH). Die LED-Beleuchtung wurde eingesetzt, um die herkömmliche Halogenbeleuchtung zu ersetzen und eine automatisierte Beleuchtung des Präparats ohne mechanische Blenden zu ermöglichen. Der Einsatz mechanischer Blenden könnte ungewollte Vibrationen im System erzeugen. Das Licht der Lampe breitet sich in Pfeilrichtung aus und wird durch einen Spiegel nach unten, in Richtung der Probe reflektiert. Zunächst trifft das Licht auf den Kollektor und dessen verstellbare Blende. Daraufhin trifft es auf die Ringblende, welche sich in dem Kondensor-Paket anstelle der für Köhler-Konfigurationen üblichen verstellbaren Lochblende befindet. In Kombination mit dem Kondensor ermöglicht die Ringblende die Beleuchtung des Präparats in Form eines ringförmigen Konus. Dieser durchläuft später den Phasenring und

erzeugt den Hintergrund des PC-Bilds. Das Licht passiert das Objektiv (CFI Apochromat 100x TIRF Öl/1,49, Nikon) und den Filterwürfel (Quadband Filterset, Chroma Technology Corp), und gelangt über zwei Spiegel (S2 und S3) in den Vorbau des Stativs. Das Licht wird aufwärts reflektiert und gelangt durch den externen PC zu einem verstellbaren Spiegel (S4). Der externe PC erlaubt es den Phasenring, welcher für PC erforderlich ist, nicht im Objektiv zu platzieren, sondern weiter entlang des Strahlengangs. Der verstellbare Spiegel ist während der Experimente so eingestellt, dass das Licht von der Probe auf die Kamera (Photometrics Prime BSI, Teledyne Photometrics) gelenkt wird. Zudem besteht die Möglichkeit, den Spiegel aus dem Strahlengang zu entfernen, um das Präparat durch das Okular direkt zu beobachten. Außerdem konnten der Phasenring und die Ringblende zwischen den Experimenten entfernt werden, wenn ein Experiment mit dem Durchlichtaufbau durchgeführt werden sollte.

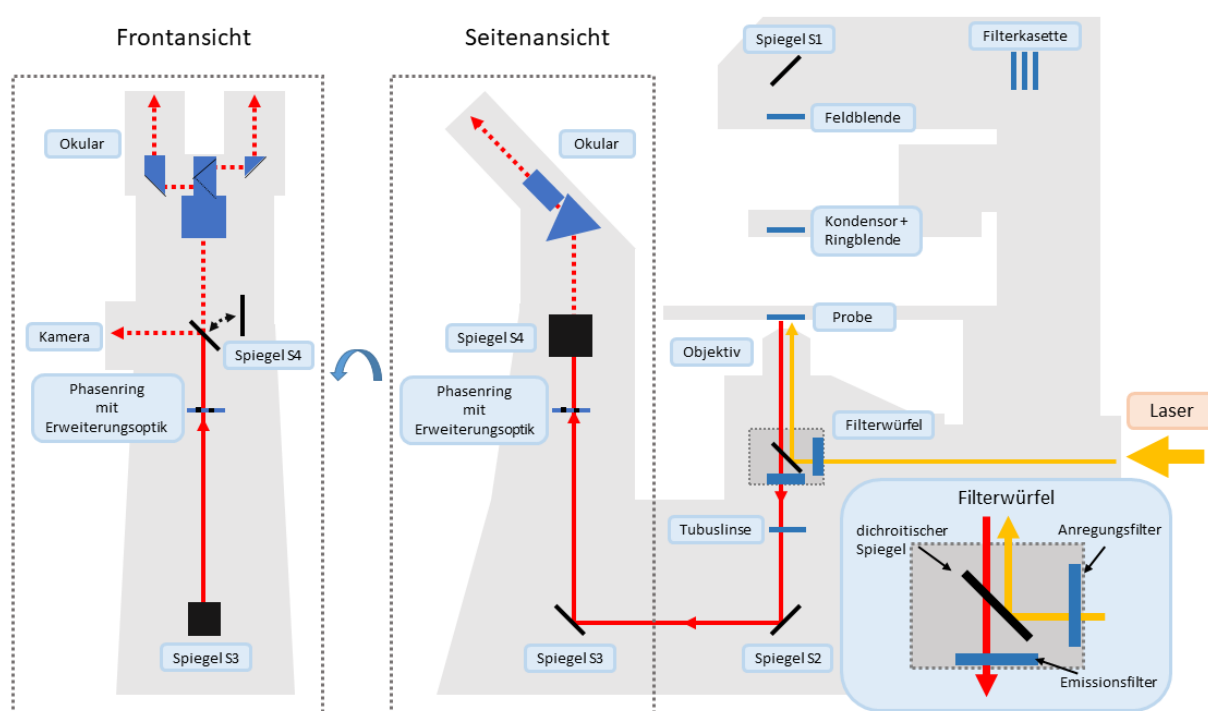


Abb. 8: Strahlengang Fluoreszenzmikroskopie. Das Anregungslicht der Laser ist hier in orangener und das längerwellige Emissionslicht der Probe in roter Farbe dargestellt.

Der Strahlengang zur Fluoreszenzmikroskopie wurde alternierend zum Strahlengang für PC verwendet, um fluorescent markierte Strukturen der Probe zu visualisieren. Er beginnt hinter dem Mikroskop mit einem der Laser, die zur Belichtung der Probe zur Verfügung stehen. Der Laser tritt in das Mikroskop ein und trifft auf den Filterwürfel. Der Filterwürfel spiegelt nur das Licht der Laser aufwärts in Richtung des Objektivs und der Probe. Das Licht passiert das Objektiv, welches das Licht in die Probe leitet. Das von der Probe infolge dessen in alle Richtungen abgestrahlte, rotverschobene Licht wird von dem Objektiv gesammelt. Das gesammelte Emissionslicht bewegt sich entgegen der Ausbreitungsrichtung des Anregungslichts und durchquert den Filterwürfel. Das Emissionslicht passiert die Tubuslinse und wird von zwei Spiegeln (S2 und S3) in den Vorbau des Stativs reflektiert. In der Folge durchquert das Licht die Erweiterungsoptik und den Phasenring des externen PC. Der Phasenring des externen PC wurde während der laufenden Experimente nicht

entfernt, da automatisiert alternierend PC und fluoreszenzmikroskopische Abbildungen des Präparats erzeugt wurden. Das Emissionslicht wird anschließend abhängig der Einstellung des verstellbaren Spiegels S4 von diesem auf die Kamera reflektiert, wo es abgebildet oder an dem Spiegel vorbei in das Okular geleitet wird.

Steuerung und Fokusstabilisierung

Das Mikroskop war vollständig motorisiert und wurde mittels eines Computers gesteuert. Dieses Vorgehen ermöglichte die Planung und automatisierte Durchführung der Experimente. Im Rahmen der Experimente wurde die Fokusstabilisierung (engl. „*Perfect Focus System*“, PFS), die in den Objektivrevolver (Ti-ND6-PFS-S, Nikon) integriert ist, genutzt. Dieses ermöglicht in Verbindung mit dem motorisierten Mikroskoptisch (PZ-2150FT, Applied Scientific Instrumentation) und dem motorisierten Stativ (Eclipse Ti-E, Nikon) eine Kompensierung des auftretenden thermischen oder mechanischen Abtreibens der z-Position. Das sogenannte PSF-Versatz-Steuergerät (engl. *PSF offset controller*) fand Anwendung, um die stabilisierte z-Position anzupassen. Die Schritte der Experimente wurden in folgender Reihenfolge durchgeführt: Fokuskorrektur, Kanäle, z-Position, x-/y-Position und Zeitintervall.

Strahlengang der LASER-Beleuchtung

Im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Experimente bestand die Notwendigkeit, eine möglichst große Fläche homogen zu beleuchten. Zu diesem Zweck wurde der zur Verfügung stehende Laserstrahl um das 60-Fache aufgeweitet und die Größe des Beleuchtungsflecks unter Verwendung zweier verstellbarer Lochblenden verkleinert. Der erforderliche optische Strahlengang wurde hinter dem Mikroskop auf einem optischen Tisch montiert und ausgerichtet. Eine schematische Darstellung des Strahlengangs ist in Abb. 9 dargestellt.

Die Laserstrahlen der vier Laser werden miteinander gekoppelt und anschließend in eine Glasfaser (kineFLEX, Excelitas) geleitet. Die Strahlen verlassen die Glasfaser durch einen Kollimator. Anschließend werden die Laserstrahlen durch das Linsenpaar L2 und L3 15-fach aufgeweitet. Die variable Lochblende P1 ermöglicht eine selektive Abschattung der über die Spiegelgröße hinaus vergrößerten Strahlen. Ein zweites Linsenpaar (L3 und L4) ermöglicht eine weitere Aufweitung der Strahlen um den Faktor 4. Mit Lochblende P2 kann der Durchmesser der auf die Probe auftreffenden Strahlen eingestellt werden. Der beschriebene Strahlengang erlaubt insgesamt eine 60-fache Vergrößerung der Laserstrahlendurchmesser.

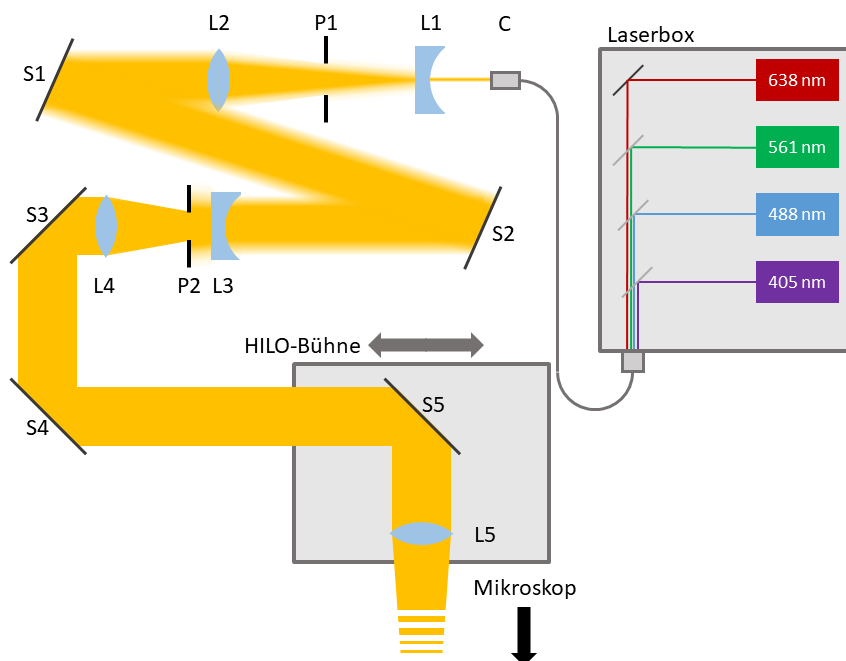


Abb. 9: Strahlengang zur Homogenisierung des Intensitätsprofils. Rechts: Laserbox; C – Collimator; L1 – Linse 1: $f = -20$ mm; L2 – Linse 2: $f = 300$ mm; L3 – Linse 3: $f = -25$ mm; L4 – Linse 4: $f = 100$ mm; L5 – Linse 5: $f = 150$ mm; P1 und P2 – verstellbare Lochblenden; S1 bis S5 – Spiegel.

Die Verwendung einer konvexen Linse (L2 und L4) zusammen mit einer konkaven Linse (L1 und L3) in den jeweiligen Linsenpaaren führt zu einer Reduzierung des wellenlängenabhängigen Abbildungsfehlers der verschiedenen Laser.

HILO-Beleuchtung

Um eine HILO-Beleuchtung zu ermöglichen, müssen die einfallenden Laserstrahlen in der hinteren Fokalebene des Objektivs orthogonal zu ihrer Ausbreitungsrichtung verschoben werden. Dies wird durch den in Abb. 10 dargestellten optischen Aufbau realisiert. Der bewegliche optische Tisch wurde von Dr. Jan-Peter Siebrasse in Zusammenarbeit mit der hauseigenen Feinmechanik- und Elektrowerkstatt angefertigt.

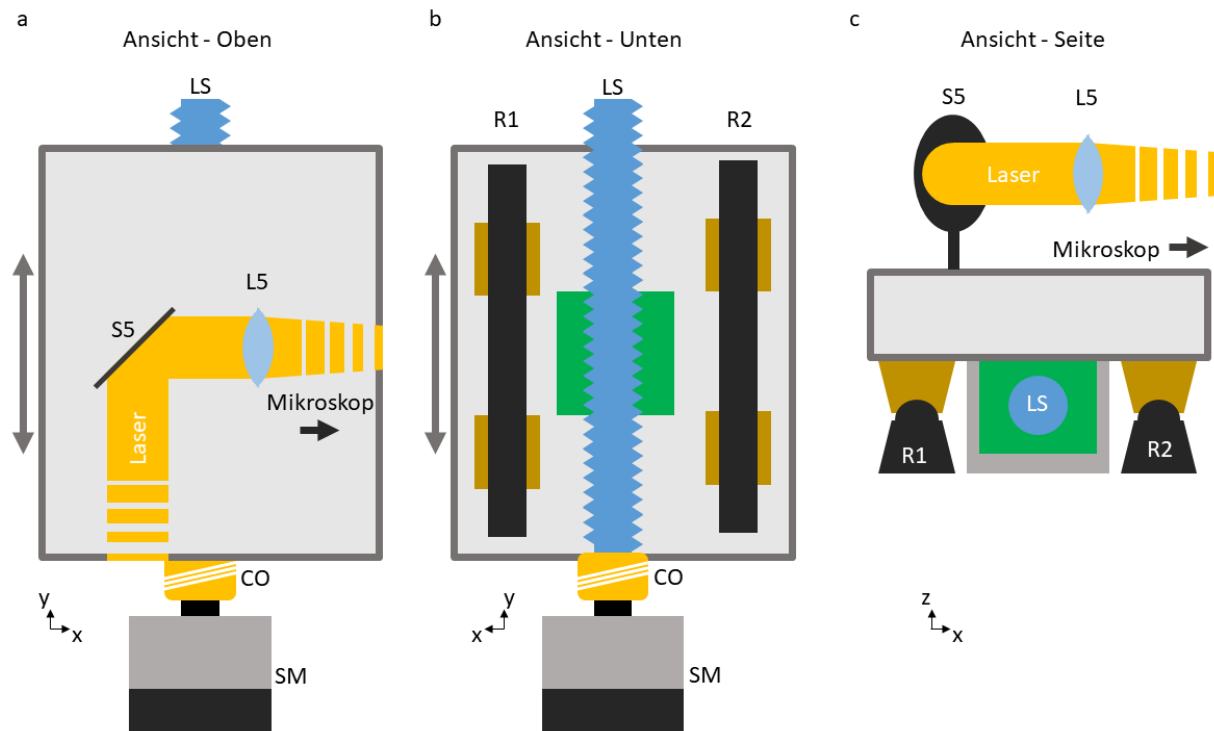


Abb. 10: Aufbau des beweglichen optischen Tisches zur Verschiebung der optischen Achse des Beleuchtungsstrahlenganges. Ansicht von Oben (a), Unten (b) und der rechten Seite (c). SM – Schrittmotor; CO – Lamellenkupplung; LS – Gewindestange mit Führung (grün); R1 und R2 – Linearführung; S5 – Spiegel 5; L5 – Linse 5.

Die rechtwinklige Anordnung des Strahlengangs über den Spiegel S5 wird ausgenutzt, um eine Bewegung der Strahlenachse orthogonal zur Ausbreitungsrichtung zu ermöglichen. Die Bewegung wird durch einen Schrittmotor SM unter dem kleinen optischen Tisch realisiert, der über eine Gewindestange LS mit dem Tisch gekoppelt ist und diesen über zwei Schienen R1 und R2 bewegt. Dadurch sind Schritte mit einer Schrittweite von 0,01 mm möglich. Die Linse L5 ($f = 150 \text{ mm}$) dient zur Bündelung des zuvor parallel verlaufenden Strahlengangs in der hinteren Fokusebene des Objektivs.

4.2.2. Vermessung von Nanopartikeln

Die PSF wird zur Charakterisierung eines Mikroskops und darüber hinaus zur Dekonvolution von Rohdaten verwendet.

Für die Messung der PSF wurden runde Nanopartikel (TetraSpeck™, Invitrogen AG) mit einem Durchmesser von 100 nm verwendet. Die Nanopartikel wurden in einem Verhältnis von 1:10.000 in einem 4 %igen Agarsegel verdünnt und noch in flüssigem Zustand auf ein Deckglas pipettiert. Die Abbildung des ausgehärteten Gels erfolgte im Mikroskop in mehreren z-Stapeln nahe der Deckglasoberfläche. Die Anregung erfolgte bei 405 nm, 488 nm, 561 nm und 638 nm. Der z-Abstand einzelner Ebenen betrug 50 nm. Die Abbildung erfolgte bei Raumtemperatur und das Objektiv (Nikon, CFI Apochromat 100x/ 1,49/ Öl) wurde entsprechend eingestellt. Die verwendete Kamera (Photometric Prime BSI, Teledyne Photometrics) hat eine Pixelgröße von $6,5 \mu\text{m} \times 6,5 \mu\text{m}$ was in einer objektseitigen Pixelgröße von $65 \text{ nm} \times 65 \text{ nm}$ resultiert.

4.2.3. Einfluss der 60-Fachen Aufweitung des Anregungslaserstrahls

Zusätzlich zur 15-fachen Vergrößerung, die ausreicht, um den abgebildeten Bereich mit dem Laserstrahl zu beleuchten, wurde der Laserdurchmesser mit dem Linsenpaar L3 und L4 zusätzlich um den Faktor 4 vergrößert (Abb. 9). Dies geschah, um eine möglichst homogene Intensitätsverteilung des Anregungslichts zu erzeugen.

Um zu überprüfen, ob die 60-fache Aufweitung des Laserstrahls zu einer gleichmäßigeren Intensitätsverteilung führt als die 15-fache Aufweitung, wurde eine möglichst homogen fluoreszierende Probe abgebildet. Diese Probe bestand aus einer fluoreszierenden Lösung aus 5 µg/mL Fluorescein Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran, 500 kDa) in 1xPBS. Die Probe wurde sowohl mit einem 60-fach als auch mit einem 15-fach aufgeweiteten Laserstrahl in Epifluoreszenz- (EPI-) und HILO-Konfiguration beleuchtet und abgebildet. Die Anregung erfolgte mit einem 488 nm Laser und die Aufnahmen wurden 1 µm über der Deckglasoberfläche mit unveränderten Einstellungen erzeugt.

Die Daten wurden ausgewertet indem ein Gaussfilter („Gaussian Blur...“; ImageJ, Radius = 10 px) auf die Rohdaten angewendet wurde. Anschließend wurde jeweils ein horizontales Intensitätsprofil durch das Zentrum des beleuchteten Flecks erzeugt und ausgewertet.

4.2.4. Inkubationseinsätze für zeitaufgelöste Experimente mit Bakterien und Austausch des Probenvolumens

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie von Bakterien erfordert die Erfüllung spezifischer Anforderungen an den mikroskopischen Aufbau. Eine stabile Temperatur zwischen 36 °C und 38 °C muss gewährleistet werden. Darüber hinaus ist ein austauschbares Probenvolumen erforderlich, um die geplanten Experimente durchführen zu können. Einerseits muss ein einmaliger, schneller Austausch eines kleinen Volumens gewährleistet werden. Andererseits sollen Experimente ermöglicht werden, die einen kontinuierlichen Austausch und Durchfluss des Probenvolumens vorsehen. Zu diesem Zweck wurden zwei Einsätze für das Mikroskoptisch-Inkubationssystem (ibidi Heating System, ibidi GmbH) entwickelt. Diese wurden in der hauseigenen Feinmechanikwerkstatt gefertigt und müssen neben den rein mikroskopischen Anforderungen auch die oben genannten Voraussetzungen erfüllen und bilden somit die Basis für die Durchführung der angestrebten Experimente.

Einsatz für einfachen Volumenaustausch

Für Versuche, bei denen das Probenvolumen nur einmal, möglichst schnell und vollständig gewechselt werden sollte, wurde der Einsatz mit einem vollständig geschlossenen Probenvolumen von geringer Größe entwickelt. Eine Explosionszeichnung und ein vertikaler Querschnitt über die Längsachse des Einsatzes sind in Abb. 11 dargestellt.

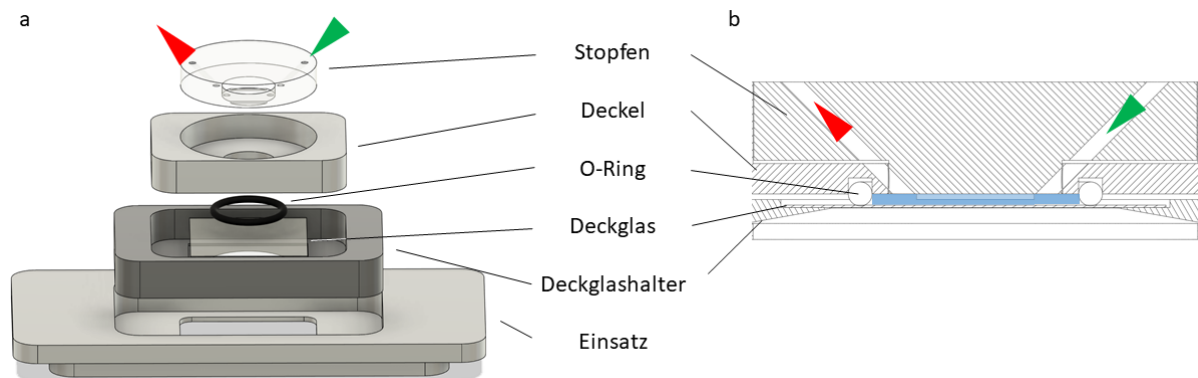


Abb. 11: Aufbau des Inkubationseinsatzes für einfachen Volumenaustausch. Explosionszeichnung (a) und vertikaler Querschnitt, zentral über die längere Achse (b) des Inkubationseinsatzes für einfachen Volumenaustausch. Die grünen und die roten Pfeile deuten die Flussrichtung (Ein- und Ausgang) bei einem Austausch an. Kanülen wurden in die Löcher in dem Stopfen geklebt und sind in der Abbildung nicht dargestellt.

Das geringe Probenvolumen von ungefähr 110 μL soll einen vollständigen Austausch der Probenlösung mit nur einem Milliliter Lösung ermöglichen. Die Verwendung eines Stopfens aus Acrylglas ermöglicht die Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie, bei der ein ringförmiger, konisch fokussierter Strahl durch die Probe geleitet wird. Der Deckel und der Einsatz bestehen aus Aluminium. Der Deckglashalter besteht aus rostfreiem Stahl.

Einsatz für kontinuierlichen Volumenaustausch

Für Versuche mit kontinuierlichem Durchfluss des Probenvolumens wurde ein weiterer Einsatz mit offener Konstruktion ohne Stopfen entwickelt. Eine Explosionszeichnung sowie ein vertikaler Querschnitt diagonal durch das Probenvolumen und die beiden Kanülen sind in Abb. 12 dargestellt.

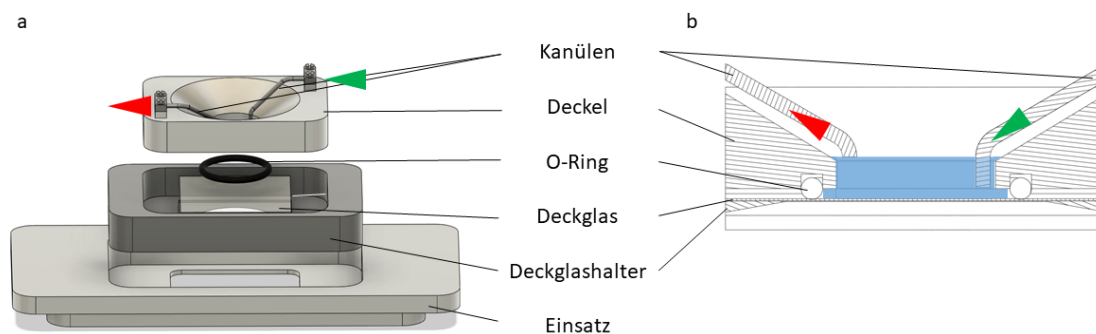


Abb. 12: Aufbau des Inkubationseinsatzes für einfachen Volumenaustausch. Explosionszeichnung (a) und vertikaler Querschnitt durch Ein- und Auslass (b) des Inkubationseinsatzes für kontinuierlichen Volumenaustausch. Die grünen und die roten Pfeile in deuten die Flussrichtung (Ein- und Ausgang) bei einem Austausch an.

Die konische Öffnung des Deckels und die Positionierung der Kanülen an den Seiten ermöglicht die Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie. Die Kanülen sind in diesem Fall geklemmt. Der Einsatz und der Deckel sind aus Aluminium gefertigt. Der Deckglashalter besteht aus rostfreiem Stahl.

4.2.5. Pumpsystem

Zum Austausch der Probenvolumina wird eine Spritzenpumpe mit zwei gleich großen Spritzen verwendet. Die Spritzenpumpe wurde von Dr. Jan-Peter Siebrasse in Zusammenarbeit mit der hauseigenen Feinmechanik- und Elektrowerkstatt angefertigt. Abb. 13 zeigt die Verbindung der Spritzenpumpe mit den Inkubationseinsätzen. Die Verbindung zwischen Pumpe und Inkubationseinsatz wurde mit Silikonschläuchen hergestellt, die einem Innendurchmesser von 0,5 mm und einem Außendurchmesser von 2,5 mm aufweisen. Die Schläuche konnten mittels kurzer Kanülen und sogenannten Luer-Lock-Anschlüssen an den Spritzen und dem Inkubationseinsatz befestigt werden. Die Eingangskanüle für den Inkubationseinsatz für Experimente mit einfachem Volumenaustausch wurde mit dem Schlauch über ein Verbindungsstück gekoppelt, das aus einem UV-härtenden Harz auf einem 3D-Drucker hergestellt wurde. Das gedruckte Verbindungsstück besaß einen kleineren Innendurchmesser von 1 mm. Dadurch konnte das Volumen der Verbindung zwischen Pumpe und Probenvolumen reduziert werden. Die Experimente mit einfachem Volumenaustausch wurden mithilfe einer manuell betriebenen Spritzenpumpe durchgeführt. Für Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch wurde die motorisierte Spritzenpumpe verwendet.

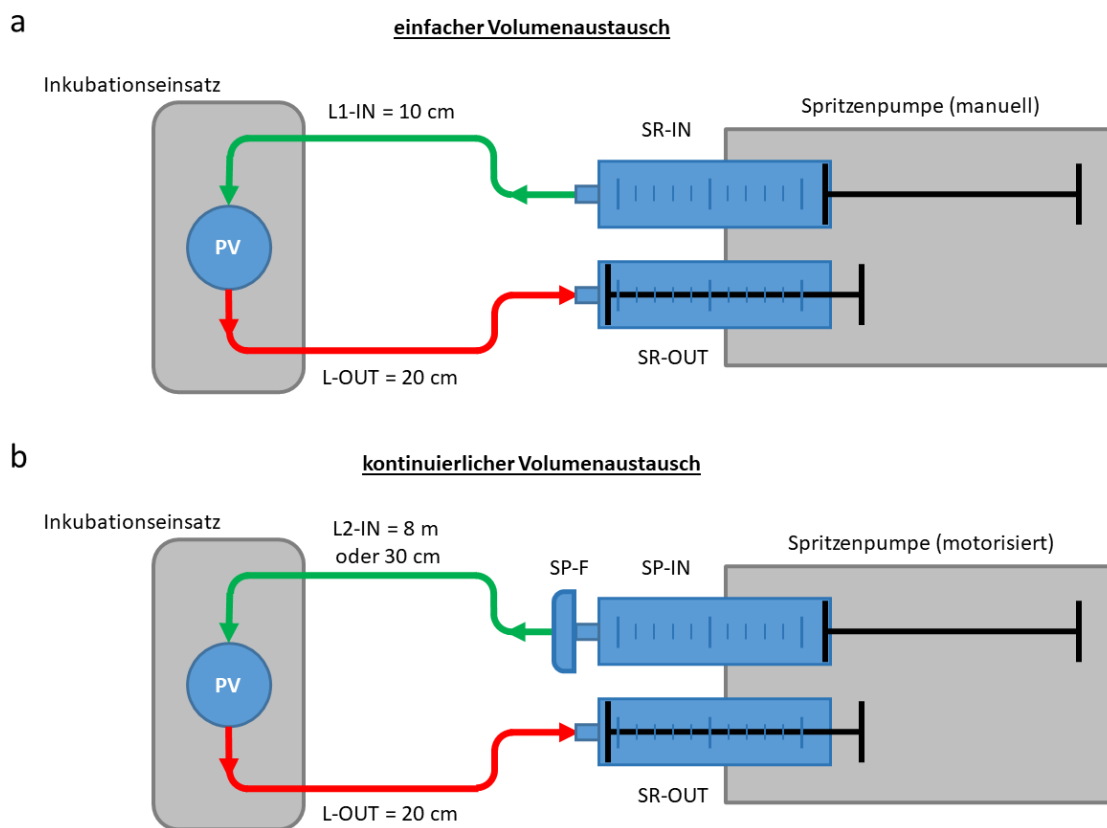


Abb. 13: Verbindungsschemata der Spritzenpumpe mit den Inkubationseinsätzen für zeitaufgelöste Experimente mit Bakterien. (a) Verbindung der manuell bedienten Spritzenpumpe für Experimente mit einfachem Volumenaustausch. **(b)** Verbindung der motorisierten Spritzenpumpe für Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch. Die grünen und die roten Pfeile und Verbindungslinien deuten die Flussrichtung (Ein- und Ausgang) in den Schläuchen bei einem Austausch an. PV – Probenvolumen; L1-IN und L2-IN - Länge des Zufuhrschlauchs; L-OUT – Länge des Entnahmeschlauchs; SR-IN – Zufuhrspritze; SR-OUT – Entnahmespritze; SP-F – Spritzenfilter.

4.2.6. Messung der Temperaturstabilität

Die geplanten Experimente mit den Bakterien sollten bei einer möglichst stabilen Temperatur von $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durchgeführt werden. Daher wurden Temperaturmessungen vorgenommen, die diese Bedingungen simulieren und zugleich die Wirksamkeit der verwendeten Objektivheizung und der Abdeckhaube evaluieren.

Wirksamkeit der Objektivheizung in Experimenten mit einfachem Volumenaustausch

Um die Temperaturstabilität zu gewährleisten, wurde die Temperatur einer Lösung im Probenvolumen über die Zeit und unter Berücksichtigung eines Volumenaustausches gemessen. Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, um den Effekt einer eingeschalteten Objektivheizung einzuordnen. Der Temperatursensor wurde nahe der Oberfläche im Zentrum des Deckglases positioniert. Für den Inkubationseinsatz mit einfachem Volumenaustausch wurde ein Duplikat des Einsatzes hergestellt, das in der Mitte des Stopfens ein Loch mit einem Durchmesser von einem Millimeter aufwies. Durch dieses Loch konnte der Temperatursensor eingeführt und die Öffnung mit UHU® patafix (UHU GmbH und Co. KG) abgedichtet werden. Zusätzlich wurde die Genauigkeit des Temperatursensors mit einem Präzisionsthermometer überprüft. Die gemessene Abweichung von -1°C wurde bei allen Temperaturmessungen berücksichtigt. Für die Einstellung der Objektivheizung und des Mikroskoptisch-Inkubators in Experimenten mit einfachem Volumenaustausch wurden vorläufige Experimente durchgeführt. Dabei wurde eine optimale Temperatureinstellung von 45°C und 38°C für die Objektivheizung bzw. den Mikroskoptisch-Inkubator festgestellt. Voraussetzung war, dass eine stabile Temperatur zwischen 36°C und 38°C im Probenvolumen erreicht wird, wenn es mit Reinstwasser (ddH_2O) gefüllt ist.

Um die Wirksamkeit der Objektivheizung zu ermitteln, wurden alle Versuche zur Temperaturmessung des Inkubationseinsatzes für einfachen Volumenaustausch jeweils mit ein- und ausgeschalteter Objektivheizung durchgeführt.

Eine Stunde vor der Temperaturmessung des Einsatzes für einfachen Volumenaustausch wurde die Objektivheizung und der Mikroskoptisch-Inkubator vorgeheizt. Für die Messung wurde der Inkubationseinsatz mit einem Deckglas versehen und in das Mikroskop eingesetzt, ohne das Objektiv oder das Immersionsöl zu berühren. Anschließend wurde der Inkubationseinsatz mit der Spritzenpumpe verbunden. Dann wurde eine Temperaturmessung in 5-Sekunden-Intervallen gestartet und bei $t = 1 \text{ min}$ das Probenvolumen mit ddH_2O gefüllt. Nach weiteren 4 Minuten wurde Kontakt mit dem Immersionsöl hergestellt. Die Spritzen wurden jeweils entleert und die Spritzenpumpe mit frischem ddH_2O gefüllt. 25 Minuten nach Beginn der Messung wurde das Probenvolumen mit den in **Tabelle 4-8** angegebenen Einstellungen ausgetauscht. Die Temperatur wurde für weitere 90 Minuten aufgezeichnet. Das Experiment wurde in 3 unabhängigen Replikaten wiederholt.

Tabelle 4-8 – Pumpeinstellungen zur Temperaturmessung und zur Prüfung der Objektivheizung bei einfachem Volumenaustausch (basierend auf manuell durchgeführtem Volumenaustausch).

Parameter	Größe
Schrittdauer	2 s
Pumpdauer pro Schritt	1,5 s
Gesamtschrittzahl	53
Pumpgeschwindigkeit	718 µL/min

Wirksamkeit der Objektivheizung in Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch

Im Rahmen der Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch wurden vorläufige Experimente durchgeführt, um die Einstellung der Objektivheizung und des Mikroskoptisch-Inkubators zu optimieren. Dabei wurde eine optimale Temperatureinstellung von 40 °C und 40 °C für die Objektivheizung bzw. den Mikroskoptisch-Inkubator festgestellt. Voraussetzung war, dass eine stabile Temperatur zwischen 36 °C und 38 °C im Probenvolumen erreicht wird, während kontinuierlich ddH₂O mit der vorgesehenen Geschwindigkeit durch das Probenvolumen gepumpt wird.

Um die Wirksamkeit der Objektivheizung bei Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch zu ermitteln, wurden Experimente mit und ohne eingeschaltete Objektivheizung durchgeführt.

Eine Stunde vor dem Experiment wurde die Objektivheizung auf 40 °C und der Mikroskoptisch-Inkubator auf 40 °C vorgeheizt. Ein Deckglas wurde in den Einsatz für kontinuierlichen Volumenaustausch eingesetzt und der Einsatz auf dem Mikroskop montiert. Das Probenvolumen wurde mit 400 µL ddH₂O gefüllt und die Pumpe mit den üblichen Einstellungen für kontinuierlichen Volumenaustausch **Tabelle 4-9** gestartet, während simultan die Temperaturmessung in 5-Minuten-Inkrementen gestartet wurde. 30 Minuten nach Beginn der Messung wurde der Kontakt mit dem Immersionsöl und dem Deckglas hergestellt. Nach weiteren 20 Minuten wurde der Kontakt unterbrochen und weitere 20 Minuten später wiederhergestellt. Dieser Vorgang wurde weitere zwei Mal durchlaufen und die Messung beendet. Dieses Experiment wurde ein Mal durchgeführt.

Tabelle 4-9 – Pumpeinstellungen zur Temperaturmessung und zur Prüfung der Objektivheizung und der Abdeckhaube bei kontinuierlichem Volumenaustausch

Parameter	Größe
Schrittdauer	4 s
Pumpdauer pro Schritt	2,4 s
Gesamtschrittzahl	9500
Pumpgeschwindigkeit	118 µL/min

Wirksamkeit der Abdeckhaube in Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch

Aufgrund der Lüftungsanlage, welche in den Laborräumen installiert ist, kann die Temperatur eines offenen Inkubationseinsatzes stark schwanken. Um den Einfluss der Lüftung auf die Temperaturstabilität zu reduzieren, wurde eine provisorische Abdeckhaube aus einem Entsorgungsbeutel (siehe Abb. 14) zugeschnitten und auf dem Mikroskop angebracht. Zur Validierung wurden die folgenden Temperaturmessungen mit dem Einsatz für kontinuierlichen Volumenaustausch mit und ohne Abdeckhaube durchgeführt.

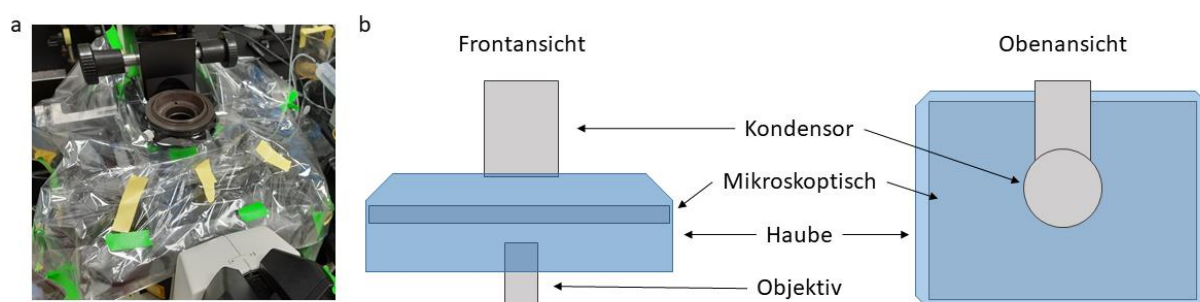


Abb. 14: Beispielhafte Darstellung der Abdeckhaube über dem Mikroskoptisch. (a) Foto der provisorischen Abdeckhaube über dem Mikroskoptisch. **(b)** Schematische Zeichnung der Position der Abdeckhaube (blau, transparent) in Relation zu Kondensor, Mikroskoptisch und Objektiv (grau).

Eine Stunde vor der Temperaturmessung wurde die Objektivheizung auf 40 °C und der Mikroskoptisch-Inkubator auf 40 °C vorgeheizt. Für die Messung wurde der Inkubationseinsatz mit einem Deckglas versehen und in das Mikroskop eingesetzt, ohne das Objektiv oder das Immersionsöl zu berühren. Anschließend wurde der Inkubationseinsatz mit der Spritzenpumpe verbunden. Dann wurde eine Temperaturmessung in 5-Sekunden-Intervallen gestartet und bei $t = 1$ min die Spritzenpumpe mit den für Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch üblichen Einstellungen **Tabelle 4-9** gestartet. Nach weiteren 4 Minuten wurde der Kontakt mit dem Immersionsöl hergestellt. Die Temperatur wurde weitere 10 Stunden lang gemessen. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Replikaten wiederholt.

4.2.7. Austausch des Probenvolumens

Da ein Austausch der Probenvolumina beider Inkubationseinsätze vorgesehen war, wurden Experimente durchgeführt, um den vollständigen Austausch zu visualisieren und zu bestätigen.

Experimente mit einfachem Volumenaustausch

Um zu bestätigen, dass die gewünschte Konzentration der verwendeten Antibiotika im Probenvolumen nach dem Austausch erreicht wird, wurde der folgende Versuch durchgeführt.

Für das Experiment wurde eine Nachbildung des Einsatzes und des Stopfens (Abb. 11) in einem Stück mit einem Mars 4 Harzdrucker (Elegoo) unter Verwendung eines klaren Harzes (Resione G217, Dongguan Godaid Technology Co. LMT) hergestellt. Die Nachbildung wurde mit Kanülen versehen und wie für ein Experiment mit einem Deckglas in den Inkubationseinsatz eingespannt und auf eine weiße Oberfläche gestellt. Im Anschluss wurde eine Kamera über der Öffnung des Inkubationseinsatzes positioniert. Anschließend wurde das Probenvolumen vollständig mit ddH₂O gefüllt. Eine 1:100 verdünnte Lösung mit blauer Tinte (Königsblau, Pelikan) wurde in eine 1-ml-Spritze gefüllt und gemeinsam mit einer leeren Entnahmespritze in die Spritzenpumpe eingesetzt. Der Austausch dauerte 90 Sekunden und wurde währenddessen gefilmt. Anschließend wurde die Zufuhrspritze mit ddH₂O gefüllt und der Vorgang wiederholt und aufgezeichnet. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Replikaten wiederholt.

Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch

Um zu bestätigen, dass die gewünschte Konzentration der verwendeten Antibiotika im Probenvolumen nach dem Austausch erreicht wird und ihre erfolgreiche Entfernung zu gewährleisten, wurden folgende zwei Experimente durchgeführt.

Für das erste Experiment wurde der Inkubationseinsatz für Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch auf dem Mikroskop ohne biologische Probe vorbereitet und das Probenvolumen mit 1xPBS gefüllt. Im nächsten Schritt wurde die Spritze mit der einlaufenden Lösung durch eine FITC-Dextran-Lösung (5 µg/mL in 1xPBS) ersetzt. Die Spritzenpumpe wurde entsprechend der Vorgehensweise eines Experiments mit kontinuierlichem Volumenaustausch vorbereitet. Für die Untersuchung wurden zehn Stellen in linearer Anordnung mit einem Abstand von circa 500 µm zwischen Einlass und Auslass ausgewählt. Die Positionen wurden unter Anregung mit 561 nm Laserlicht in 1-minütigen Intervallen abgebildet. Das Probenvolumen wurde kontinuierlich ausgetauscht und die Intensität an den ausgewählten Stellen über einen Zeitraum von 60 Minuten aufgezeichnet. Im Anschluss wurde die Eingangsspritze mit PBS gefüllt und der Schlauch durch einen 30 cm langen Schlauch ersetzt. Der Volumenaustausch wurde gestartet und die Messwerte für weitere 60 Minuten aufgezeichnet, um das Auswaschen des Farbstoffs zu verfolgen.

Im zweiten Experiment wurde der Einsatz mit Kanülen versehen, mit einem Deckglas in dem Inkubationseinsatz eingespannt sowie auf einer hellen Oberfläche platziert. Im Anschluss wurde eine Kamera über der Öffnung des Inkubationseinsatzes positioniert. Anschließend wurde das Probenvolumen vollständig mit ddH₂O gefüllt. Im nächsten Schritt wurde eine 1:100-verdünnte Lösung mit blauer Tinte (Königsblau, Pelikan) in eine 50-ml-Spritze gefüllt und gemeinsam mit einer leeren Entnahmespritze in die Spritzenpumpe eingesetzt. Der Austausch wurde über 60 Minuten durchgeführt und währenddessen ein Video aufgezeichnet. Im Anschluss wurde die eingehende Spritze mit ddH₂O befüllt und der Vorgang wiederholt und ebenfalls aufgezeichnet. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Replikaten wiederholt.

4.3. Versuchsprotokolle

Im Folgenden erfolgt die Beschreibung der durchgeführten Experimente. Sofern nicht anderweitig beschrieben, erfolgte die Inkubation bei einer Temperatur von 37 °C sowie einer Rotationsgeschwindigkeit von 150 rpm. Die Konzentration der Antibiotika betrug jeweils 8 µg/mL (Vancomycin), 4 µg/mL (Telavancin) und 2 µg/mL (Oxacillin) falls nicht anders beschrieben und betrug jeweils der 4-Fachen minimalen Hemmkonzentration (MHK). Die MHKs der Antibiotika wurden von Dr. Jan-Samuel Puls gemessen.¹⁷⁵

4.3.1. Lagerung und Vorbereitung der Bakterienkulturen

Die verwendeten Bakterienkulturen (siehe **Tabelle 4-7**) wurden aus einer bei -80 °C in Glycerol (50 % v/v) gelagerten Stammkultur auf MH-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Agar-Platten wurden zuvor mit dem zugehörigen selektiven Antibiotikum vorbereitet (siehe **Tabelle 4-7**). Im Anschluss wurden die Agarplatten für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert und anschließend sachgerecht entsorgt.

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde mittels optischer Dichte bei 600 nm ermittelt (OD₆₀₀). Zu diesem Zweck wurde jeweils ein Milliliter der Kultur in semi-mikro Küvetten gegen steriles Kulturmedium vermessen.

Die Vorkulturen wurden in einem Volumen von 1 mL kationisch angepasstem Mueller-Hinton-Medium (CAMH), gegebenenfalls unter Zugabe des selektiven Antibiotikums, vorbereitet und über Nacht inkubiert. Die Vorbereitung einer Hauptkultur erfolgte in einem Volumen von 2 bis 5 mL CAMH, sofern keine abweichenden Angaben gemacht wurden. Dabei wurde gegebenenfalls das selektive Antibiotikum und 100 µM Isopropyl-β-d-thiogalactopyranosid (IPTG) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4. Die selektiven Antibiotika sind mit den verwendeten Stämmen in **Tabelle 4-7** aufgeführt.

4.3.2. Vorbereitung zeitaufgelöster Experimente

Im Rahmen zeitaufgelöster Experimente mit Medienaustausch wurden die Bakterien auf einem Deckglas der Größe von 24 mm x 24 mm und einer Stärke von 170 µm mittels eines Antikörperfragments (Human BD Fc Block, FcB) immobilisiert und der Versuchsaufbau für das Experiment vorbereitet. Das Deckglas wurde zu Beginn der Vorbereitung in dem Deckglashalter (Abb. 11, a und Abb. 12, a) platziert. Sämtliche Lösungen sowie alle Manipulationen der Lösungen wurden möglichst zentral auf dem Deckglas positioniert und durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde eine 1,2 µL FcB-Stammlösung in 60 µL 1xPBS verdünnt und in der Mitte des Deckglases verteilt. Währenddessen wurde ein Volumen von einem Milliliter der Hauptkultur (OD₆₀₀ = 0,4) bei 15.000 g für die Dauer einer Minute zentrifugiert, das Medium entfernt, mit einem Volumen von einem Milliliter 1xPBS aufgefüllt und das entstandene Pellet resuspendiert. Im Anschluss wurde die Suspension bei 15.000 g für eine Minute zentrifugiert und die Lösung entfernt. Das resultierende Pellet wurde, sofern nicht anders beschrieben, in 250 µL 1xPBS resuspendiert. Im Anschluss wurde die FcB-Lösung vom Deckglas weitestgehend abpipettiert. Durch Auf- und Abpipettieren von 60 µL 1xPBS wurde die benetzte Oberfläche von nicht gebundenem FcB befreit. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension (60 µL) auf der benetzten

Stelle aufgetragen. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die benetzte Oberfläche erneut mit 60 μL 1xPBS gereinigt. Im Anschluss wurden 60 μL einer 3 %igen RSA-Lösung aufgetragen, welche für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Daraufhin wurde die Lösung entfernt, mit 60 μL 1xPBS gereinigt und anschließend das aufgetragene Volumen möglichst reduziert, sodass lediglich ein benetzter Film auf der Oberfläche zurückbleibt.

Um Schwankungen der Temperatur vorzubeugen, wurden der Objektivheizer und der Mikroskopisch-Inkubator mindestens eine Stunde vor Beginn der Experimente eingeschaltet. Ebenso wurden alle erforderlichen elektronischen Geräte 30 Minuten vor Beginn der Experimente eingeschaltet, um sie auf Betriebstemperatur zu bringen.

Für Experimente mit Volumenaustausch wurden jeweils zwei Silikonschläuche zur Verbindung mit der Spritzenpumpe vorbereitet. Die Schläuche für Experimente mit einfachem Volumenaustausch wurden jeweils auf eine Länge von 10 cm für die eingehende Lösung und 20 cm für den Ausgang gekürzt. Der Eingangsschlauch wurde nach jedem Experiment einer Sterilisation unterzogen und entsorgt. Für Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch wurden zwei Silikonschläuche für den initialen Eingang mit Antibiotikum mit einer Länge von 8 m vorbereitet. Für die anschließende Phase des Experiments, in der das Antibiotikum herausgewaschen wurde, wurden zwei weitere Silikonschläuche mit einer Länge von 30 cm verwendet. Die Schlauchpaare wurden abwechselnd nach den Experimenten desinfiziert, gespült und sterilisiert.

4.3.3. Zeitaufgelöste Experimente mit einfachem Volumenaustausch

Im Vorfeld der Experimente wurde die manuelle Spritzenpumpe in ihre Ausgangsposition gebracht und eine Menge von 1,2 μL des Ausgangs- sowie des Austauschmediums vorbereitet. In die Spritzenpumpe wurden zwei 1-ml-Spritzen eingelegt, wobei eine Spritze leer war und die andere mit 1 ml des Anfangsmediums gefüllt wurde.

Das vorbereitete Deckglas mit der Probe wurde zusammen mit dem Einsatz in den vorgeheizten Inkubationseinsatz eingesetzt. Daraufhin wurde der Deckel mit Stopfen und eingeklebten Kanülen aufgesetzt und mit Schrauben fixiert. Im Anschluss wurden die Ein- und Ausgangskanülen mit den Schläuchen verbunden (siehe Kapitel 4.2.5) und das Probenvolumen unter Verwendung der Kurbel vollständig mit dem Anfangsmedium befüllt. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen in das Probenvolumen oder den Zugangsschlauch gelangten. Im Anschluss wurden die 1-ml-Spritzen gegen eine leere Entnahmespritze und eine mit dem Austauschmedium gefüllte Zufuhrspritze ausgetauscht und wieder mit den Kanülen verbunden. Anschließend wurde die Probe mit dem Objektiv fokussiert und eine Wartezeit von 5 Minuten eingehalten. Die Wartezeit dient der Stabilisierung der Temperatur innerhalb der Probe, bevor die Messung gestartet wurde.

Die Einstellungen und Parameter für die jeweiligen Experimente mit einfachem Volumenaustausch sind in **Tabelle 4-10** bis **Tabelle 4-11** aufgeführt.

Nach einer Dauer von 20 Minuten wurde das Probenvolumen durch das Austauschvolumen ersetzt, welches mittels der Spritzenpumpe durch Kurbeln zugeführt wurde. Dieser Vorgang wurde exakt nach Abschluss der

Aufnahme für Zeitpunkt 3 ausgeführt, wobei für alle Experimente mit einfachem Volumenaustausch dieser Zeitpunkt als $t = 0$ min definiert wird.

Experimente mit FtsZ-mCherry- oder PBP2-GFP-exprimierendem Staphylococcus aureus

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung von FtsZ-mCherry-exprimierendem *S. aureus* (RN4220 pcq11-FtsZ-mCherry) und PBP2-GFP-exprimierenden *S. aureus* (RN4220 RNpPBP2-31) durchgeführt. Dabei wurden den Wachstumsmedien 10 µg/mL Erythromycin zugesetzt. Bei FtsZ-mCherry-exprimierenden Bakterien wurde zusätzlich 100 µmol/L IPTG zugesetzt. Die Vorkultur wurde hingegen ohne IPTG kultiviert. Das Experiment wurde gemäß der zuvor beschriebenen Methode durchgeführt. Eine Auflistung der experimentellen Parameter findet sich in **Tabelle 4-10**.

Das Ausgangsmedium bestand aus CAMH mit 10 µg/mL Erythromycin und bei Experimenten mit FtsZ-mCherry-exprimierenden *S. aureus* zusätzlich 100 µmol/L IPTG. Dem Austauschmedium wurde zusätzlich Vancomycin, Telavancin oder Oxacillin zugefügt.

Tabelle 4-10 – Experimentelle Parameter für <i>in-vivo</i> Experimente mit FtsZ-mCherry- und PBP2-GFP-exprimierenden <i>S. aureus</i> (RN4220 pcq11-FtsZ-mCherry, RN4220 RNpPBP2-31) und einfachem Volumenaustausch		
Parameter	FtsZ-mCherry	PBP2-GFP
Kanäle	PC; 561 nm	Durchlicht; 488 nm
Beleuchtungsintensität (hinter Objektiv)	30 %; 1,8 mW	2,2 %; 0,25 mW
Leistungsdichte (geschätzt für 75° HILO)	-; 70 W/cm ²	-; 11 W/cm ²
Belichtungszeit	100 ms; 200 ms	100 ms; 400 ms
Objektiv	Nikon, Apo TIRF, 100x, 1.49 NA; 37°C	
z-Stapel		
Positionen		
Bildfeld		
Messintervall		
	-500 nm bis 500 nm; 250 nm Schritt	
	10 (zufällig ausgewählt)	
	ca. 60 µm x 60 µm	
	10 min Intervalle; -20 min bis 70 min	

Die Experimente wurden jeweils in unabhängigen Triplikaten durchgeführt.

Vor der Durchführung der Experimente mit PBP2-GFP-exprimierenden *S. aureus* unter der Zugabe von Antibiotika, wurde ein Experiment mit erhöhter Laserleistung durchgeführt, um ein höheres Signal von PBP2-GFP zu erhalten. Dieses Experiment diente auch dazu, den Effekt der Beleuchtung mit 488 nm auf die Bakterien zu untersuchen. Die Laserleistung wurde dabei auf 3,45 mW eingestellt (Leistungsdichte geschätzt für 75° HILO: 154 W/cm²) und die Bakterien 90 Minuten lang in 10-minütigen Intervallen abgebildet. Für dieses Experiment wurde der PC anstelle des Durchlichts verwendet. Zwei unabhängige Replikate wurden durchgeführt.

Experimente zur Feststellung des Sterbezeitraums

Initiale Experimente zur Untersuchung der Persistenz von *S. aureus* wurden mit einfachem Volumenaustausch durchgeführt, um den idealen Zeitpunkt für die Entfernung des Antibiotikums zu bestimmen. Es wurden sieben unabhängige Experimente analog zu Experimenten mit FtsZ-mCherry-exprimierenden *S. aureus* mit Oxacillin durchgeführt. Dabei wurde dem Ausgangs- und Austauschmedium SYTOX™ Green zu einer Endkonzentration von 0,5 µmol/L zugefügt und insgesamt 24 Stunden gemessen. Die Messparameter sind in **Tabelle 4-11** aufgeführt.

Tabelle 4-11 – Messparameter für <i>in-vivo</i> Experimente mit FtsZ-mCherry-exprimierenden <i>S. aureus</i> (RN4220 pcq11-FtsZ-mCherry) unter Zusatz von SYTOX™ Green mit einfachem Volumenaustausch	
Parameter	Größe
Kanäle	PC; 488 nm; 561 nm
Beleuchtungsintensität (hinter Objektiv)	40 %; 0,25 mW; 2,9 mW
Belichtungszeit	100 ms; 100 ms; 200 ms
Objektiv	Nikon, Apo TIRF, 100x, 1.49 NA; 37°C
Leistungsdichte (geschätzt für 75° HILO)	-; 11 W/cm ² ; 110 W/cm ²
z-Stapel	-500 nm bis 500 nm; 250 nm Schritt
Positionen	10 (zufällig ausgewählt)
Bildfeld	ca. 60 µm x 60 µm
Messintervall #1	10 min Intervalle; -20 min bis 50 min
Messintervall #2	30 min Intervalle; 60 min bis 24 h

Die Experimente wurden in sieben unabhängigen Replikaten durchgeführt.

4.3.4. Zeitaufgelöste Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch

Im Folgenden wird die zeitaufgelöste fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. aureus* beschrieben, welche mit kontinuierlichem Volumenaustausch durchgeführt wurde. Die Experimente dienten dazu, das Verhalten persistenter Bakterien über einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden zu beobachten.

Im Rahmen der Vorbereitungen wurden in zwei 250-Milliliter-Flaschen jeweils 100 mL (NM1) und 75 mL (NM2) des Nährmediums (CAMH) vorbereitet. Zudem wurde dem NM1 eine Menge von 20 µl einer Oxacillin-Stammlösung (10 mg/ml in ddH₂O) hinzugefügt, um eine Endkonzentration von 2 µg/ml an Oxacillin zu erreichen. Im nächsten Schritt wurden 60 µL des NM1 in eine 50-mL-Spritze gefüllt und in die motorisierte Spritzenpumpe eingesetzt. Im Anschluss wurde ein Spritzenfilter an der befüllten Spritze angebracht und eine weitere leere Spritze in die Spritzenpumpe eingesetzt. Vor Beginn des Experiments wurde der 8 Meter lange Silikonschlauch mit 4 mL des NM2 befüllt und gespült. Im Anschluss wurde die Kanüle des Schlauchs auf den Spritzenfilter gesetzt. Anschließend wurde ein 20 cm langer Schlauch samt Kanülen an der leeren Spritze befestigt.

Die Vorbereitung der Probe erfolgte gemäß der Beschreibung in Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 und wurde anschließend in den Inkubationseinsatz für kontinuierlichen Volumenaustausch eingesetzt. Die Verbindung der Kanülen und der Schläuche für die eingehende und herauskommende Lösung erfolgte gemäß der Darstellung in Abb. 13, b.

Pumpschema und Messintervalle

Im Folgenden wird das Pumpschema für Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch beschrieben. Alle Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch folgten, wenn nicht anders beschrieben, dem in Abb. 15 dargestellten Pumpschema.

Die Volumengeschwindigkeit der Pumpe wurde auf 118 $\mu\text{L}/\text{min}$ eingestellt. In einem Intervall von vier Sekunden wurde für die Dauer von 2,4 Sekunden gepumpt, während die restliche Zeit des Intervalls gewartet wurde. Die Netto-Volumengeschwindigkeit wurde mit 84 $\mu\text{L}/\text{min}$ ermittelt. Zudem wurde eine Anzahl von 10.000 Pumpschritten eingestellt und die Pumpe gestartet. Nach einer Zeitspanne von 15 Minuten wurde das erste Messintervall des Experiments initiiert. Nach einer Dauer von 60 Minuten wurde das zweite Messintervall begonnen. Elf Stunden nach dem Start der Spritzenpumpe wurde diese gestoppt und die Zufuhrspritze mit 15 mL NM1 gefüllt, während der Entnahmespritze eine Menge von 15 mL Lösung entnommen wurde. Die Pumpe wurde um 2000 Schritte zurückgesetzt und mit weiteren 2000 Schritten eingeschaltet. Zwölf Stunden und 25 Minuten nach dem Pumpenstart zu Beginn des Experiments wurde die Pumpe gestoppt und die Zufuhrspritze durch eine mit NM2 gefüllte Spritze ersetzt. Im Anschluss wurde die Entnahmespritze geleert und ein weiterer Satz von 10.000 Schritten für die Pumpe programmiert und eingeschaltet. Nach einer weiteren Zeitspanne von 35 Minuten startete das dritte Messintervall. Nach weiteren zehn Stunden wurden die Experimente beendet.

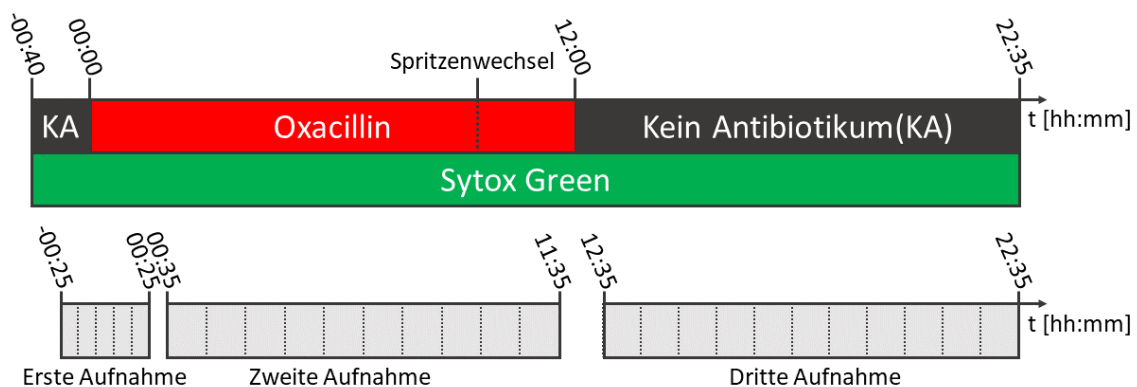


Abb. 15: Pumpschema und Messintervalle für zeitaufgelöste Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch. Die Experimente sind jeweils in drei Messintervalle geteilt, da initial in 10-minuten Intervallen abgebildet wurde und ab 35 Minuten nach Zugabe des Antibiotikums die Messintervalle auf 60 Minuten erhöht wurden. Der Spritzenwechsel erfolgt spätestens 11 Stunden und 11 Minuten nach Start der Pumpe. 12 Stunden nach Zugabe des Antibiotikums wurde die Zufuhrspritze mit Medium gefüllt, welches kein Antibiotikum enthielt. Nach weiteren 35 Minuten wurde das letzte Messintervall über weitere 10 Stunden gestartet.

Experimente mit *FtsZ-mCherry*- und *MurJ-mGreen*-exprimierendem *Staphylococcus aureus*

Zur Ermittlung der Sterbezeitpunkte der Bakterien unter Zugabe von Oxacillin, sowie der Verfolgung des Anteils der toten Bakterien, wurde SYTOX™ Green den Lösungen NM1 und NM2 zugefügt. Die Untersu-

chung der Z-Ringgrößen der persistenten und sterbenden Bakterien erfolgte durch die Langzeitbeobachtung von FtsZ-mCherry-exprimierenden (RN4220 pcq11-FtsZ-mCherry) *S. aureus* unter Zugabe und nach Entfernen von Oxacillin. Die Untersuchung der Teilungszeiträume der Bakterien sowie die Charakterisierung persistenter Bakterien erfolgte durch die Langzeitbeobachtung von FtsZ-mCherry- und MurJ-nGreen-exprimierenden (RN4220 pcq11-MurJ-nGreen) *S. aureus* unter Zugabe und nach Entfernen von Oxacillin.

MurJ-nGreen-exprimierende *S. aureus* wurden ursprünglich ausgewählt, um Besonderheiten bezüglich der Lokalisierung des MurJ in dem Teilungszyklus persistenter Bakterien auszumachen. Es wurde allerdings keine außergewöhnliche Lokalisierung festgestellt. Die Daten eignen sich dennoch zur Bestimmung des Teilungszeitraumes.

FtsZ-mCherry-exprimierende *S. aureus* (RN4220 pcq11-FtsZ-mCherry) wurden wie zuvor beschrieben (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2) vorbereitet und zusätzlich SYTOX™ Green den Nährmedien NM1 und NM2 bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µmol/L beigelegt.

Außerdem wurden Experimente ohne SYTOX™ Green mit FtsZ-mCherry-exprimierenden *S. aureus* und MurJ-nGreen-exprimierenden *S. aureus* (RN4220 pcq11-MurJ-nGreen) durchgeführt.

Die Einstellungen für die Experimente sind in **Tabelle 4-12** aufgeführt.

Parameter	FtsZ-mCherry + SYTOX™ Green	FtsZ-mCherry	MurJ-nGreen		
Kanäle	PC; 488 nm; 561 nm	PC; 561 nm	PC; 488 nm		
Beleuchtungsintensität (hinter Objektiv)	40 %; 0,4 mW; 1,8 mW	40 %; 1,8 mW	40 %; 0,4 mW		
Leistungsdichte (geschätzt für 75° HILO)	-; 11 W/cm²; 110 W/cm²	-; 110 W/cm²	-; 11 W/cm²		
Belichtungszeit	100 ms; 50 ms; 200 ms	100 ms; 200 ms	100 ms; 50 ms		
z-Stapel	-750 nm bis 750 nm; 250 nm Schritt	-750 nm bis 1500 nm; 250 nm Schritt			
Objektiv	Nikon, Apo TIRF,100x, 1.49 NA; 37°C				
Positionen	8 x 8 Raster, 10 µm Überlappung				
Aufnahme #1	10 min Intervalle; -25 min bis 35 min				
Aufnahme #2	60 min Intervalle; 35 min bis 11 h 35 min				
Aufnahme #3	60 min Intervalle; 12 h 35 min bis 22 h 35 min				

Das Experiment unter Zugabe von SYTOX™ Green, mit Expression von FtsZ-mCherry und kontinuierlichem Volumenaustausch wurde in vier unabhängigen Replikaten durchgeführt. Das erste und das zweite Replikat beginnen bei -10 min bzw. -15 min, da fehlerhafte Einstellungen zu Verzögerungen führten und der erste Messzeitpunkt verworfen wurde. Die weiteren zwei Replikate beginnen bei -25 min.

Das Experiment mit FtsZ-mCherry-exprimierenden *S. aureus* und kontinuierlichem Volumenaustausch wurde in unabhängigen Triplikaten durchgeführt.

Das Experiment mit MurJ-nGreen-exprimierenden *S. aureus* und kontinuierlichem Volumenaustausch wurde in unabhängigen Triplikaten durchgeführt.

4.3.5. Reinigung der wiederverwendbaren Materialien nach zeitaufgelösten Experimenten

Im Anschluss an die zuvor beschriebenen zeitaufgelösten Experimente wurden einzelne Komponenten des Aufbaus einer Reinigung unterzogen, um eine Kontamination oder Verunreinigung zu vermeiden.

Die in 4.3.3 verwendeten Schläuche sowie der Einsatz mit den Kanülen wurden zweimal mit 70 % v/v Ethanol (EtOH) durchgespült und anschließend in ein Ultraschallbad mit 70 % v/v EtOH gelegt. Nach einer Dauer von zehn Minuten im Ultraschallbad wurden die Schläuche und der Einsatz drei weitere Male mit ddH₂O gespült und getrocknet. Der Zugangsschlauch wurde nach jedem Experiment gemäß dem beschriebenen Reinigungsprozess gereinigt, anschließend sachgerecht entsorgt und durch einen neuen ersetzt.

Die in 4.3.4 verwendeten Schläuche und der Einsatz mit den Kanülen wurden anschließend zusätzlich autoklaviert und wiederverwendet.

Alle verwendeten Spritzen wurden nach den Experimenten Autoklaviert und sachgerecht Entsorgt.

4.4. Datenverarbeitung und Auswertung

Die Daten aus den fluoreszenzmikroskopischen Experimenten mussten zunächst einer Verarbeitung unterzogen und anschließend ausgewertet werden, um eine Interpretation zu ermöglichen. Die nachfolgenden Kapitel widmen sich der Darstellung und Erläuterung der genannten Prozesse.

4.4.1. Experimente mit einfachem Volumenaustausch

Die Verarbeitung der Daten aus Experimenten mit einfachem Volumenaustausch unterscheidet sich von der Verarbeitung der Daten aus Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch.

Dekonvolution

Die Dekonvolution der Daten aus Experimenten mit einfachem Volumenaustausch wurde unter Einsatz der Erweiterung "DeconvolutionLab2"¹⁷¹ für Fiji (ImageJ) durchgeführt, wenn nicht anders beschrieben. Als Algorithmus wurde der R-L-Algorithmus verwendet. Die für die Berechnung erforderliche PSF wurde mit einer anderen Erweiterung, dem sogenannten „PSF Generator“¹⁷², simuliert.

Die Simulation der PSF erfolgte unter Zuhilfenahme des von Born und Wolf entwickelten 3D-optischen Modells.¹⁷⁶ Die Pixelgröße wurde auf 65 nm und die numerische Apertur auf 1,49 eingestellt. Die Simulation wurde für eine Fläche von 256 px mal 256 px und eine Höhe von 6,5 μm in 0,1 μm -Schritten durchgeführt. Die Wellenlänge wurde entsprechend dem Emissionsmaximum des verwendeten Fluorophors adaptiert. Für das GFP beträgt die entsprechende Wellenlänge 515 nm, für mCherry 610 nm.

Zur Dekonvolution größerer Datensätze wurde ein ImageJ-Makro entwickelt, welches die zehnfache Iteration des R-L-Algorithmus für jeden Zeitpunkt der Messung über den gesamten Bereich durchführt.

Verarbeitung der Daten zur Bestimmung der Z-Ringgröße und PBP2-Proteinverteilung

Die aus Experimenten mit einfachem Volumenaustausch gewonnenen Daten wurden in ähnlicher Weise verarbeitet. Die Verarbeitung der FtsZ-mCherry-exprimierenden Bakterien erfolgt mit dem Ziel, eine Klassifizierung nach der Z-Ringgröße vorzunehmen und die Ringgröße über den Verlauf des Experiments zu messen. Im Gegensatz dazu wurde bei den PBP2-GFP-exprimierenden Bakterien eine Klassifizierung nach der Lokalisierung des Proteins an das Septum über den gesamten Verlauf der Experimente vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen den zwei Klassen zugeordnet und die Übergänge der Bakterien in die jeweils andere Klasse zu beobachtet.

Ein Fließschema, welches die Verarbeitung visualisiert, ist in Abb. 16 dargestellt.

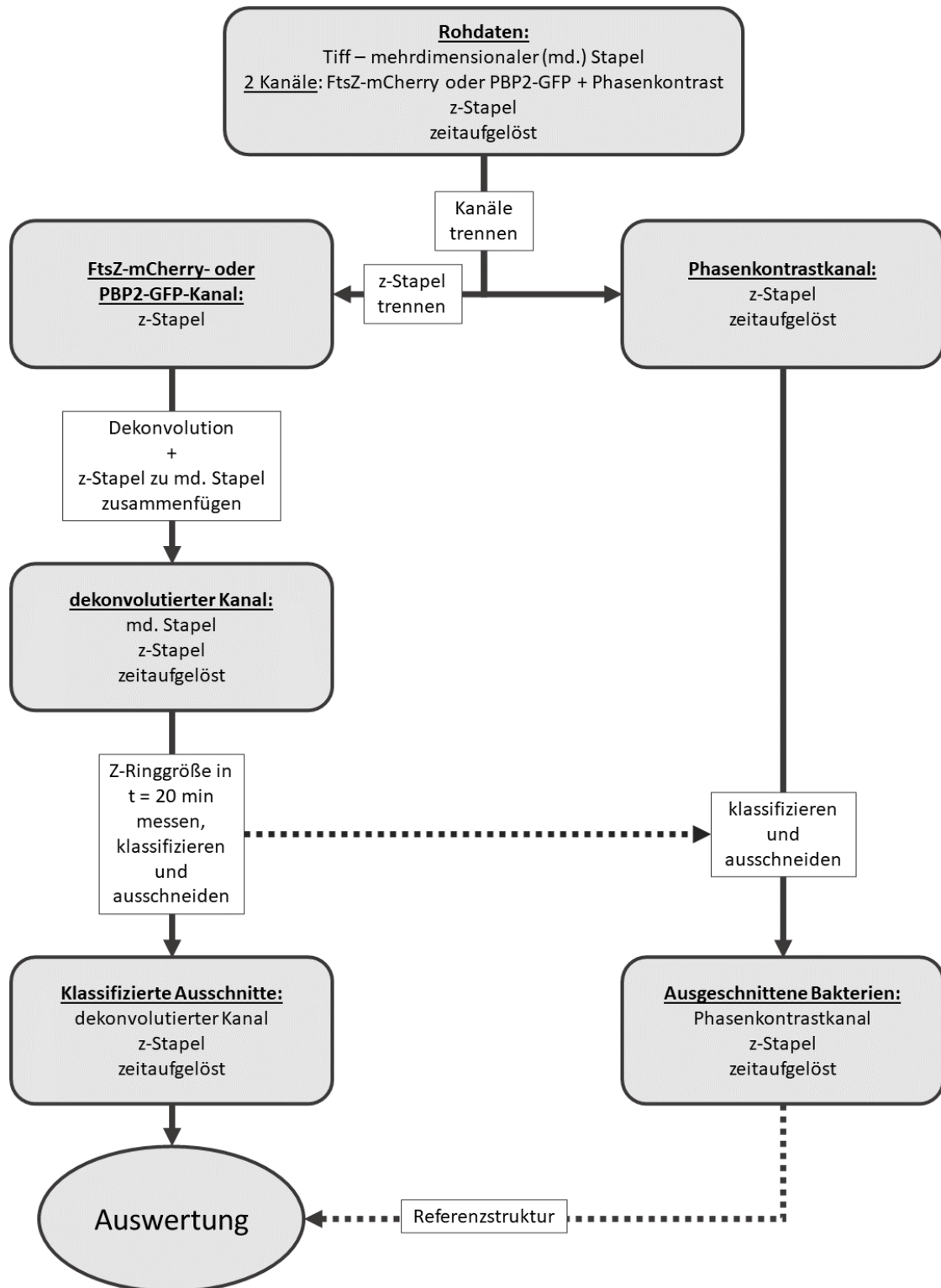


Abb. 16: Verarbeitung der Daten aus Experimenten mit einfachem Volumenaustausch. Fließschema der Verarbeitung der Daten zur Bestimmung der Z-Ringgrößen und PBP2-Proteinverteilung.

Zunächst wurde der FtsZ-mCherry- oder PBP2-GFP-Kanal von dem PC-Kanal getrennt. Anschließend wurde der mehrdimensionale Stapel entlang der Zeitachse getrennt, sodass für jeden Zeitpunkt ein entsprechender z-Stapel erhalten wurde. Danach erfolgte eine Dekonvolution des FtsZ-mCherry- oder PBP2-GFP-Kanals

sowie die anschließende Zusammenführung der z-Stapel zu einem neuen, mehrdimensionalen Stapel. Der enthielt den dekonvolvierten Kanal in Form eines z-Stapels für jeden Zeitpunkt des Experiments. Im nächsten Schritt wurde die Größe des Z-Rings der Bakterien zum Zeitpunkt $t = 0$ min gemessen und klassifiziert. Anschließend wurden Bildausschnitte der Bakterien mit einer Größe von ca. 70 x 70 Pixeln für die nachfolgende Auswertung ausgeschnitten und gespeichert.

Die FtsZ-mCherry-exprimierenden Bakterien wurden nach vier Klassen kategorisiert. Beispiele der vier Klassen sind in Abb. 17 dargestellt. Die Einteilung der Klassen erfolgte anhand der Größe des Z-Rings bzw. der FtsZ-Verteilung in den Zellen zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Eine Übersicht der Klassen mit ihren jeweiligen Charakteristiken ist in **Tabelle 4-13** dargestellt.

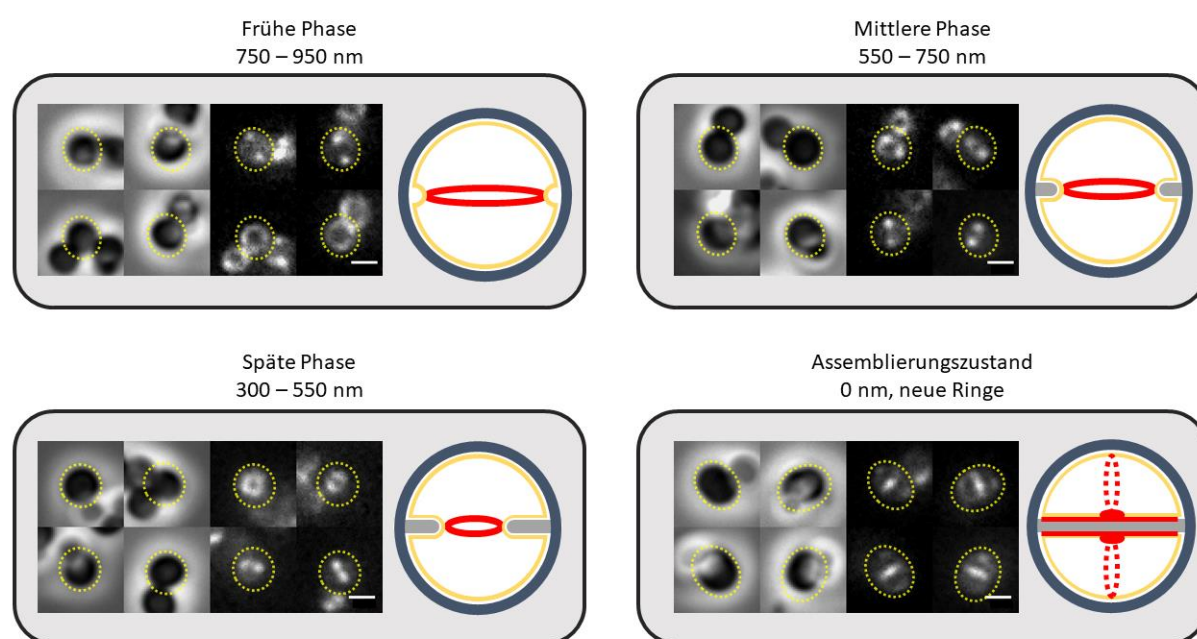


Abb. 17: Beispiele der Klassen zur Messung der Z-Ringgröße. Jeweils vier repräsentative Beispiele (gelbe Kreise) in PC- (links) und FtsZ-mCherry- (rechts) Kanal mit schematischem Beispiel der Proteinverteilung des FtsZ (rot) der vier verwendeten Klassen. Skala 1 μ m. In Schema: Dunkelbau – periphere Zellwand; gelb – Zellmembran; grau – septale, neue Zellwand; rote (gepunktete) Linie – FtsZ-Lokalisierung.

Tabelle 4-13 – Klassen aufgrund der Z-Ringgröße und zusätzliche Kriterien.		
Klasse	Z-Ringgröße [nm]	Zusätzliche Kriterien
Assemblierungszustand	0 (neuer Ring wird gemessen)	Ausbildung neuer Z-Ringe
Frühe Teilungsphase	780 – 910	-
Mittlere Teilungsphase	585 – 715	-
Späte Teilungsphase	390 – 520	-

In jedem der drei Replikate des Experiments wurden jeweils 30 Bakterien jeder Klasse ausgewählt und einer Auswertung unterzogen.

Im Rahmen der Bestimmung der PBP2-Verteilung erfolgte eine zufällige Auswahl von 30 Bakterien aus jedem Replikat, deren weitere Auswertung folgte.

Automatisierte Verarbeitung der Daten zur Bestimmung der Z-Ringgröße

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde ein optimierter Arbeitsfluss entwickelt, der die automatisierte Verarbeitung der Daten ermöglichte. Die automatisierte Verarbeitung bringt den Vorteil der Parallelisierung der Schritte, wodurch die Auswertung schneller erfolgen konnte. Außerdem kann sie den Einfluss der Befangenheit auf die Auswahl der Daten vermindern. Ein Fließschema des Ablaufs ist in Abb. 18 gezeigt.

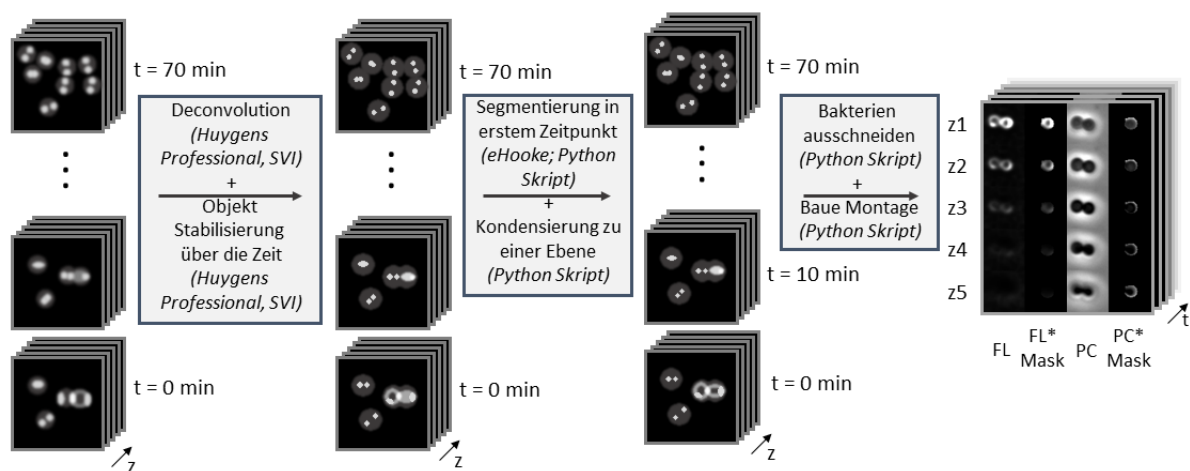


Abb. 18: Optimierte Datenverarbeitung zur Bestimmung der Z-Ringgröße. Der FtsZ-mCherry-Kanal wird dekonvolutiert und über die Zeit räumlich stabilisiert. Dem folgt eine Segmentierung der Zellen im ersten Zeitpunkt in allen Ebenen. Da es hierbei zu Duplikaten kommt, werden diese anhand ihrer Position entfernt. Es folgt ein Prozess in dem die Bakterien über den gesamten Beobachtungszeitraum ausgeschnitten werden und für die Auswertung in einer Montage angeordnet werden.

Die Daten wurden in zwei Schritten mit „Huygens Professional“ (Scientific Volume Imaging B.V.) dekonvolutiert und die räumliche Position der Bakterien in allen Kanälen über die Zeit stabilisiert. Anschließend wurde ein Python-Skript basierend auf dem Programm eHooke¹⁶⁹ verwendet. Dieses ermöglicht die Segmentierung in allen z-Ebenen des ersten Messzeitpunktes und die Bestimmung der Zellpositionen auf Grundlage des PC-Kanals. Um Duplikate einzelner Zellen, die in mehreren Ebenen auftauchen, zu vermeiden wurde ein weiteres Skript verwendet. Dieses bestimmt die Abstände der Zellen zueinander und eliminiert diejenigen, welche unmöglich zwei Individuen sein können. Anschließend wird ein Skript genutzt, das die zuvor bestimmten Positionen nutzt, um mehrdimensionale Stapel aus den Aufnahmen herauszuschneiden, in denen die Zellen über den gesamten Zeitraum zu sehen sind. Das Skript erzeugt dann für jeden Zeitpunkt in der Position eine Montage mit allen z-Ebenen und Kanälen und speichert sie für die anschließende Auswertung als Bilderstapel ab.

Die einzelnen Verarbeitungsschritte können unabhängig voneinander durchgeführt werden und laufen selbstständig ab.

Auswertung der Daten aus Experimenten mit einfachem Volumenaustausch

Die erhaltenen mehrdimensionalen Stapel der Bakterien, welche als z-Stapel über die Zeit mit mehreren Kanälen vorliegen, wurden zur Bestimmung der Z-Ringgröße und der Bestimmung der PBP2-Verteilung unterschiedlich ausgewertet.

Bestimmung der Replikationszeit und Lebensfähigkeit

In jedem Replikat der FtsZ-mCherry- und PBP2-GFP-Versuche wurden 30 Bakterien ausgewählt, die sich während des Versuchszeitraums zweimal teilten. Für diese Bakterien wurden die Zeitpunkte bestimmt, zu denen sich die Tochterzellen trennten und die Zeitdifferenz ermittelt, um den Replikationszeit zu erlangen.

Bestimmung der Z-Ringgröße

Im Rahmen der Auswertung wurden die ausgeschnittenen mehrdimensionalen Stapel der Bakterien geöffnet und für jeden Zeitpunkt des Experiments die Z-Ringgröße der individuellen Zellen ermittelt. Dazu wurde die z-Ebene mit dem größten Durchmesser des Z-Rings ausgewählt. Es wurde ein Linienprofil durch den Z-Ring gewählt und ein Intensitätsprofil erstellt. Die Positionen der beiden Maxima wurden bestimmt und voneinander subtrahiert, um die Größe des Rings zu berechnen. Diese Prozedur wurde für alle Zeitpunkte des Experiments durchgeführt, um die Größenänderung des Z-Rings eines Bakteriums zu bestimmen. Bei Zellen, die zu Beginn als Assemblierungszustand klassifiziert wurden, erfolgte die Messung der Z-Ringgröße über die neu gebildeten Z-Ringe orthogonal zum ausgebildeten Septum. In allen anderen Fällen wurde entlang des sich schließenden Septums gemessen. Die Z-Ringgrößen wurden dann entsprechend der Klassifizierung gegen die Zeit aufgetragen.

Bestimmung der PBP2-Verteilung

Die mehrdimensionalen Stapel der Bakterien wurden geöffnet und die Verteilung des PBP2-Proteins für jeden Zeitpunkt in zwei Klassen eingeteilt. Die Einordnung des betrachteten Proteins erfolgt zunächst anhand seiner Lokalisation. Befindet sich das Protein nur auf der äußeren Hülle des Bakteriums, wird es als peripher-lokalisierend klassifiziert. Akkumuliert PBP2 hingegen an der septalen Position, ergibt sich die Klassifizierung "septal lokalisierend". Für die Auswertung wurden alle ausgewählten Bakterien über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet und einzeln ausgewertet. Auf diese Weise kann der Klassenwechsel nachvollzogen und in einem Sankey-Diagramm dargestellt werden.

Halbautomatisierte Auswertung der Daten zur Bestimmung der Z-Ringgröße

Im Rahmen der beschriebenen optimierten Verarbeitung wurde ein Arbeitsablauf entwickelt, um Teile der Auswertung zu automatisieren und den Einfluss von Befangenheit zu reduzieren. Zu diesem Zweck wurde ein ImageJ-Makro genutzt, um die Anzahl der zur Auswertung benötigten Eingaben möglichst weit zu verringern. Die Struktur des Algorithmus ist in Abb. 19 dargestellt.

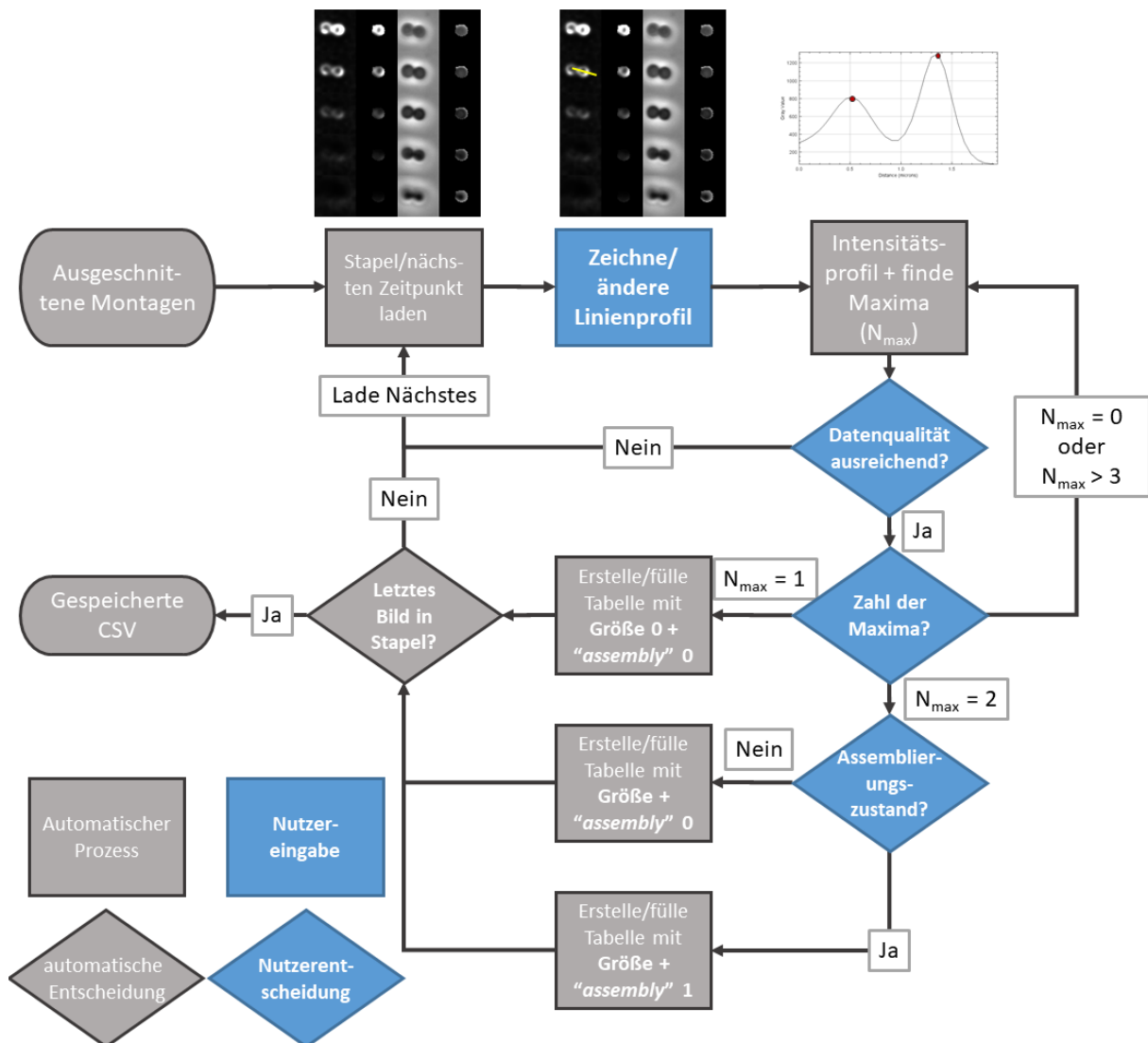


Abb. 19: Algorithmus zur halbautomatischen Auswertung der Z-Ringgröße. Der Nutzer muss lediglich eine Linie für das Profil zeichnen und entscheiden, ob die Datenqualität ausreichend ist, ob die Zahl der Maxima stimmt und ob es sich um den Assemblierungszustand handelt.

Zu Beginn wird ein Montage-Stapel geladen und das erste Bild gezeigt. Im Anschluss wird ein Linienprofil von dem Nutzer gezeichnet. Das Programm generiert ein Intensitätsprofil und gibt basierend auf der Anzahl ermittelter Maxima eine vorläufige Auswahl an. Diese kann angepasst werden und je nach Auswahl wird eine Tabelle mit der Größe des Z-Rings und einer zusätzlichen Klassifizierung („assembly“, 0 oder 1) gefüllt.

Nach erfolgter Auswahl und Eingabe wird das nächste Bild des Montage-Stapels aufgerufen. Dieser Zyklus wird wiederholt, bis das letzte Bild des Stapels geschlossen wird. Dabei wird die Tabelle als eigenständige Datei in einem ausgelegten Ordner gespeichert und die Messtabelle geleert. Daraufhin wird automatisch der nächste Montage-Stapel geöffnet.

Die Daten, die die gemessenen Z-Ringgrößen umfassen, unterliegen anschließend einer statistischen Auswertung mithilfe eines Python-Skriptes. Im Falle der zu Beginn kategorisierten Zellen wurden die Daten auf Grundlage der Z-Ringgröße zum Zeitpunkt der Zugabe des Antibiotikums oder der Zusatzklassifizierung „assembly“ (für den Assemblierungszustand) gefiltert und anschließend statistisch ausgewertet. Zusätzlich wurde eine statistische Auswertung über alle Zellen vorgenommen.

4.4.2. Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch

Die nachfolgenden Kapitel umfassen die Beschreibung der Verarbeitung und Auswertung der Daten aus Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch.

Verarbeitung der Daten zur Ermittlung der Anzahl toter Bakterien unter Zugabe von Oxacillin

Um zu demonstrieren, welcher Zeitpunkt der Antibiotikaentfernung angemessen ist, wurde die Anzahl der toten Bakterien mittels SYTOX™ Green in vier Experimenten verfolgt. Die Auswertung der Daten aus den Experimenten erfolgte gemäß Abb. 20 und gibt die Struktur des verwendeten ImageJ-Makros dar.

Zu Beginn der Auswertung erfolgte die Aufteilung der Rohdaten in die entsprechenden Kanäle. Der Zählprozess beschreibt sich für die Gesamtzahl und die Zahl toter Bakterien gleich. Zunächst wurde ein 3-dimensionaler Gauss-Filter („*Gaussian Blur 3D*“) mit einer Größe von 2 Pixeln in x-, y- und z-Richtung auf den jeweiligen mehrdimensionalen Kanalstapel angewandt. Darauf folgten eine Summenprojektion und das Zählen der Maxima zu den einzelnen Zeitpunkten. Der FtsZ-mCherry-Kanal diente der Bestimmung der Gesamtzahl, während der SYTOX™ Green-Kanal für die Erfassung der Zahl toter Bakterien verwendet wurde.

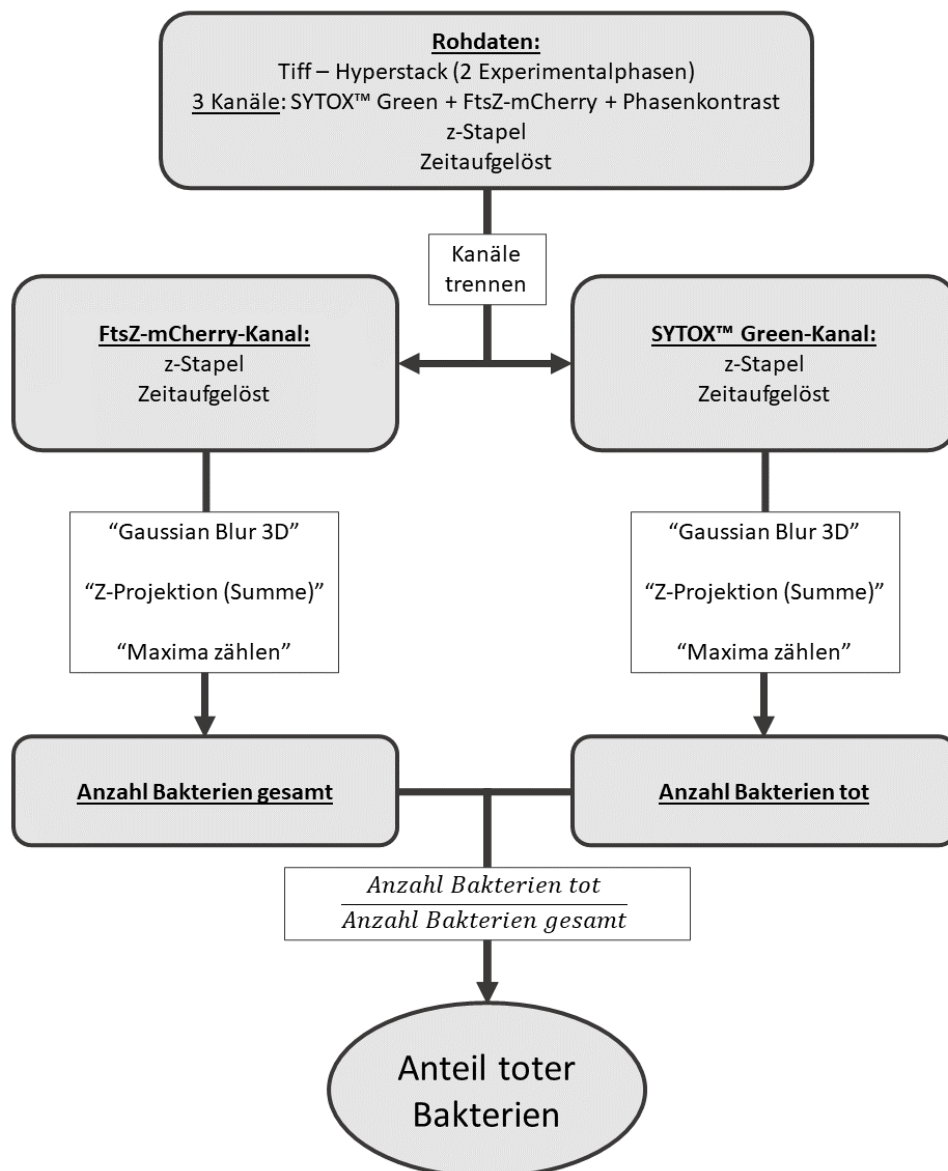


Abb. 20: Verarbeitung und Analyse der Daten zur Ermittlung der Anzahl toter Bakterien. Fließschema zur Ermittlung der Anzahl toter Bakterien unter Zugabe von Oxacillin mithilfe von SYTOX™ Green.

Verarbeitung der Daten zur Ermittlung des Teilungszeitraums persistenter Bakterien

Der Prozess für die Verarbeitung der Daten zur Ermittlung des Teilungszeitraums ist schematisch in dem Fließdiagramm in Abb. 21 dargestellt.

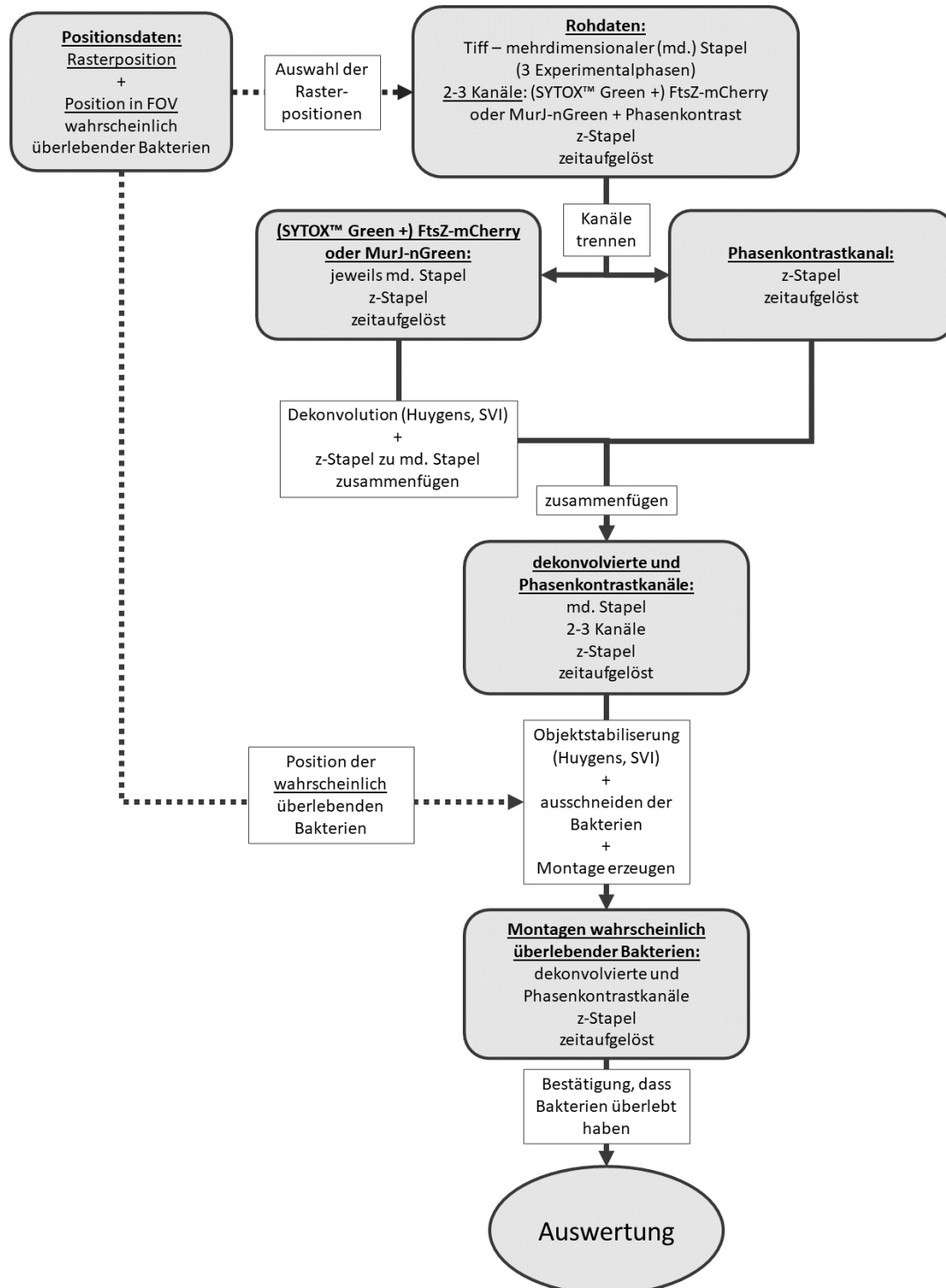


Abb. 21: Verarbeitung der Daten aus Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch. Fließdiagramm zu der Verarbeitung der Daten zur Erschließung von Informationen zum Teilungszeitraum persistenter Bakterien.

Unmittelbar nach Abschluss des Experiments erfolgte eine Sichtung der Daten, um die Position individueller Bakterien, die dem Phänotyp der persistenten Bakterien entsprachen, festzuhalten. Es wurde darauf geachtet, sich nach dem Auswaschen des Antibiotikums, also circa 1 Stunde nach dem Wechsel zu Nährmedium ohne Antibiotikum, wieder teilende Bakterien ausfindig zu machen. Die Position in dem Raster der Form 00X-00Y sowie die Position innerhalb des Bildfeldes wurden dokumentiert. X und Y bezeichnen in diesem Kontext die x- und y-Position innerhalb des Rasters. Hierbei wurde bereits darauf geachtet, dass Bakterien, die erst während des Experiments aufgetaucht sind, ausgeschlossen werden. Im Anschluss wurden die an derselben Rasterposition befindlichen mehrdimensionalen Stapel, an denen sich überlebende Bakterien befanden, zu einem mehrdimensionalen Stapel zusammengefügt. Dieser mehrdimensionale Stapel sollte die überlebenden Bakterien über die gesamte Versuchszeit zeigen. Dieser Prozess wurde über ein ImageJ-Makro ermöglicht. Daraufhin wurden die Kanäle getrennt und der FtsZ-mCherry- oder MurJ-nGreen-Kanal dekonvolviert. Der Prozess der Dekonvolution mithilfe von „Huygens Professional“ (Scientific Volume Imaging B.V.) ist in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

Nach der Dekonvolution mussten die Stapel wieder zu zeitaufgelösten mehrdimensionalen Stapeln und anschließend mit dem PC-Kanal verbunden werden. Der entstandene Stapel wurde mittels der Objektstabilisierung (Huygens Professional, Scientific Volume Imaging B.V.) räumlich über die Zeit stabilisiert. In einigen Fällen war eine Translation eines Teils der Stapel erforderlich, um eine Stabilisierung des Stapels mittels „Huygens Professional“ zu ermöglichen.

Die erhaltenen Stapel wurden mithilfe eines ImageJ-Makros zusammengefügt und anschließend wurde ein Bildbereich von zwischen 100 x 100 Pixeln und 500 x 500 Pixeln über das gesamte Experiment ausgeschnitten. Die so vorbereiteten mehrdimensionalen Stapel wurden schließlich mithilfe eines ImageJ-Makros zu einer Montage der in Abb. 22 dargestellten Form für die folgende Auswertung kompiliert.

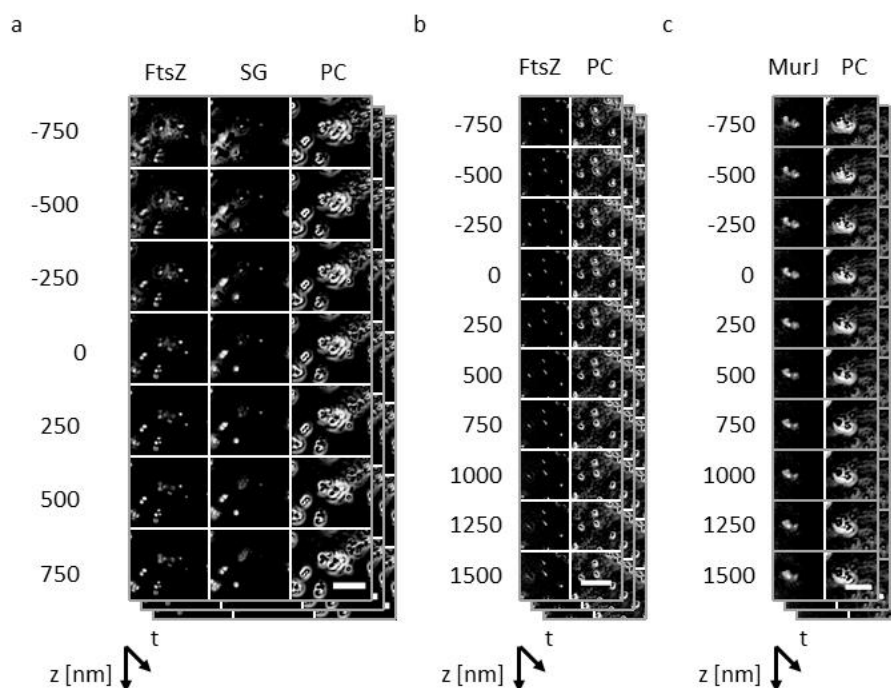


Abb. 22: Beispielmontagen, welche für die Auswertung des Teilungszeitraums persistenter Bakterien angefertigt wurden. (a) FtsZ-mCherry (FtsZ) und SYTOX™ Green (SG). Skala 10 μ m. **(b)** FtsZ-mCherry. Skala 20 μ m. **(c)** MurJ-nGreen (MurJ). Skala 10 μ m. Anordnung in dem mehrdimensionalen Stapel: Kanäle - horizontal; z-Ebene - vertikal; Zeit - Stapel.

Ermittlung des Teilungszeitraums nicht überlebender Bakterien

Die Selektion nicht überlebenden Bakterien erfolgte durch die Generierung zufälliger Zahlen für die X- und Y-Positionen des Rasters. In diesen Ausschnitten wurden nicht überlebende Bakterien ausgewählt, welche über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet werden können. Die nachfolgende Datenverarbeitung erfolgte gemäß dem zuvor beschriebenen Vorgehen für persistente Bakterien.

Ermittlung der Gesamtzahl der im Bildfeld befindlichen Bakterien

Für die Ermittlung der Gesamtzahl der Bakterien wurde ein Verfahren angewandt, bei dem alle Rasterpositionen verarbeitet wurden. Ein Fließdiagramm über den Prozess wurde in Abb. 23 dargestellt.

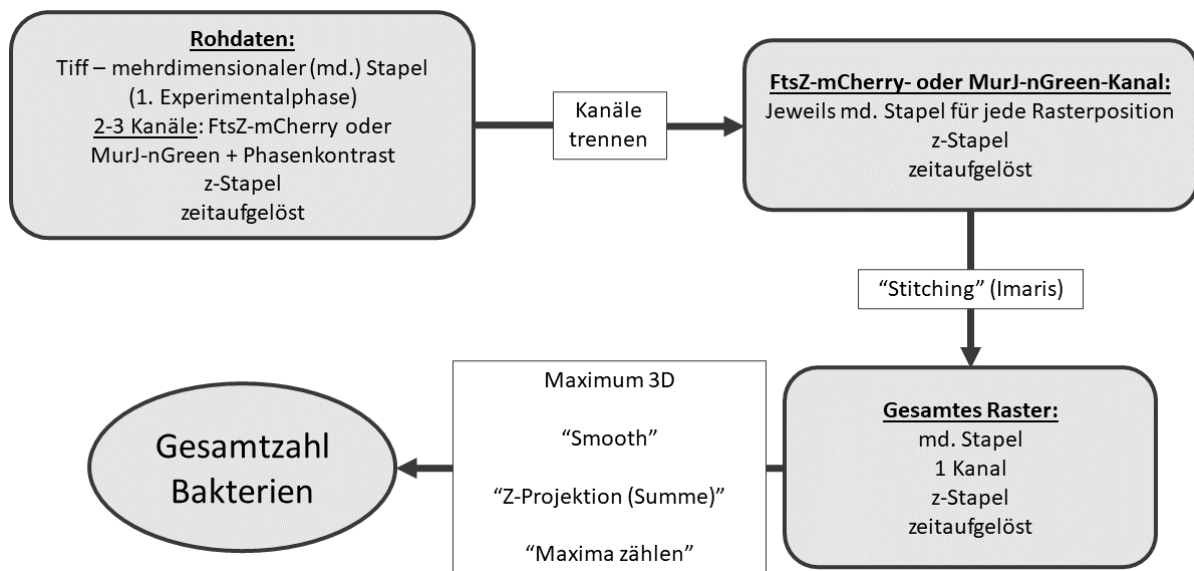


Abb. 23: Fließdiagramm zur Ermittlung der im Bildfeld befindlichen Bakterien. Fließdiagramm zur Verarbeitung der Daten aus Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch zur Ermittlung der Gesamtzahl der im Bildfeld befindlichen Bakterien.

An allen Rasterpositionen wurden für die weitere Verarbeitung mittels ImageJ-Macro die mehrdimensionalen Stapel auf die ersten 6 gemessenen Zeitpunkte reduziert. Anschließend wurden die Stapel der einzelnen Positionen mithilfe des Programms „Imaris Stitcher“ (Imaris) zu Gesamtübersichten über das gesamte Raster zusammengefügt. Daraufhin wurde ein „Maximum 3D“-Filter (ImageJ) gefolgt von der „Smooth“-Funktion (ImageJ) auf die Bilderstapel angewandt. Zuletzt wurde eine Summenprojektion über die z-Stapel erzeugt und die „Maxima zählen“-Funktion von ImageJ genutzt, um die Gesamtzahl zu jedem Zeitpunkt festzustellen. Ein Ausschnitt einer dieser Stapel wurde als Beispiel in Abb. 24 mit und ohne lokalisierte Maxima abgebildet.

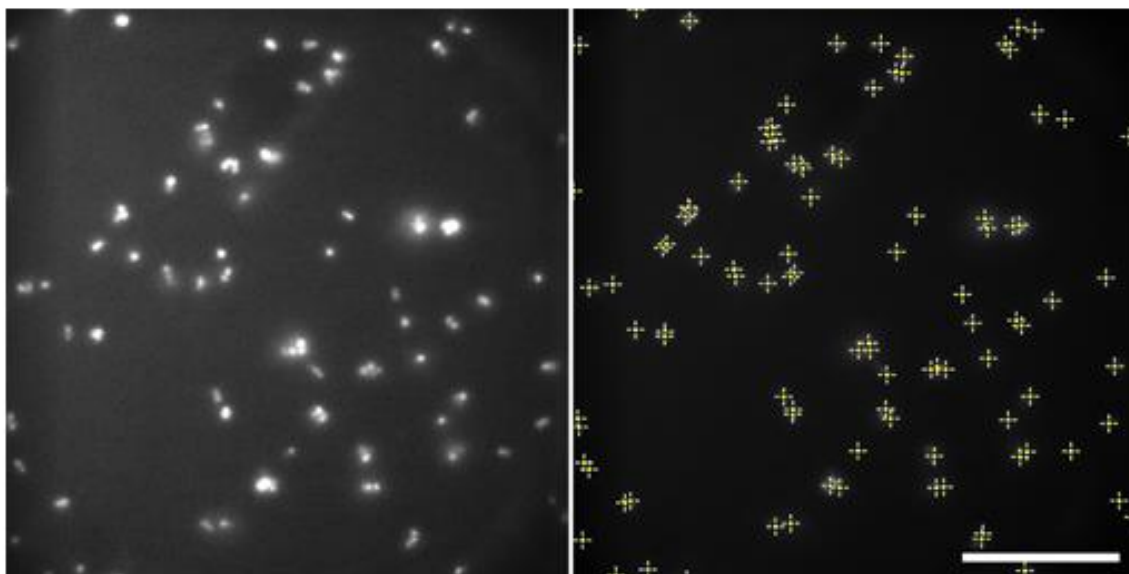


Abb. 24: Beispiel für die Lokalisierung der Bakterien anhand des FtsZ-mCherry- oder MurJ-nGreen-Signals. Beispiel eines Ausschnitts der Gesamtübersicht über das Raster eines Mikrogramms von FtsZ-mCherry vor Verwendung der Filter (links) und mit lokalisierten Maxima (rechts). Der Ausschnitt zeigt eine Summenprojektion über den z-Stapel an der ausgewählten Position. Der Kontrast wurde deutlich erhöht, um die Wahrnehmung von Zellen mit schwächerem Signal zu verbessern. Skala 25 μm .

Experimentelle Bestimmung der Punktspeizfunktion

Das Programm „Huygens Professional“ (Scientific Volume Imaging B.V.) dient der Dekonvolution und Nachbearbeitung von Rohdaten aus fluoreszenzmikroskopischen Experimenten. Gemäß Kapitel 3.1.2 ist eine PSF erforderlich, um eine Dekonvolution durchzuführen. Diese können gemäß unterschiedlichen physikalischen Modellen simuliert oder gemessen und berechnet werden.

Für die Bestimmung der in dieser Arbeit verwendeten experimentellen PSFs wurden fluoreszierende Nanopartikel mit einem Durchmesser von 100 nm eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.1). Die Daten wurden mit dem Programm verarbeitet, woraus jeweils eine destillierte PSF für die Emissionswellenlängen von 430 nm, 515 nm, 580 nm und 680 nm resultierte.

Dekonvolution

Um einen höheren Kontrast in den zeitaufgelösten Experimenten zu erhalten, wurden die Rohdaten der fluoreszenten Kanäle der Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch mithilfe des Programms „Huygens Professional“ dekonvolviert. Zur Dekonvolution wurden experimentelle PSFs verwendet.

Es wurde jeweils eine Vorlage zur Dekonvolution mittels „Huygens Professional“ bei Anregung mit 488 nm und 561 nm vorbereitet. Die Dekonvolution der ausgewählten Positionen wurde über die „Workflow Processor“-Funktion des Programms durchgeführt und jeweils eine Vorlage verwendet. Die Vorlagen sahen eine Dekonvolution mit dem klassische Maximum-Likelihood-Schätzung- (engl. *classic maximum likelihood*

estimation, CMLE) Algorithmus über maximal 96 Iterationen vor. Der Prozess wurde vorzeitig abgebrochen, falls ein Qualitätsunterschied nach Csiszár's I-Divergenz¹⁷⁷ von 0.2 erreicht wurde.

Objektstabilisierung

Zur Erleichterung der Auswertung wurde die Objektstabilisierung von „Huygens Professional“ verwendet. Zu diesem Zweck wurden die vollständigen und dekonvolvierten Stapel eines Experiments in einer Position des Rasters verwendet und eine Stabilisierung mittels Kreuzkorrelation in allen Kanälen über die Zeit durchgeführt. Die Subpixel-Interpolation nach Lanczos (Lanczos Interpolation) wurde verwendet. Gegebenenfalls war es nötig Ausreißer in dem Prozess der Stabilisierung oder im Falle extremer Verschiebungen, ausgelöst durch Berühren der Probenbühne, von Hand in Fiji über eine Translation der betroffenen Zeitpunkte zu korrigieren.

Ermittlung des Verhaltens persistenter und nicht überlebender Bakterien

Um der Hypothese nachzugehen, ob die Teilungsphase Einfluss auf den persistenten Charakter der Bakterien nimmt, wurde deren Z-Ringgröße und deren Teilungszeiträume untersucht. Die Auswertung basiert auf der zuvor beschriebenen Verarbeitung der Daten aus Kapitel 4.4.2.

Der einem Bakterium zugehörige Stapel wurde geöffnet und bei persistenten Bakterien zuerst das Bakterium identifiziert, welches sich nach dem Wechsel zu Nährmedium ohne Antibiotikum mehrfach teilt. Die Auswertung nicht-überlebender Bakterien erfolgte analog, wobei nicht festgestellt werden musste, welche die überlebende Zelle ist.

Ermittlung der Z-Ringgröße

Die Ermittlung der Z-Ringgröße wurde in analoger Weise zu Kapitel 4.4.1 Abschnitt 2 (Bestimmung der Z-Ringgröße) durchgeführt. Die Auswertung unterscheidet sich von der zuvor beschriebenen lediglich darin, dass keine Klassifizierung durchgeführt wurde und alle messbaren Ringgrößen der persistenten Zellen in die Auswertung einfließen.

Ermittlung des Teilungszeitraums

Der Teilungszeitraum der persistenten Zellen wurde charakterisiert, indem die Zeitpunkte ermittelt wurden, zwischen welchen die erste Trennung der Tochterzellen voneinander stattfindet, nachdem das Antibiotikum entfernt wurde. Anschließend wurde bestätigt, dass diese sich daraufhin weiter teilen. Daraufhin wurde der Zeitraum ermittelt, in welchem die Bakterien sich ein letztes Mal teilen, bevor das Antibiotikum herausgewaschen wurde. Wieder wurden jeweils zwei Zeitpunkte, zwischen denen sich die Tochterzellen voneinander trennen, notiert. Für nicht überlebende Bakterien wurde lediglich der Zeitraum der letzten Teilung, die beobachtet wurde, ermittelt.

Korrektur des Teilungszeitraums aufgrund von Messverzögerungen

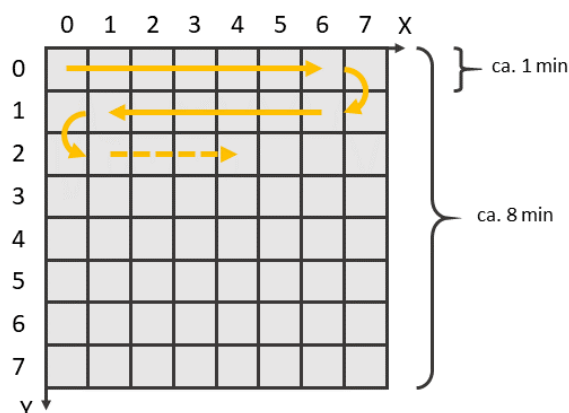


Abb. 25: Messablauf der Rasteranordnung. Schematisches Beispiel des Aufnahmerasters mit den Dimensionen 8×8 ($X \times Y$). Die gelben Pfeile deuten die Reihenfolge an, mit der die Positionen abgebildet werden. Die Messdauer des gesamten Rasters beträgt ca. 8 Minuten, die Messdauer einer Zeile in X-Richtung ca. 1 Minute.

Da die Messungen mit kontinuierlichem Volumenaustausch üblicherweise in Rastern von 8×8 Positionen erfolgten, kam es während der Messung eines „Zeitpunktes“ zu Verzögerungen. Die Messung eines gesamten Rasters dauerte etwa 8 Minuten und wurde in Zeilen alternierend in beide Richtungen durchgeführt (Abb. 25). Da das gesamte Raster in 8 Minuten abgebildet wurde, konnte angenommen werden, dass eine Zeile des Rasters in einer Minute abgebildet wurde. Da in dem ersten Messintervall (siehe Kapitel 4.3.4) das Abbildungsintervall 10 Minuten betrug, wurde entschieden diese Verzögerung mit in die Auswertung einfließen zu lassen.

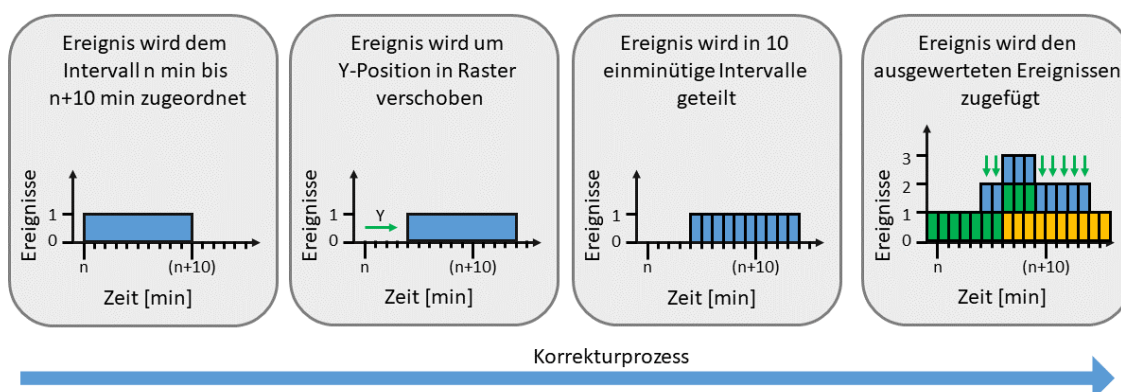


Abb. 26: Schematischer Ablauf des Korrekturalgorithmus. Ablauf des Korrekturprozesses anhand eines Teilungsereignisses nach dem Zeitpunkt n min. Die blaue Säule deutet das zu korrigierende Ereignis an, während die orangenen bzw. grünen Säulen (rechts) bereits korrigierte Ereignisse andeuten.

Ein Teilungsereignis wurde dem Intervall von $t = n$ min bis $t = (n + 10)$ min zugeordnet. Daraufhin wurden die Messintervalle in 10 einminütige Intervalle geteilt. n wurde um die Position Y des Bakteriums im Raster verschoben, welche die Zeile im Raster repräsentiert. Anschließend erfolgte eine Unterteilung des Intervalls von $t = n + Y$ min bis $t = n + Y + 10$ min in zehn Intervalle. Den so gebildeten Intervallen wurde jeweils ein Ereignis zugeordnet und den bereits ausgewerteten Ereignissen zugefügt. Abb. 26 gibt den Prozess schematisch wieder.

5. Ergebnisse

5.1. Charakterisierung und Evaluation des Versuchsaufbaus

Die Auswertung und Einordnung der Rohdaten, welche aus den beschriebenen mikroskopischen Experimenten gewonnen werden, sehen eine optische Charakterisierung mittels der PSF vor. Darüber hinaus ist es erforderlich die Inkubationseinsätze hinsichtlich ihrer Temperaturstabilität und ihres Volumenaustauschs zu testen, um die Rahmenbedingungen und gegebenenfalls die Voraussetzungen für die Experimente zu gewährleisten.

5.1.1. Die Punktspreizfunktion des Mikroskops

Die PSF des Mikroskops wurde mit Hilfe von Nanopartikeln gemessen und berechnet. Abb. 27 zeigt eine solche berechnete PSF. Entlang der x-, y- und z-Achsen wurden Intensitätsprofile erstellt, an die Gaußfunktionen angepasst wurden.

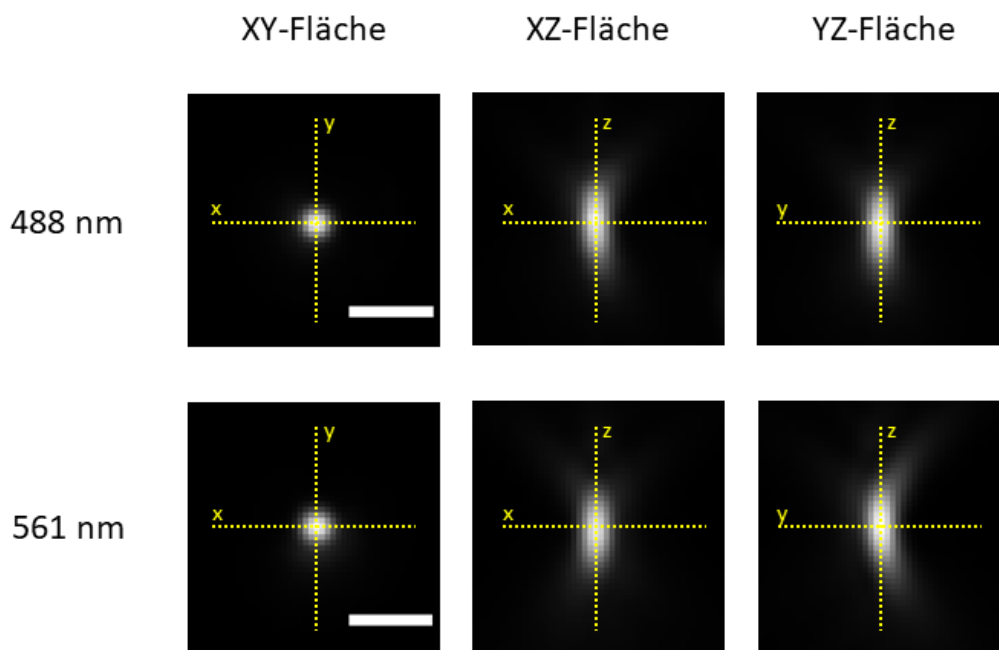


Abb. 27: Experimentelle PSFs des verwendeten Mikroskops. Experimentelle PSF für 488 nm/515 nm und 561 nm/580 nm (Anregung/Emission) in planarer Darstellung der zentralen Ebene in YX-, XZ und YZ-Richtung. Entlang der gelb markierten Linien wurden Intensitätsprofile erzeugt. Skala 5 μm .

Die angepassten Gaußfunktionen folgen der Gleichung

$$I_{\text{Rel}} = I_0 + I_{\text{Max}} e^{-0,5((x-\mu)/w)^2} \quad (1)$$

Die Größen in Gleichung (1) können folgendermaßen interpretiert werden: I_{Rel} ist die relative Intensität, I_0 ist die Anfangsintensität, I_{Max} ist die maximale Intensität, x die Position auf dem Profil entlang der Achse,

μ der Erwartungs- oder Mittelwert und w der mittleren Abstand der Intensität vom Mittelwert w . Der Mittelwert μ der Näherungen wurde auf 0 nm und die maximale Intensität I_{Max} aufgrund der Normierung der Werte auf 1 festgelegt. Mit dem Mittleren Abstand w lässt sich nach

$$FWHM = 2\sqrt{\ln 4} w \quad (2)$$

die Halbwertsbreite ($FWHM$) bestimmen. Die Halbwertsbreite der PSF kann Aufschluss über das Auflösungsvermögen geben. Die ermittelten Halbwertsbreiten entlang der x-, y-, und z-Achse für die gemessenen PSFs sind in **Tabelle 5-1** aufgeführt.

Tabelle 5-1 – Näherungsparameter der Gaußfunktionen (1), welche an die jeweiligen x-, y- und z-Profile der PSFs für 488 nm/515 nm und 561 nm/580 nm angepasst wurden. Festgelegte Parameter: $\mu = 0 \text{ nm}$; $I_{Max} = 1$.				
$\lambda \text{ [nm]}$	Achse	I_0	$w \text{ [}\mu\text{m]}$	$FWHM \text{ [}\mu\text{m]}$
488	x	0,005	0,122	0,287
	y	0,004	0,121	0,286
	z	0,019	0,311	0,764
561	x	0,004	0,130	0,306
	y	0,007	0,130	0,308
	z	0,027	0,332	0,783

5.1.2. Auflösungsgrenzen

Neben der PSF können die Auflösungsgrenzen auch auf direkterem Wege ermittelt werden, zumal die gemessenen Daten dekonvolviert wurden, was auch einen Einfluss auf das Auflösungsvermögen haben kann. Da in den Experimenten mit FtsZ-mCherry-Expression häufig die Größe der Z-Ringe gemessen wurde, kann das Signal in diesen Experimenten auch zur Beurteilung des Auflösungsvermögens in diesen Experimenten herangezogen werden. Außerdem ist die Dicke der FtsZ-Filamentbündel mit $ca. 110 \pm 25 \text{ nm}^{178}$ kleiner als das Auflösungsvermögen des Mikroskops, was diesen Ansatz begünstigt.

Für die Messung wurden jeweils zehn Bakterien aus drei unabhängigen Replikaten ausgewertet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte entsprechend der in Kapitel 4.4.1 und 4.4.2 beschriebenen Dekonvolutionsverfahren. Ein Beispiel für die Auswirkung der Dekonvolution auf das Signal ist in Abb. 28 dargestellt. Die ermittelten Halbwertsbreiten sind in **Tabelle 5-2** zusammengefasst. Für die nicht dekonvolvierten Signale wurde eine mittlere Halbwertsbreite von $533 \pm 91 \text{ nm}$ bestimmt. Nach Anwendung des R-L-Algorithmus reduzierte sich die Halbwertsbreite auf $384 \pm 55 \text{ nm}$. Dies entspricht einer durchschnittlichen Verringerung um $159 \pm 53 \text{ nm}$, bzw. etwa 28 %. Gleichzeitig erhöhte sich die maximale Signalintensität im Mittel um $69 \pm 19 \%$ im Vergleich zur ursprünglichen Intensität.

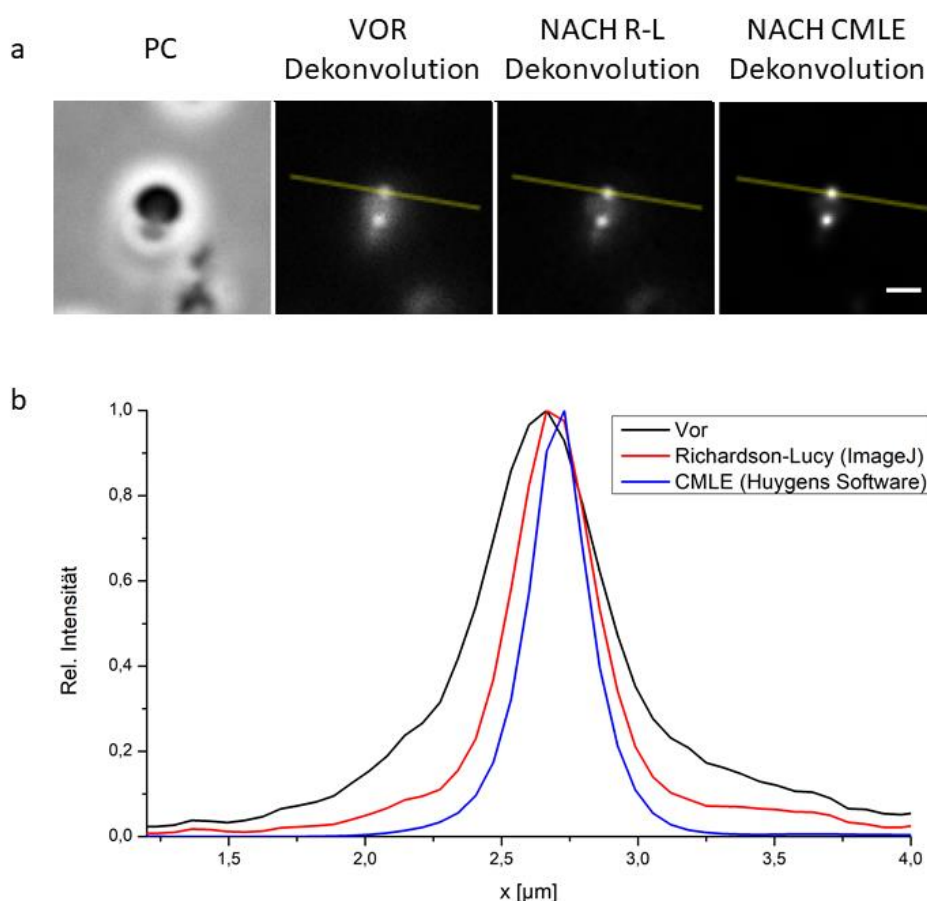


Abb. 28: Beispiel der Veränderung des FtsZ-mCherry-Signals durch Dekonvolution. (a) Beispiel eines FtsZ-mCherry-exprimierenden *S. aureus* im PC, vor und nach Dekonvolution mit dem R-L- und dem CMLE-Algorithmus (Skala; 1 μm). **(b)** entlang der gelben Linien in (a) gemessene relative Intensitätsprofile vor und nach der Dekonvolution.

Unter Anwendung des CMLE-Algorithmus wurde eine noch stärkere Reduktion der Halbwertsbreite auf 332 ± 49 nm erreicht, was einer durchschnittlichen Abnahme von 201 ± 78 nm, bzw. 38 % entspricht. Auffällig ist, dass sämtliche bestimmten Halbwertsbreiten trotz Dekonvolution größer ausfielen als die in Kapitel 5.1.1 ermittelte laterale Halbwertsbreite der experimentellen PSF.

Zusätzlich wurde der mittlere Kontrast nach Michelson¹⁷⁹ bestimmt und in **Tabelle 5-2** aufgetragen. Dabei wird deutlich, dass der Kontrast mit der Dekonvolution deutlich ansteigt.

Tabelle 5-2 – In Rohdaten und dekonvolvierten Daten gemessene Halbwertsbreiten und Kontrast nach Michaelson des FtsZ-mCherry-Signals.			
Methode	<i>FWHM</i> [nm]	Verringerung [nm]	Contrast
Rohdaten	533 ± 91	-	$0,55 \pm 0,17$
Richardson-Lucy (ImageJ)	384 ± 55	159 ± 53	$0,72 \pm 0,12$
CMLE (Huygens Software)	332 ± 49	201 ± 78	$0,99 \pm 0,01$

5.1.3. Intensitätsverteilung und gleichmäßige Beleuchtungsintensität

Der Anregungslaserstrahl wurde zusätzlich vierfach aufgeweitet und die Ränder abgeblendet, um eine homogenere Beleuchtung der Probe zu erreichen. Zur Untersuchung der resultierenden Intensitätsverteilung wurde eine fluoreszierende Lösung unter ansonsten identischen Bedingungen jeweils mit einem 15-fach sowie einem 60-fach aufgeweiteten Strahl abgebildet (repräsentatives Beispiel siehe Abb. 29,a).

In jeweils fünf Aufnahmen wurde ein horizontales Intensitätsprofil erstellt, wobei die Intensität an den in Abb. 29,b gelb markierten Stellen ausgewertet wurde. Zusätzlich wurde innerhalb der Profile die Breite bestimmt, bei der eine Intensität ≥ 80 % der maximalen Intensität vorlag, um näherungsweise den Durchmesser des homogen beleuchteten Bereichs zu ermitteln.

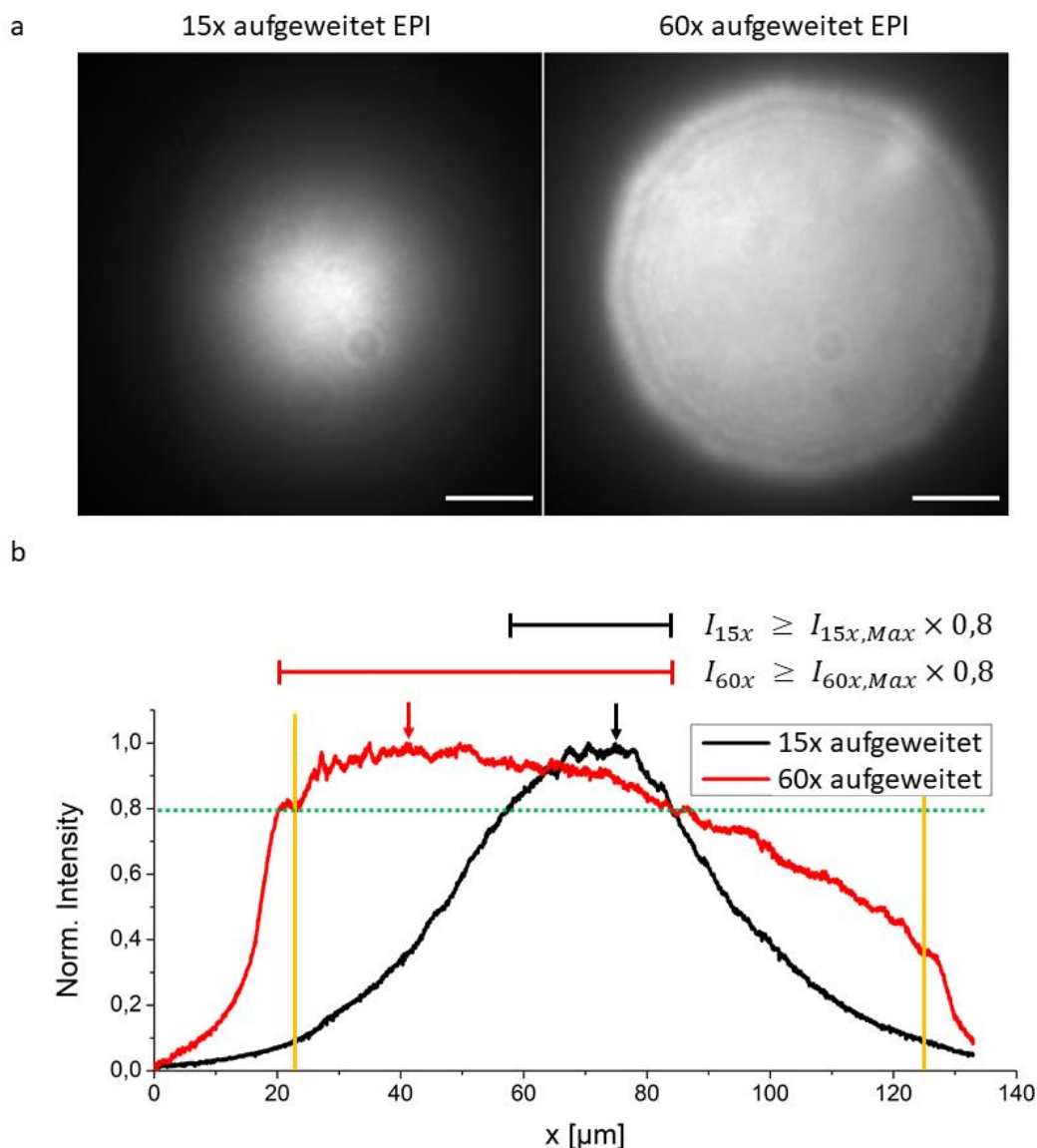


Abb. 29: Veränderung der Intensitätsverteilung der Beleuchtung durch Vergrößerung des Laserstrahlendurchmessers und Abblenden der Ränder. (a) Repräsentative Intensitätsverteilung einer mit 15-fach und 60-fach aufgeweitetem Laserstrahl angeregten FITC-Dextran Lösung. Jeweils Z-Projektionen (Durchschnitt) aus 5 Aufnahmen. Skala 25 μm . **(b)** Jeweils auf die Maxima normierte horizontale Intensitätsprofile aus den repräsentativen Aufnahmen in (a). Der jeweils darüber befindliche, rote oder schwarze Balken deuten die Breite der Intensitätsprofile an, die jeweils über 80 % der Intensitätsmaxima liegen. Gelbe Linien, Positionen der Intensitätsmessungen; grüne gepunktete Linie, 80 % Grenze; roter und schwarzer Pfeil, Position des Intensitätsmaximums des Profils mit 60-facher und 15-facher Vergrößerung des Strahlendurchmessers.

Durch die zusätzliche Aufweitung des Strahls erhöhte sich dieser Durchmesser mit einer Intensität $\geq 80\%$ von $28 \pm 2 \mu\text{m}$ auf $75 \pm 4 \mu\text{m}$. Dadurch vergrößerte sich die nutzbare, gleichmäßig beleuchtete Fläche im abgebildeten Bereich um etwa das sechsfache.

Intensitätsverteilung unter HILO-Beleuchtung

Darüber hinaus wurden Intensitätsprofile der jeweiligen HILO-Beleuchtungen mit einer 15-fachen und 60-fachen Aufweitung aufgenommen und sind in Abb. 30 dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass das Intensitätsprofil im Falle der 60-fachen Aufweitung bei einer HILO-Beleuchtung in Ausbreitungsrichtung des Lasers (hier von rechts nach links) nahezu linear ansteigt (Abb. 30,a). Bei einer 15-fachen Aufweitung ist lediglich ein Anstieg der Intensität zur linken Seite hin ersichtlich (Abb. 30,b).

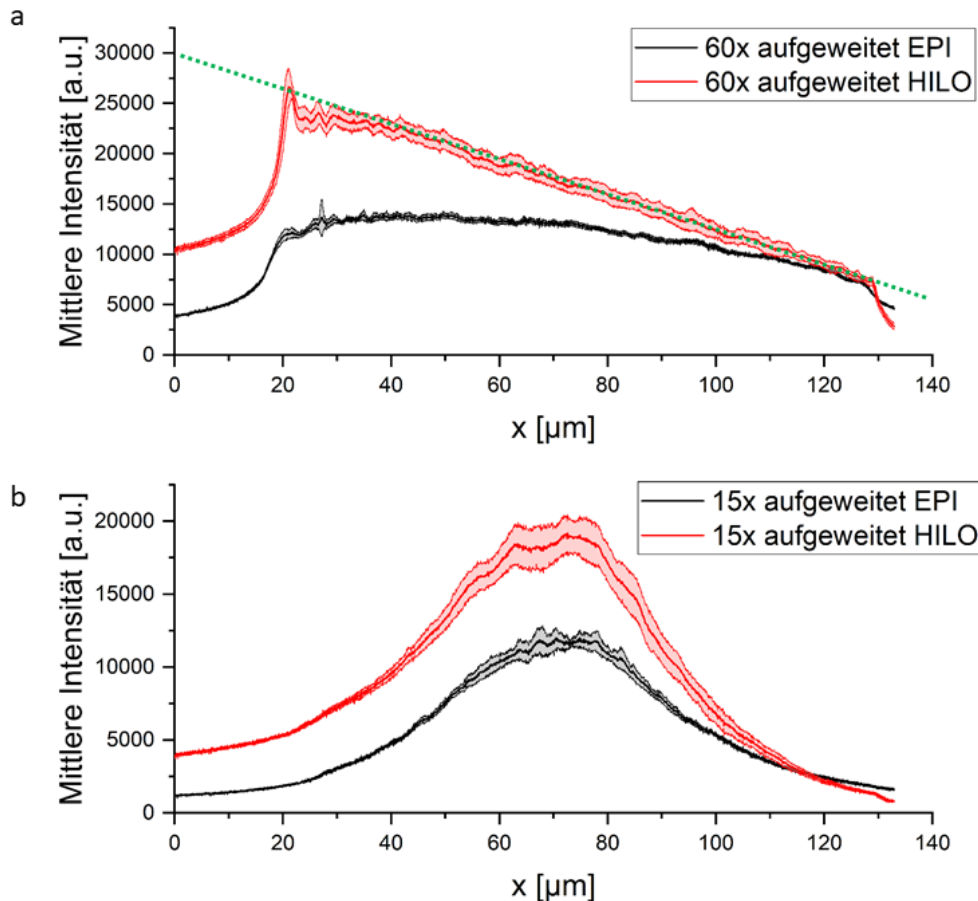


Abb. 30: Veränderung des Intensitätsprofils in der Fokusebene bei Wechsel von EPI- zu HILO-Beleuchtung. (a) Mittlere horizontale Intensitätsprofile von jeweils 5 Abbildungen, aufgenommen mit 60-fach aufgeweitetem Laserstrahl in EPI- und HILO-Konfiguration. Die rote und die schwarze Fläche deuten $\pm$ SD an. Die grün gepunktete Linie verdeutlicht den linearen Charakter des Anstiegs der Intensität von rechts nach links. (b) Mittlere horizontale Intensitätsprofile von jeweils 5 Abbildungen, aufgenommen mit 15-fach aufgeweitetem Laserstrahl in EPI- und HILO-Konfiguration. Die rote und die schwarze Fläche deuten $\pm$ SD an.

5.1.4. HILO-Beleuchtung im GFP-Kanal

Um den Effekt der HILO-Beleuchtung deutlich zu machen, wurden an einer Stelle PBP2-GFP-exprimierende Bakterien mit EPI- und HILO-Beleuchtung in MH unter sonst den gleichen Parametern abgebildet (siehe Abb. 31). Die Beleuchtungsparameter entsprechen den Parametern, die in Experimenten mit PBP2-GFP-exprimierenden *S. aureus* (siehe Kapitel 4.3.3) verwendet wurden.

Es wird deutlich, dass die mit EPI-Beleuchtung abgebildeten Bakterien ein deutlich geringeres Signal aufweisen (Abb. 31, e und f), während in dem abgebildeten Bereich ein großer, gleichmäßig beleuchteter Hintergrund zu sehen ist (siehe Abb. 31, a und c). Das GFP-Signal ist deutlich größer, wenn die Bakterien mit der HILO-Beleuchtung abgebildet werden (Abb. 31, g und h). Das ist zu erwarten, da aufgrund der Beleuchtungsgeometrie die Leistungsdichte steigt. Trotz der höheren Leistungsdichte ist aber das Hintergrundsignal mit HILO-Beleuchtung (siehe Abb. 31, d) zur linken Seite maximal 20 % größer als das Hintergrundsignal in Experimenten mit EPI-Beleuchtung (siehe Abb. 31, c). Das GFP-Signal ist im zentralen Bereich mit HILO-Beleuchtung allerdings auf ungefähr das Dreifache angestiegen. Damit steigt der Kontrast an dieser Stelle auch deutlich an. Der Intensitätsanstieg im Hintergrundsignal mit HILO-Beleuchtung im GFP-Kanal führt im Gegensatz zur EPI-Beleuchtung zu einem ungleichmäßig verteilten Kontrast.

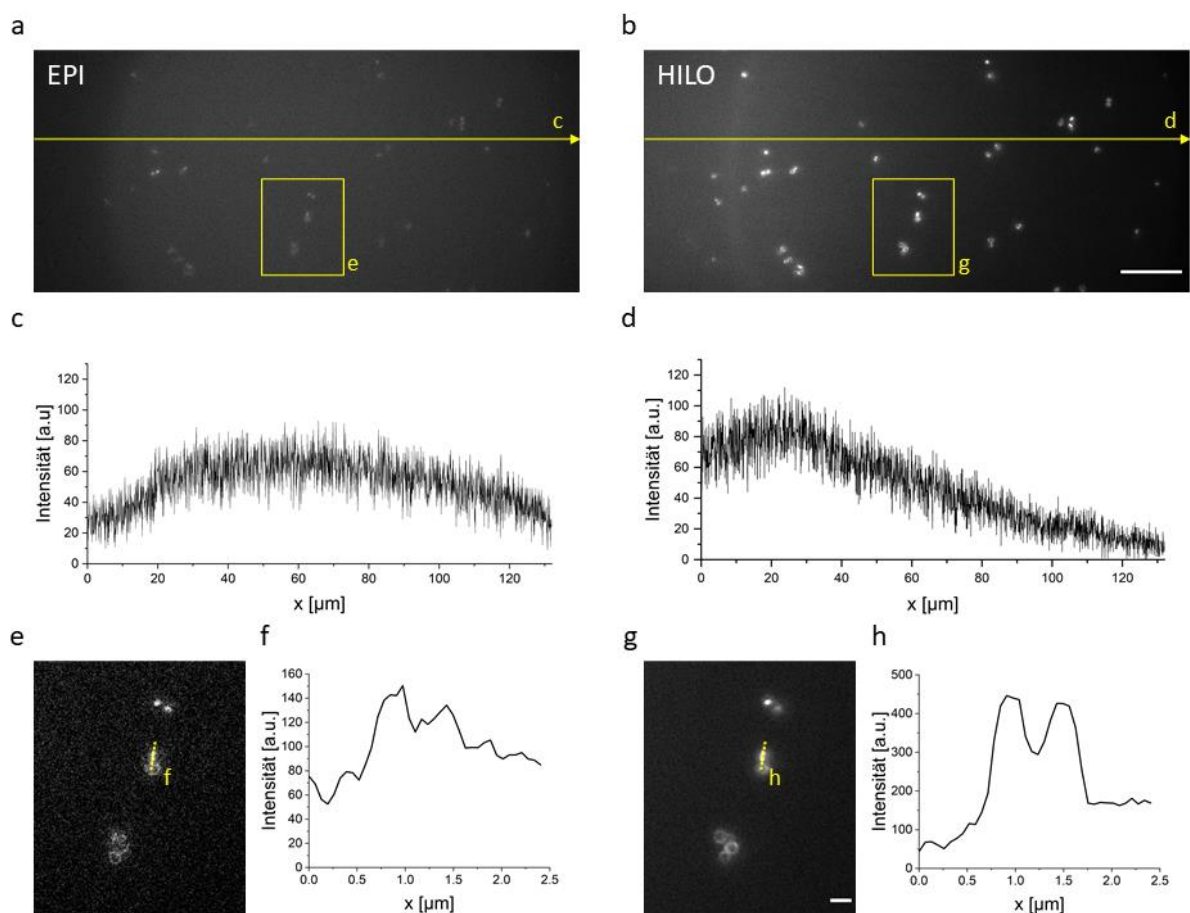


Abb. 31: Effekt der HILO-Beleuchtung auf die Signalqualität und den Kontrast im GFP-Kanal. Übersicht über die gesamte abgebildete Breite mit (a) EPI- und (b) HILO-Beleuchtung. Abgebildet wurden PBP2-GFP-exprimierende *S. aureus*-Zellen. Das eingestellte Offset der Kamera wurde entfernt. Der Kontrast wurde für beide Abbildungen gleich eingestellt. Die gelben Pfeile deuten Richtung und Position der in (c) und (d) abgebildeten Intensitätsprofile an. Die gelben Kästen deuten die Positionen in (e) und (f) an. Skala 15 μm. (c) Intensitätsprofil in (a). (d) Intensitätsprofil in (b). (e) Im Kontrast angepasster Ausschnitt aus (a). Die gelbe, gepunktete Linie deutet das gemessene Intensitätsprofil in (f) an. (f) Intensitätsprofil über das PBP2-GFP-Signal in (e). Gemessen über eine Breite von 3 Pixeln. (g) Im Kontrast angepasster Ausschnitt aus (b). Die gelbe, gepunktete Linie deutet das gemessene Intensitätsprofil in (h) an. Skala 2 μm. (h) Intensitätsprofil über das PBP2-GFP-Signal in (g). Gemessen über eine Breite von 3 Pixeln.

5.1.5. Lösungsaustausch

Um einen vollständigen Lösungsaustausch in beiden Typen der Inkubationseinsätze zu gewährleisten, wurde eine mit Farbstoff versehene, wässrige Lösung durch die Inkubationseinsätze gepumpt. Die Einstellungen der Pumpe sind dabei den Experimenten mit Bakterien nachempfunden. Zudem lässt sich auf diese Weise das Verhalten einer wässrigen Lösung innerhalb der gesamten Probenvolumina der Einsätze nachvollziehen.

Einfacher Volumenaustausch

Für die Experimente mit einfachem Volumenaustausch wurde die Lösung jeweils für 90 Sekunden stoßweise durch den Einsatz gepumpt. Jeweils ein Beispielhafter additiver und subtraktiver Vorgang für Experimente mit einfachem Volumenaustausch sind in Abb. 32,a dargestellt. Um den Volumenaustausch während eines Experiments mit einfachem Volumenaustausch zu illustrieren wurde ein Bereich von 1 mm x 1 mm im Zentrum des Probenvolumens ausgewählt und die Grauwerte gemessen. In dem gewählten Bereich sollten die fluoreszenzmikroskopischen Experimente stattfinden. Das reziproke Signal in dem Bereich wurde näherungsweise als Volumenanteil definiert, das Maximum auf 1 normiert und über drei Replikate gemittelt (Abb. 32,b).

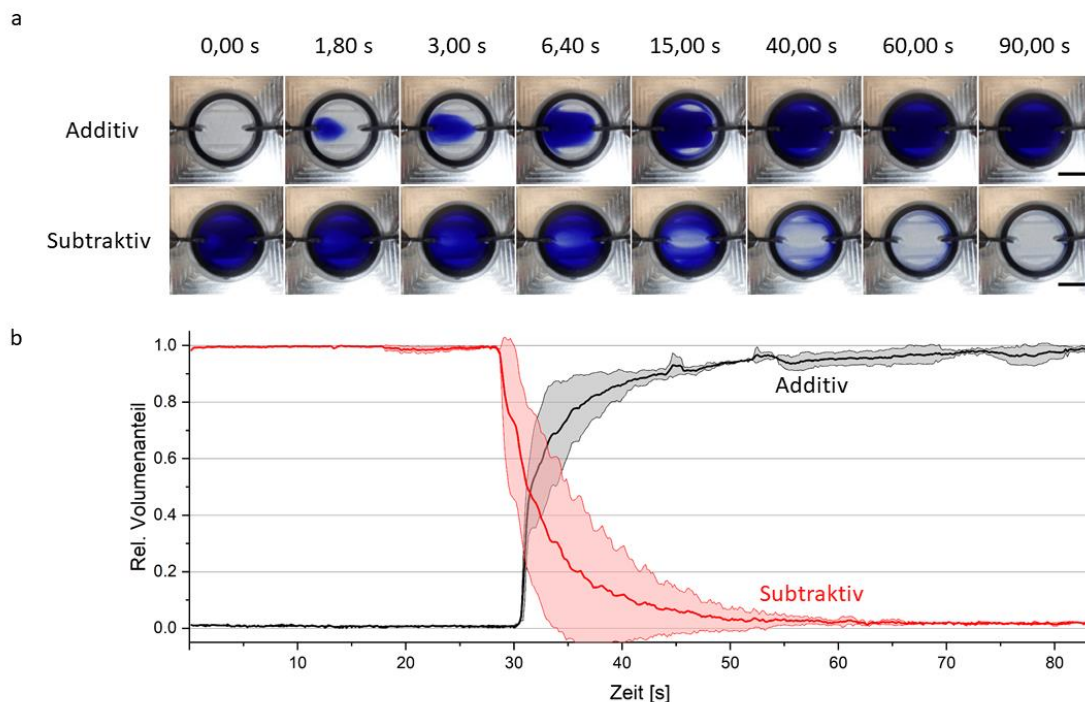


Abb. 32: Austausch einer gefärbten Lösung in dem Einsatz für einfachen Volumenaustausch. (a) Beispiele eines additiven und subtraktiven Pumpvorgangs simuliert für Experimente mit einfachem Volumenaustausch. Skala; 5 mm. **(b)** jeweils über 3 Experimente gemittelter relativer Volumenanteil der simulation eines additiven oder subtraktiven Volumenaustauschs $\pm$ SD. Für den Austausch wurden 1 mL gefärbter Lösung oder ddH₂O verwendet.

Es ist deutlich zu erkennen, dass das Verhalten des relativen Volumenanteils des additiven und subtraktiven Vorgangs horizontal gespiegelt ist. 95 % des maximal gemessenen relativen Volumenanteils sind jeweils innerhalb von $21,3 \pm 0,7$ s oder 14 ± 11 s nach Beginn des Austauschs erreicht.

Kontinuierlicher Volumenaustausch

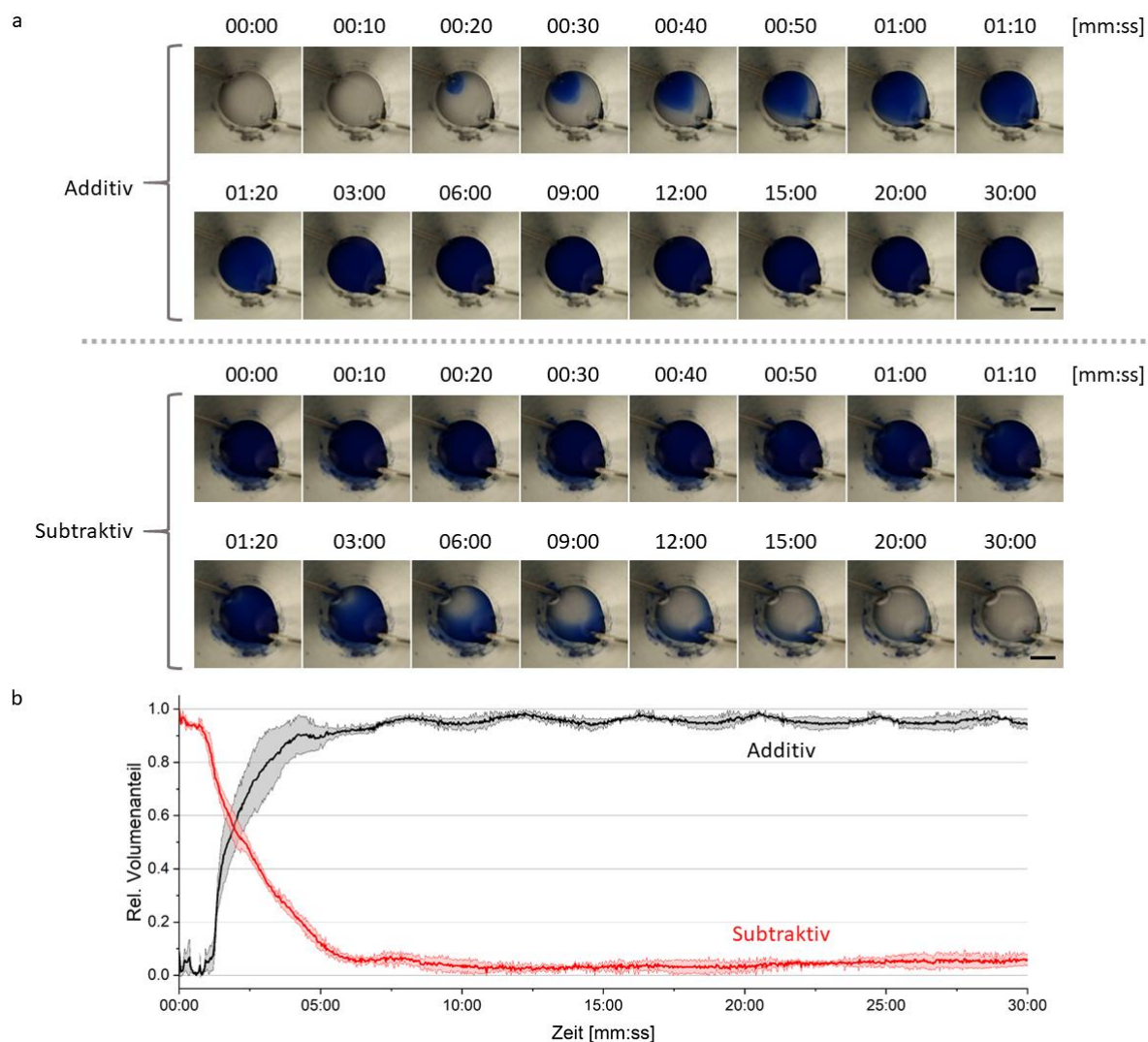


Abb. 33: Austausch einer gefärbten Lösung in dem Einsatz für kontinuierlichen Volumenaustausch. (a) Beispiele eines additiven und subtraktiven Pumpvorgangs simuliert für Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch. Skala; 5 mm. **(b)** jeweils über 3 Experimente gemittelter, relativer Volumenanteil der simulation eines additiven oder subtraktiven Volumenaustauschs $\pm$ SD.

Für die Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch wurde die Lösung jeweils für 30 Minuten stoßweise gepumpt. Jeweils ein Beispielhafter additiver und subtraktiver Vorgang für Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch sind in Abb. 33,a dargestellt. Um den Volumenaustausch während eines Experiments mit einfachem Volumenaustausch zu illustrieren, wurde ein Bereich von 1 mm x 1 mm im Zentrum des Probenvolumens ausgewählt und die Grauwerte gemessen. In dem gewählten Bereich sollten die

fluoreszenzmikroskopischen Experimente stattfinden. Das reziproke Signal des gewählten Bereichs wurde näherungsweise als Volumenanteil definiert, das Maximum auf 1 normiert und über drei Replikate gemittelt (Abb. 33,b).

Es ist zu erkennen, dass das Verhalten des relativen Volumenanteils des additiven und subtraktiven Vorgangs näherungsweise horizontal gespiegelt ist. 95 % des maximal gemessenen relativen Volumenanteils sind jeweils nach 6 ± 2 min oder 7 ± 3 min erreicht. Es ist eine periodische Schwankung zu erkennen, die vor allem in dem additiven Fall deutlich wird. In den Videos ist deutlich zu erkennen, wie die Oberfläche der Lösung pulsiert.

5.1.6. Temperaturstabilität der Inkubationseinsätze

Die Gewährleistung einer stabilen Temperatur von $T = 37 \pm 1$ °C nahe der Deckglasoberfläche im zentralen Bereich der Inkubationseinsätze ist essenziell, um die mikrobiellen Wachstumsbedingungen auf dem Mikroskop möglichst präzise an die Bedingungen in einer bakteriellen Kultur anzupassen. Darüber hinaus trägt eine konstante Temperatur maßgeblich zur Minimierung der Fokusverschiebungen während der Langzeitbeobachtung bei.

Zur Charakterisierung potenzieller Temperaturschwankungen wurden systematische Untersuchungen mit beiden Inkubationssystemen durchgeführt. Außerdem wurde der Einfluss der Objektivheizung evaluiert, indem Experimente mit und ohne Objektivheizung realisiert wurden. Zusätzlich erfolgten für den Inkubationseinsatz mit kontinuierlichem Volumenaustausch ergänzende Experimente mit und ohne Abdeckhaube.

Test der Objektivheizung mit einfachem Volumenaustausch

Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurden jeweils drei Temperaturmessungen mit und ohne Objektivheizung über einen Zeitraum von 90 Minuten durchgeführt. Die Experimente dienen dem Zweck einzuschätzen, wie stark die Temperatur ohne Objektivheizung bei Kontakt zu dem Objektiv sinkt und, ob die Temperatur sich nach Wechsel des Probenvolumens innerhalb von acht Minuten erholen kann.

Die Experimente sehen vor, dass nach einer Minute das Probenvolumen mit ddH₂O gefüllt wurde. Nach weiteren 4 Minuten wurde mit dem gegebenenfalls vorgeheizten Objektiv das Deckglas berührt. Nach weiteren 20 Minuten wurde das Volumen ausgetauscht. Das zeitliche Layout der Temperaturmessungen entsprach damit dem eines fluoreszenzmikroskopischen Experiments mit einfachem Volumenaustausch.

Die Temperaturverläufe über je drei separate Temperaturmessungen mit und ohne Objektivheizung über den gesamten Versuchszeitraum sind in Abb. 34 ,a und b dargestellt. Der zeitliche Bereich des Volumenaustauschs (graue Kästen in Abb. 34 ,a und b) ist jeweils in Abb. 34 ,c und d dargestellt, um das Verhalten der Temperatur während und nach dem Austausch besser zu verfolgen. Die Temperaturverläufe sind jeweils einzeln dargestellt, um ein konkretes Bild des Verhaltens einzelner Messungen zu bekommen und die Veränderung in einzelnen Messungen nicht durch das Erzeugen des Mittelwertes zu verfälschen. Die in Abb. 34 ,a und b eingefügten gelben Linien veranschaulichen die Temperaturgrenzen von 36 °C und 38 °C, die während der Experimente strikt eingehalten werden sollten. Es ist zu erkennen, dass die Temperaturgrenzen mit der Objektivheizung bis auf den Zeitraum des Volumenaustauschs eingehalten werden können.

Mit Objektivheizung befindet die Temperatur sich vor dem Austausch bei $36,1 \pm 0,8$ °C und sinkt im Mittel während des Wechsels um 5 ± 2 °C. Die Temperatur erholt sich innerhalb von 158 ± 10 s auf eine Temperatur von $36,3 \pm 0,2$ °C. Der gesamte Prozess von Beginn des Wechsels bis hin zur Erholung dauert 259 ± 15 s, also zwischen 4 und 5 Minuten.

Ohne Objektivheizung befindet sich die Temperatur vor dem Austausch bei $32,2 \pm 0,8$ °C und sinkt im Mittel während des Wechsels um $2,2 \pm 0,3$ °C. Die Temperatur erholt sich innerhalb von 125 ± 5 s auf eine Temperatur von $32,0 \pm 0,7$ °C. Der gesamte Prozess von Beginn des Wechsels bis hin zur Erholung dauert 218 ± 10 s, also maximal 3 Minuten und 50 Sekunden.

Die Temperatur gilt hier als erholt, falls sie sich um weniger als 0.1 °C innerhalb von 30 Sekunden verändert.

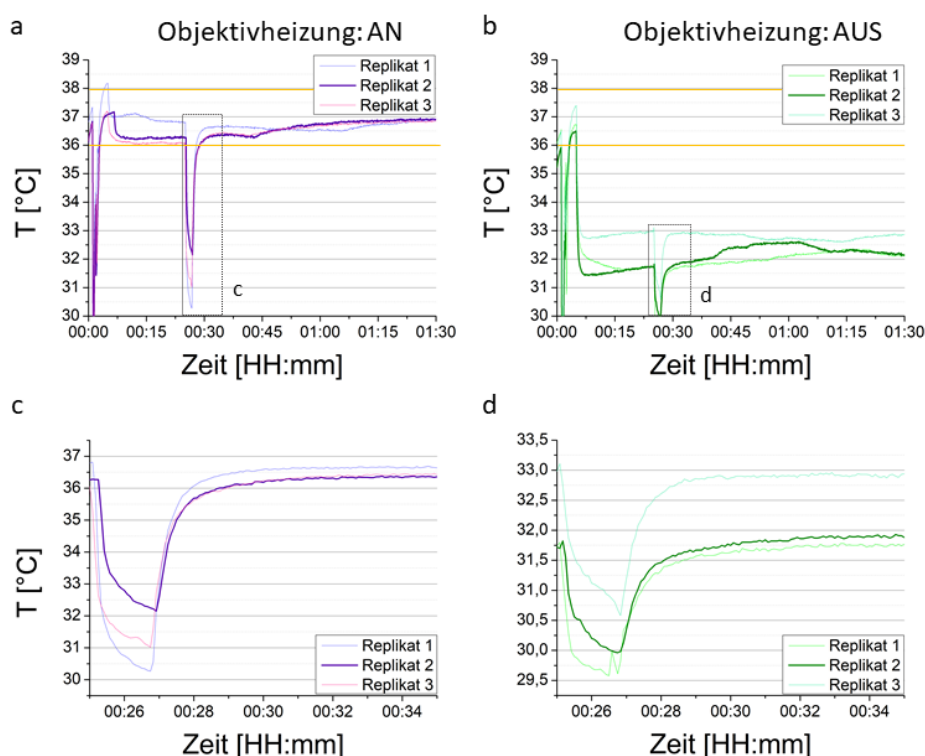


Abb. 34: Temperaturmessung in dem Inkubationseinsatz für einfachen Volumenaustausch mit und ohne Objektivheizung. (a) Drei Temperaturverläufe des Probenvolumens über einen Zeitraum von 90 Minuten mit Objektivheizung. Die gelben Linien verdeutlichen den einzuhaltenden Bereich von 37 ± 1 °C. Der graue Kasten deutet den in (c) gezeigten Ausschnitt an. **(b)** Drei Temperaturverläufe des Probenvolumens über einen Zeitraum von 90 Minuten ohne Objektivheizung. Die gelben Linien verdeutlichen den einzuhaltenden Bereich von 37 ± 1 °C. Der graue Kasten deutet den in (d) gezeigten Ausschnitt an. **(c)** Drei Temperaturverläufe des Probenvolumens über einen Zeitraum von 25 bis 35 Minuten mit Objektivheizung. Y-Achse angepasst. **(d)** Drei Temperaturverläufe des Probenvolumens über einen Zeitraum von 25 bis 35 Minuten ohne Objektivheizung. Y-Achse angepasst. Es wurde jeweils das zweite Replikat farblich hervorgehoben.

Test der Objektivheizung mit kontinuierlichem Volumenaustausch

Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurden jeweils drei Temperaturmessungen mit und ohne Objektivheizung über einen Zeitraum von 90 Minuten durchgeführt. Ziel des Experiments ist die Beobachtung des Effekts der Objektivheizung auf die Temperatur der kontinuierlich ausgetauschten Lösung ohne zusätzliche Abdeckhaube.

Die Experimente sahen vor, dass nach 2 Minuten das gegebenenfalls vorgeheizte Objektiv das Deckglas berührte. Nach weiteren 20 Minuten wurde der Kontakt des Deckglases mit dem Objektiv aufgehoben. Daraufhin wurde die Temperatur für weitere 10 Minuten gemessen und das Experiment beendet. Während des Experiments wurde kontinuierlich ddH₂O durch das Probenvolumen gepumpt.

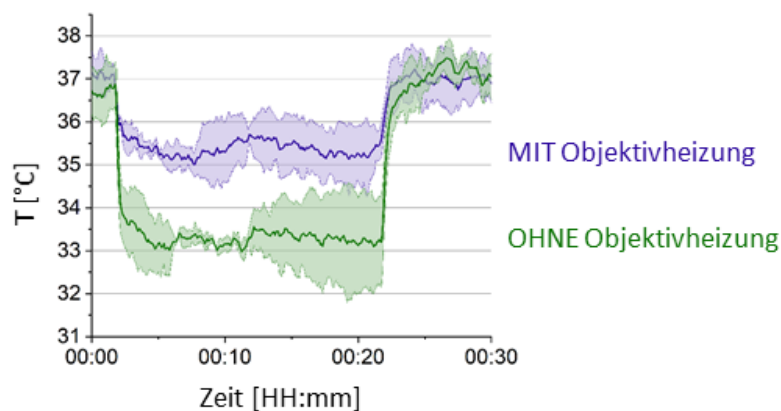


Abb. 35: Temperaturverlauf einer Zeitspanne von 30 Minuten mit und ohne eingeschaltete Objektivheizung. Die Graphen zeigen die mittlere Temperatur aus drei Replikaten $\pm$ SD.

Die Temperaturverläufe sind in Abb. 35 dargestellt. Bei noch nicht bestehendem Kontakt mit dem Objektiv werden Temperaturen von $37,1 \pm 0,4$ °C mit und $36,7 \pm 0,6$ °C ohne Objektivheizung beobachtet. Wird das Objektiv berührt sinkt die Temperatur mit Objektivheizung um $1,7 \pm 0,2$ °C auf $35,4 \pm 0,5$ °C und ohne Objektivheizung um $3,4 \pm 0,7$ °C auf $33,3 \pm 0,5$ °C. Es ist deutlich zu erkennen, dass die fehlende Objektivheizung einen geringeren Effekt im Vergleich zu dem Einsatz für einfachen Volumenaustausch hat. Zur Einschätzung dieser Experimente ist zu beachten, dass keine Abdeckhaube verwendet wurde.

Test der Abdeckhaube mit kontinuierlichem Volumenaustausch

Jeweils drei Temperaturmessungen über 10 Stunden wurden mit und ohne Abdeckhaube durchgeführt. Die Objektivheizung war durchgehend eingeschaltet. Ziel dieser Experimente war die Analyse der Auswirkungen einer Abdeckhaube auf die Temperaturstabilität eines offenen Inkubationseinsatzes.

Die Experimente sahen vor, dass nach einer Minute das vorgeheizte Objektiv das Deckglas berührt und nach weiteren 4 Minuten die Pumpe eingeschaltet wird. Es wird über den gesamten Zeitraum des Experiments ddH₂O durch das Probenvolumen gepumpt. Die Temperaturverläufe der einzelnen Experimente sind in Abb.

36 dargestellt. Die Darstellung einzelner Temperaturverläufe erlaubt eine präzisere Wiedergabe der Fluktuationen und gewährleistet, dass diese nicht durch Bildung des Mittelwerts verfälscht werden.

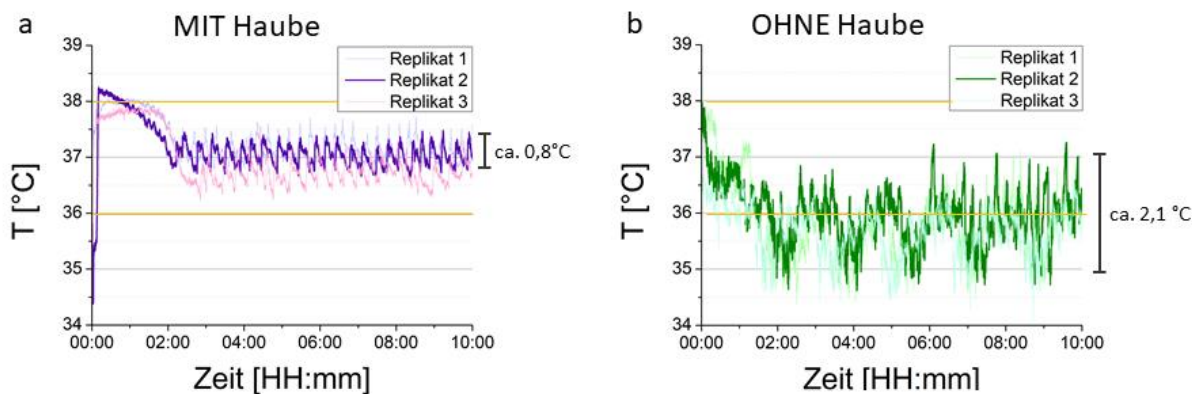


Abb. 36: Temperaturverlauf einer Zeitspanne von 10 Stunden mit und ohne Abdeckhaube bei kontinuierlichem Volumenaustausch. Temperaturverläufe dreier unabhängiger Temperaturmessungen über einen Zeitraum von 10 Stunden mit (a) und ohne (b) Abdeckhaube welche über den Mikroskopisch gespannt wurde. Die Lösung des Probenvolumens wurde kontinuierlich ausgetauscht. Die gelben Linien heben die Temperaturgrenzen von 36 $^{\circ}\text{C}$ und 38 $^{\circ}\text{C}$ hervor. Es wurde jeweils das zweite Replikat farblich hervorgehoben.

Die Temperatur im Zentrum des Deckglases weist im Verlauf der Experimente mit Abdeckhaube eine Temperatur im Bereich von 37 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ auf. Es konnte festgestellt werden, dass alle Experimente mit einer erhöhten Temperatur beginnen und innerhalb von zwei bis drei Stunden auf eine Gleichgewichtstemperatur von ca. 37 $^{\circ}\text{C}$ absinken. Die Messung ohne Haube zeigt Temperaturschwankungen mit einer längeren und einer kürzeren Periode. Die größere periodisch auftretende Temperaturschwankung ist in der Messung mit Haube deutlich abgeschwächt. Die ermittelten mittleren Temperaturschwankungen der beiden Perioden sind in **Tabelle 5-3** aufgelistet.

Tabelle 5-3 – Größe der beiden periodischen Temperaturschwankungen ΔT und deren Dauer mit und ohne Haube.			
		MIT Haube	OHNE Haube
Kurze Periode	Dauer [min]	19 ± 2	14 ± 1
	ΔT [$^{\circ}\text{C}$]	$0,71 \pm 0,09$	$1,2 \pm 0,1$
Lange Periode	Dauer [h]	$1,7 \pm 0,4$	$1,71 \pm 0,08$
	ΔT [$^{\circ}\text{C}$]	$0,84 \pm 0,08$	$2,1 \pm 0,2$

5.2. Effekte von zellwandsynthesehemmenden Antibiotika auf FtsZ und PBP2

Im Rahmen des Projektes führte Dr. Jan-Samuel Puls vorläufige Experimente durch, in denen fluoreszierende Fusionsproteine, die mit der Zellwandsynthese in Zusammenhang stehen, mikroskopisch untersucht wurden. Dabei stellte er fest, dass 15 Minuten nach der Zugabe der Antibiotika insbesondere das Protein PBP2 eine ungewöhnliche Lokalisierung aufwies, wenn die mit Oxacillin behandelten mit den Glykopeptid behandelten Zellen verglichen wurden. Im Gegensatz dazu zeigten die anderen Proteine keine ungewöhnlichen Verteilung, wenn die Bakterien mit Oxacillin im Vergleich zu den mit Glykopeptiden (Vancomycin und Telavancin) behandelten Zellen untersucht wurden.¹⁷⁴

Darüber hinaus wurde bereits von Monteiro *et al.* 2018⁷³ darauf hingewiesen, dass FtsZ eine zentrale Rolle im ersten Teil der Septumprogression spielt. Sie konnten zudem demonstrieren, dass FtsZ sich gut eignet, um die Septumbildung nachzuverfolgen.

Zur tieferen Untersuchung der zellulären Veränderungen der Bakterien wurden daher zeitaufgelöste Experimente mit *S. aureus* durchgeführt. Die Bakterien sollten entweder FtsZ-mCherry oder PBP2-GFP exprimieren und wurden wahlweise mit den Glykopeptiden Vancomycin oder Telavancin oder dem Beta-Laktam Oxacillin abgebildet.

5.2.1. Kontrollexperimente zur Einschätzung der zeitaufgelösten Experimente

Vor der Durchführung gezielter zeitaufgelöster Experimente musste eingeschätzt werden, ob die Bakterien in der Lage sind, sich normal unter den experimentellen Bedingungen zu verhalten. Dazu wurde das Teilungsverhalten der Bakterien in zeitaufgelösten Experimenten in der Umgebung der geplanten Versuchsserien untersucht. Von besonderer Bedeutung war die Untersuchung des Einflusses von blauem Licht (488 nm) zur Anregung von GFP, da dieses bekanntermaßen bakterizide Eigenschaften besitzt und sich negativ auf das Wachstum der Bakterien auswirken könnte.^{180, 181} Aus diesem Grund wurde ein zusätzliches Experiment unter PBP2-GFP-Expression mit erhöhter Anregungsleistung des Lasers der Wellenlänge von 488 nm durchgeführt.

Es wurde die Replikationszeit der Bakterien in den Kontrollexperimenten mit FtsZ-mCherry- und PBP2-GFP-Expression berechnet. Die Bestimmung der Replikationszeit erfolgte durch die Auswahl von jeweils $n = 10$ Bakterien aus drei unabhängigen Experimenten, die sich zweimal im Verlaufe des Beobachtungszeitraums teilten. Die Differenz der Zeitpunkte, zu denen sich die Zellen getrennt hatten, wurde gebildet. Die ermittelten Werte für die Replikationszeit der Bakterien in den Kontrollexperimenten mit FtsZ-mCherry- und PBP2-GFP-Expression liegen bei $42,7 \pm 0,5$ min respektive $48 \pm 1,5$ min. Aus drei gemessenen Wachstumskurven von *S. aureus* in bakterieller Kultur wurde eine Dopplungszeit von 32 ± 2 min in MH bestimmt.

Des Weiteren wurde der Anteil der Bakterien bestimmt, die sich bei erhöhter Laserleistung über den Beobachtungszeitraum von 90 Minuten nicht teilen und mit den Experimenten mit verringerter Laserleistung verglichen (Abb. 37). Es konnte festgestellt werden, dass die erhöhte Laserleistung die Teilung der Bakterien verhindert. Für die verwendete Leistungsdichte von 11 W/cm^2 wurde aus drei Replikaten ein Anteil sich

nicht teilender Bakterien von $0,9 \pm 0,3 \%$ ermittelt, welcher sich mit der erhöhten Leistungsdichte von 154 W/cm^2 aus zwei Replikaten auf $83,5 \pm 7,5 \%$ erhöhte.

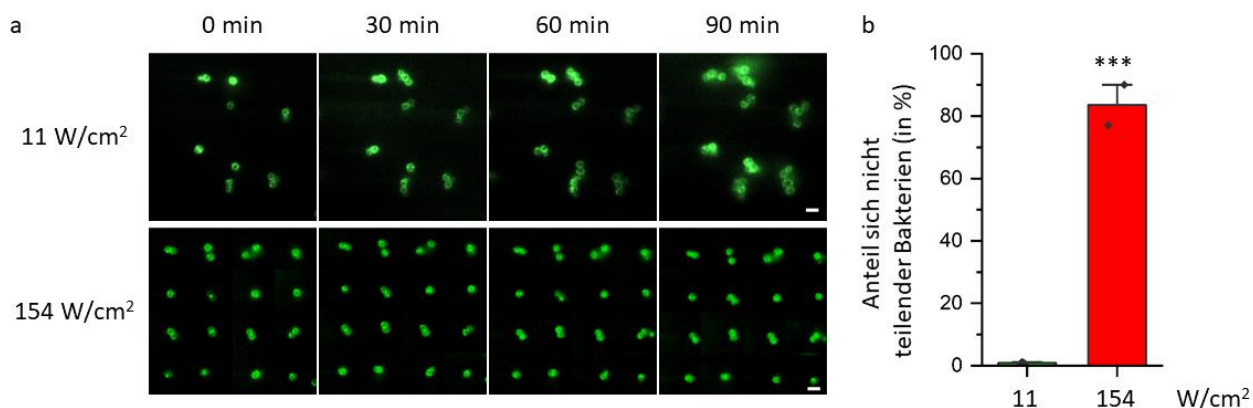


Abb. 37: Bakterien teilen sich bei stärkerer Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 488 nm nicht mehr.

(a) Mikrogramme repräsentativer Bakterien abgebildet über 90 Minuten mit 11 W/cm^2 und 154 W/cm^2 Leistungsdichte des Lasers der Wellenlänge von 488 nm. Abgebildet wurden PBP2-GFP-exprimierende *S. aureus*-Zellen. Zugehörige Durchlicht- bzw. PC-Kanäle sind in Anhang Abb. 53 abgebildet. Skala $2 \mu\text{m}$. **(b)** Anteil der sich in dem Beobachtungszeitraum von 90 Minuten nicht teilenden Bakterien bei Beleuchtung der Zellen mit Leistungsdichten von 11 W/cm^2 und 154 W/cm^2 . Die Säulendiagramme zeigen den Mittelwert aus drei (11 W/cm^2) bzw. zwei (154 W/cm^2) Replikaten. Die Balken geben den Grenzwert wieder. $n > 100$ Zellen wurden für jedes Replikat ausgewertet. Statistische Signifikanz wurde gegen die mit 11 W/cm^2 beleuchtete Probe mittels eines ungepaarten Zweistichproben t-Tests mit einem Signifikanzintervall von 95 % ermittelt. Statistische Signifikanz ist markiert mit ***, $p = 0,001$ bis $0,0001$.

5.2.2. Einfluss der Antibiotika auf die FtsZ-Ringgrößendynamik

Es wurden Experimente mit FtsZ-mCherry-exprimierenden *S. aureus* durchgeführt, da FtsZ beinahe zu jedem Zeitpunkt der Zellteilung in der Nähe der neu gebildeten Zellwand lokalisiert. Außerdem konnte in höher auflösenden Experimenten festgestellt werden, dass der Effekt der Glykopeptide auf die Verteilung der Z-Ringgrößen der gesamten Population nach 25 Minuten sehr ähnlich ist (Abb. 38, aus Puls *et al.* 2023).¹⁷⁴

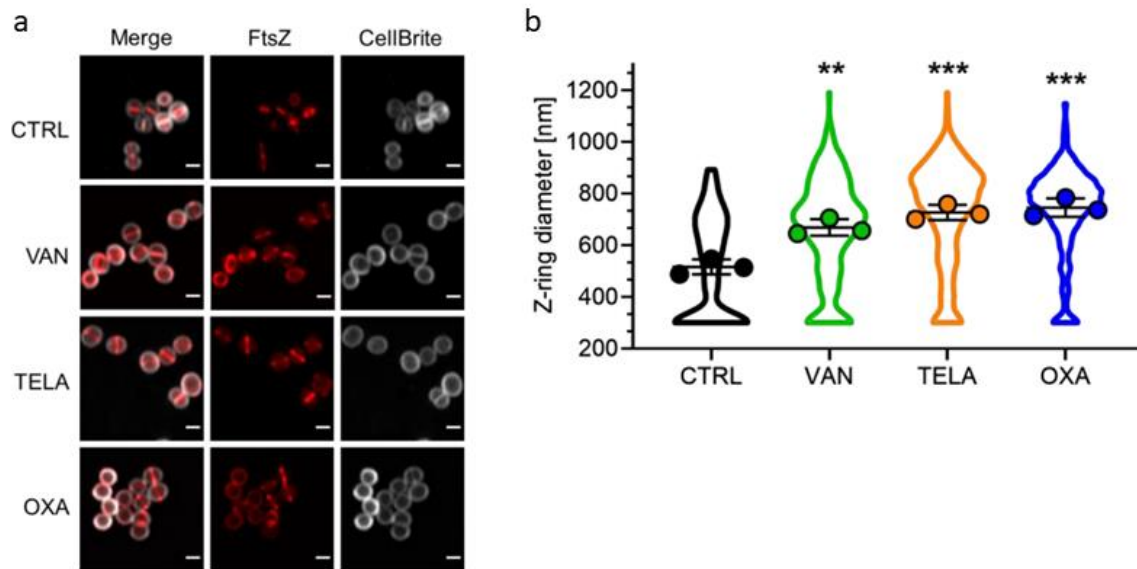


Abb. 38: Z-Ringgröße der Gesamtpopulation steigt nach Behandlung mit Vancomycin, Telavancin und Oxacillin. (a) Repräsentative AiryScan Mikrokogramme von *S. aureus* RN4220 pcq11-FtsZ-SNAP 25 Minuten nach Zugabe von Vancomycin (VAN), Telavancin (TELA), Oxacillin (OXA) oder einer unbehandelten Kontrolle (CTRL). SNAP-tag wurde mit SNAP-Cell® 505-Star markiert. Die Zellmembran wurde mit CellBrite® Fix 640 markiert. Skala 1 μm . (aus Puls *et al.* 2023)¹⁷⁴ (b) Verteilung der Z-Ringgröße über die gesamte Population nach Behandlung mit Antibiotikum. Die Violin-Plots zeigen die Verteilung individueller Zellen. Die Symbole repräsentieren die unabhängigen Replikate. $n \geq 57$ Zellen wurden für jedes Replikat und jede Bedingung ausgewertet. Statistische Signifikanz wurde gegen die unbehandelte Kontrolle mittels eines ungepaarten Zweistichproben t-Tests mit einem Signifikanzintervall von 95 % ermittelt. Statistische Signifikanz ist markiert mit **, $p = 0,01$ bis $0,001$; ***, $p = 0,001$ bis $0,0001$. ((a) und (b) aus Puls *et al.* 2023)¹⁷⁴

Kontrollexperimente ohne Antibiotikazugabe

FtsZ kann als Referenzstruktur verwendet werden, um dem Teilungsprozess der Bakterien zu folgen und deren Voranschreiten und das Zusammenziehen des Septums zu untersuchen.⁷³ Der Versuchszeitraum wurde aufgrund vorläufiger Experimente auf 70 Minuten nach Zugabe der Antibiotika festgelegt.¹⁷⁴ Das Kontrollexperiment mit FtsZ-mCherry-exprimierenden *S. aureus* (RN4220 pCQ11-FtsZ-mCherry) dient dem Zweck, das Verhalten der Bakterien ohne den Einfluss der verwendeten Antibiotika wiederzugeben.

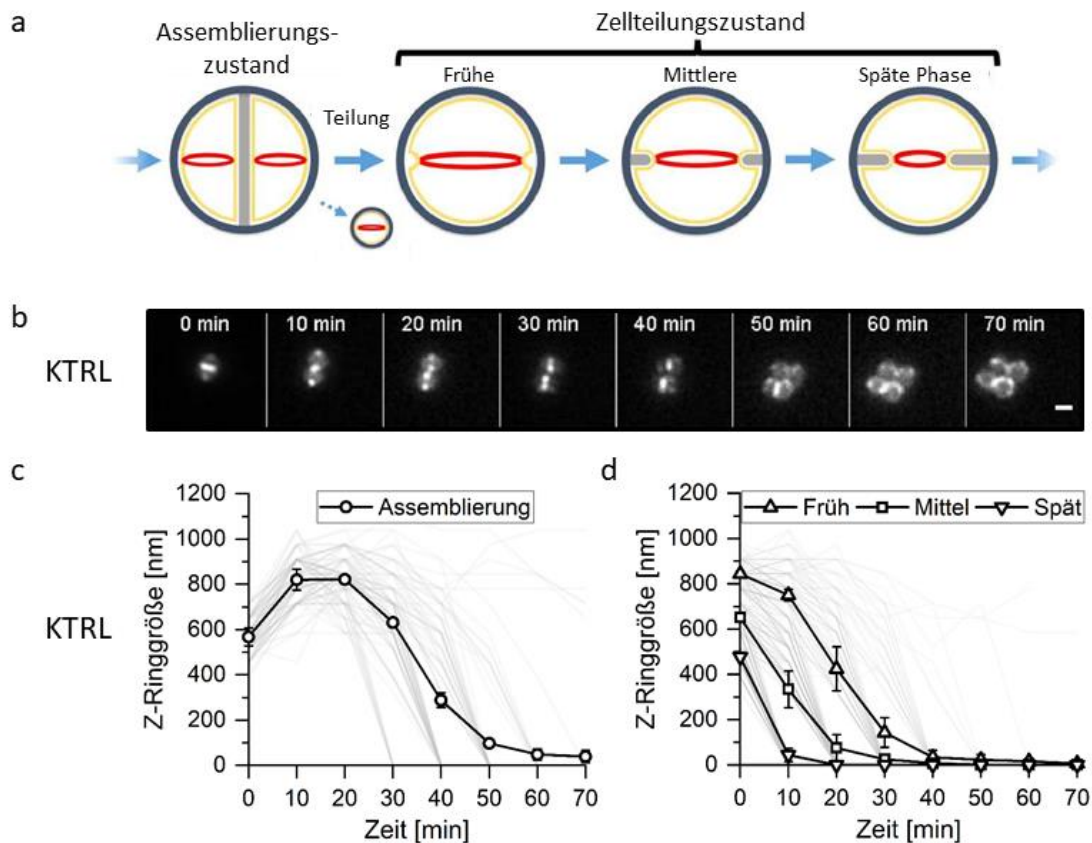


Abb. 39: Z-Ringgröße der unbehandelten Kontrolle über einen Zeitraum von 70 Minuten. (a) Schematische Darstellung des Zellteilungsprozesses, eingeteilt in zwei Zustände mit dem Zellteilungsprozess unterteilt in drei Phasen. Die Phasen des Zellteilungszustandes und der Assemblierungszustand bilden die Basis für weitere Auswertungen und sind in (b) wiederzufinden. (b) Repräsentative Mikrogramme von *S. aureus* RN4220 pCQ11-FtsZ-mCherry aufgenommen über 70 Minuten in 10-minütigen Inkrementen. Abgebildet ist das fluoreszente Fusionsprotein FtsZ-mCherry. Skala 1 μ m. (c) Messung der Z-Ringgröße über den Zeitraum der Experimente ausgehend des Assemblierungszustandes. Die Graphen zeigen den Mittelwert der Replikate $\pm$ SD. Die grauen, transparenten Graphen zeigen die Z-Ringgrößendynamik individueller Bakterien. Es wurden jeweils $n \geq 30$ Bakterien ausgewertet. (d) Messung der Z-Ringgröße über den Zeitraum der Experimente ausgehend der Phasen des Zellteilungszustandes. Die Graphen zeigen den Mittelwert der Replikate $\pm$ SD. Die grauen, transparenten Graphen zeigen die Z-Ringgrößendynamik individueller Bakterien. Es wurden jeweils $n \geq 30$ Bakterien ausgewertet. ((a), (b), (c) und (d) modifiziert nach Puls *et al.* 2023)¹⁷⁴

Es wurden zwei Zustände für eine weitergehende Auswertung festgelegt (Abb. 39,b). Der Assemblierungszustand ist darüber festgelegt, dass FtsZ-mCherry-Signal über den vollständigen septalen Bereich und an

den entgegengesetzten Polen lokalisiert (Abb. 39,b, links). Nach der physischen Trennung der Tochterzellen befinden sie sich in dem Zellteilungszustand. Dieser Zustand wird in weitere drei Phasen geteilt, die frühe, die mittlere und späte Phase des Zellteilungszustands. Abb. 39,a zeigt, wie, ausgehend von einem Bakterium, welches FtsZ-mCherry exprimiert, die Bakterien die Phasen durchlaufen, welche abhängig der Z-Ringgröße definiert wurden (siehe Kapitel 4.4.1). Es wurden jeweils circa 30 Bakterien aus jedem Replikat für jede der Teilungsphasen und den Assemblierungszustand ausgewählt und der Z-Ringdurchmesser über die Zeit verfolgt (Abb. 39,c und d).

Ausgehend von dem Assemblierungszustand steigt die Z-Ringgröße initial nach der Trennung der Zellen. Anschließend sinkt die Z-Ringgröße stetig, bis der Ring geschlossen ist. Der gesamte Prozess von Assemblierungszustand bis das Septum geschlossen ist dauert 34 ± 1 min während, ausgehend der frühen, mittleren oder späten Phase, das Abschnüren des Septums 20 ± 3 min, 14 ± 2 min respektive 8 ± 1 min dauert.

Veränderung der Z-Ringgröße abhängig der Antibiotikazugabe

Im starken Kontrast zur unbehandelten Kontrolle zeigen die mit den Glykopeptiden Vancomycin und Telavancin behandelten Bakterien eine nahezu sofortige Unterbrechung der Septumprogression (Abb. 40, a, VAN und TELA). Es ist deutlich zu sehen, dass der Anteil der Bakterien, welche eine Verkleinerung des Z-Rings um mehr als 130 nm in den ersten 10 Minuten aufweisen (Abb. 40, b), von 48 % in der Kontrollmessung auf weniger als 3 % sinkt. Diese Beobachtung wird unabhängig von der Teilungsphase oder dem Zustand gemacht. Darüber hinaus ist lediglich weniger als 6 % der Zellen in der Lage, ihr Septum innerhalb von 70 Minuten nach der Zugabe von Vancomycin oder Telavancin um mehr als 130 nm zu schließen (Abb. 40, b). Im Vergleich dazu sind in Experimenten ohne Antibiotikazugabe 98 % der Zellen in der Lage, das Septum um die genannte Größe zu verringern. Des Weiteren ist festzustellen, dass in den Experimenten mit Glykopeptidzugabe lediglich 3 von 550 beobachteten Zellen im Zellteilungszustand in der Lage waren sich zu teilen, bei der unbehandelten Kontrolle waren es 98 % der Zellen. Außerdem ist erwähnenswert, dass, obwohl die Progression des Septums unter Zugabe der Glykopeptide sehr stark eingeschränkt ist, solche Zellen, welche sich in dem Assemblierungszustand befanden auch in der Lage waren sich noch zu teilen. Nichtsdestotrotz wurde daraufhin ein Teilungsstillstand in allen Tochterzellen beobachtet.

Die Zugabe von Oxacillin hat wie auch die Zugabe der Glykopeptide drastische Effekte auf den Teilungsprozess und die Veränderung der Z-Ringgröße (Abb. 40, a, OXA). In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, dass die Zellen, welche sich in dem Assemblierungszustand befinden, offenbar in der Lage sind, sich ein letztes Mal zu trennen, bevor die Septumprogression zum Stillstand kommt. Nichtsdestotrotz werden Unterschiede in der Ausprägung vor allem in Bezug auf unterschiedliche Teilungsphasen beobachtet. So wird beobachtet, dass 95 %, 63 % und 15 % der jeweils in der späten, mittleren und frühen Phase befindlichen Bakterien das Septum vollständig schließen können (Abb. 40, c). Es konnte beobachtet werden, dass Zellen, die sich in der frühen Teilungsphase befanden, in der Regel keine Verkleinerung des Septums zeigten. Darüber hinaus konnte eine Abnahme der Geschwindigkeit der Septumkontraktion beobachtet werden. In der Konsequenz erhöht sich die erforderliche Zeit für die vollständige Schließung des Septums signifikant (Abb. 40, d). So brauchen Zellen, welche sich in der mittleren oder späten Teilungsphase befinden 28 ± 4 min oder 15 ± 5 min, um das Septum vollständig zu schließen. Damit benötigen die mit Oxacillin behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Bakterien nahezu doppelt so lange, um ihr Septum zu schließen. Die Zahl

der Zellen aus der Gruppe der frühen Teilungsphase, welche ihr Septum schließen konnten, war zu klein, um sie statistisch auszuwerten.

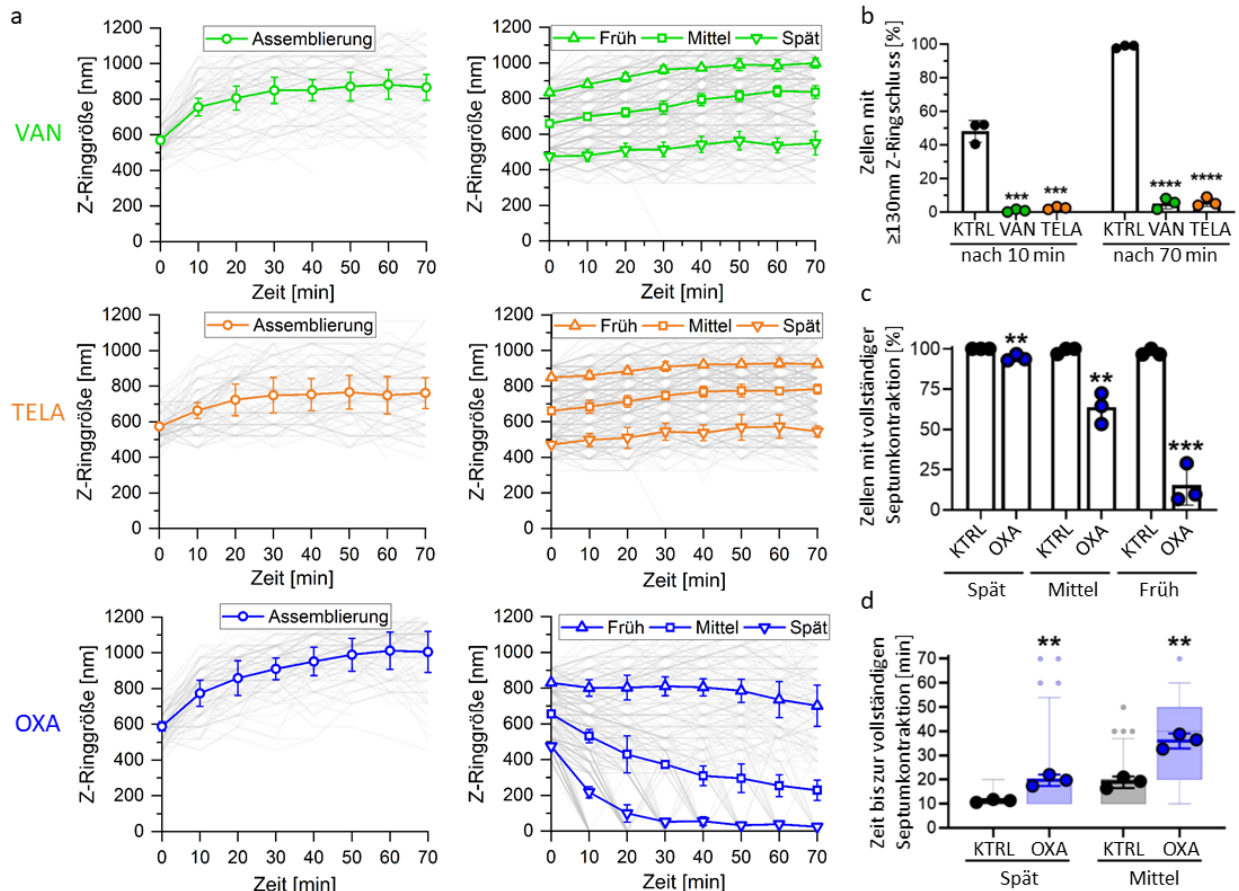


Abb. 40: Effekte der Antibiotika Vancomycin, Telavancin und Oxacilin auf die Z-Ringdynamik. (a) Messung der Z-Ringgröße über den Zeitraum der Experimente nach Zugabe von VAN, TELA oder OXA ausgehend des Assemblierungszustandes und der frühen, mittleren und späten Phase. Die Graphen zeigen den Mittelwert der Replikate $\pm$ SD. Die grauen, transparenten Graphen zeigen die Z-Ringgrößendynamik individueller Bakterien. Es wurden jeweils $n \geq 28$ Bakterien ausgewertet. **(b)** Quantifizierung der aktiven Septumkontraktion. Die Symbole repräsentieren jeweils eins der drei Replikate. Die Säulen stellen jeweils Mittelwerte der drei Replikate $\pm$ SD dar. $n \geq 28$ Zellen pro Replikat, Bedingung und Zellteilungsphase. **(c)** Quantifizierung der Septum-Schließungs-Aktivität in % der Zellen mit vollständiger Septumkontraktion innerhalb von 70 Minuten. Die Symbole repräsentieren jeweils eins der drei Replikate. Die Säulen stellen jeweils Mittelwerte der drei Replikate $\pm$ SD dar. $n \geq 29$ Zellen pro Replikat, Bedingung und Zellteilungsphase. **(d)** Quantifizierung der benötigten Zeit bis zur vollständigen Septumkontraktion. Für die Kategorie der frühen Phase ist der Stichprobenumfang und dem beinahe vollständigen Anhalten der Septum Progression zu klein für eine zuverlässige Auswertung. Die semitransparenten Box-Plots zeigen die Verteilung der individuellen Zellen mit 95 % Konfidenzintervall. Die semitransparenten, kleinen Symbole repräsentieren Ausreißer der Verteilung der individuellen Zellen. Die großen Symbole repräsentieren jeweils eins der drei Replikate. Dicke Linien stellen jeweils Mittelwerte der drei Replikate $\pm$ SD dar. $n \geq 29$ Zellen pro Replikat, Bedingung und Zellteilungsphase. Signifikanz wurde gegen die unbehandelte Kontrolle mittels eines ungepaarten Zweistichproben t-Tests mit einem Signifikanzintervall von 95 % ermittelt. Statistische Signifikanz ist markiert mit **, $p = 0,01$ bis $0,001$; ***, $p = 0,001$ bis $0,0001$; ****, $p \leq 0,0001$. ((a), (b), (c) und (d) modifiziert nach Puls *et al.* 2023)¹⁷⁴

Optimierte Auswertung und Analyse der Z-Ringgrößen

Neben der durchgeführten Auswertung zur Analyse der Z-Ringgrößen, wurde eine weitere teilautomatisierte Auswertung und Analyse realisiert. Die vorliegende Auswertung zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass die Klassifizierung der Daten nach den Zuständen und Teilungsphasen nun erst nach der Verarbeitung vorgenommen wurde.

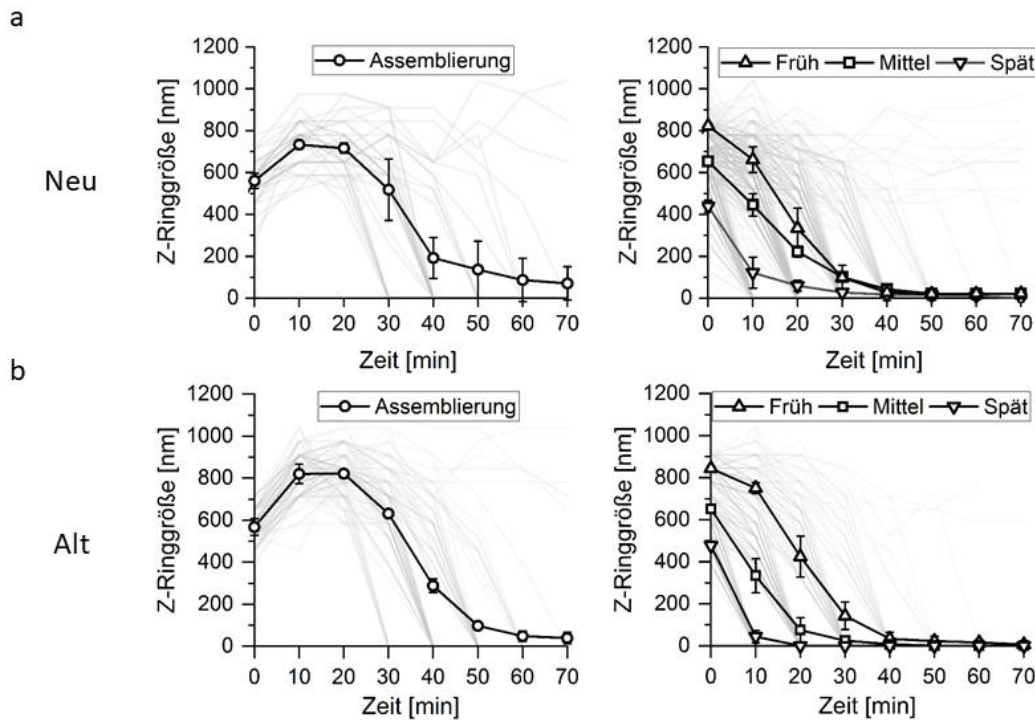


Abb. 41: Vergleich der händischen und optimierten Analyse der Z-Ringdynamik der unbehandelten Kontrolle. (a) Z-Ringgrößen nach Klassen ausgewertet mittels der optimierten Analyse. Schwarze Graphen mit Symbolen zeigen jeweils die mittlere Z-Ringgröße $\pm$ SD. Die grauen, transparenten Graphen zeigen die Z-Ringgrößendynamik individueller Bakterien. $n > 12$ Zellen für Assemblierungszustand, $n > 32$ Zellen für die Frühe, $n > 50$ Zellen für die Mittlere und $n > 18$ Zellen für die Späte Phase je Replikat. **(b)** Z-Ringgrößen nach Klassen ausgewertet mittels der alten Methode. Die Graphen zeigen den Mittelwert der Replikate $\pm$ SD. Die grauen Graphen im Hintergrund zeigen Z-Ringgrößendynamiken einzelner Bakterien. Es wurden jeweils $n \geq 30$ Bakterien ausgewertet. (Modifiziert nach Puls *et al.* 2023)¹⁷⁴

Die Parallelisierung der Prozesse und die Reduzierung der Benutzereingaben führten zu einer signifikanten Verkürzung der Auswertezeit auf etwa ein Fünftel der ursprünglichen Zeit. Die vorliegende Auswertung basiert auf den gleichen Rohdaten, wie die vorherige. Zur Einschätzung der Zuverlässigkeit wurden die Daten der unbehandelten Kontrolle sowie der mit Vancomycin und Oxacillin behandelten Experimente ausgewertet.

Abb. 41 zeigt einen direkten Vergleich der ursprünglichen Auswertung und der optimierten Auswertung der unbehandelten Kontrolle. Es zeigt sich, dass die Z-Ringgrößen aller Klassen einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Die mittlere und späte Phase des Teilungszustandes scheinen etwas näher zusammengedrückt zu sein.

Eine signifikante Veränderung zeigt sich auch in der Anzahl der ausgewerteten Individuen. Ursprünglich wurden jeweils $n = 90$ Zellen in jeden der Graphen eingebunden (Abb. 41, b), während nun der Assemblierungszustand und die frühe, mittlere und späte Teilungsphase jeweils durch insgesamt $n = 38$, $n = 106$, $n = 184$ und $n = 74$ Zellen repräsentiert werden (Abb. 41, a). Damit zeigt sich deutlich, dass der Assemblierungszustand und die späte Teilungsphase unterrepräsentiert sind. Analoge Graphen zu Abb. 41 mit Daten zu Vancomycin und Oxacillin sind im Anhang (Abb. 54) abgebildet.

Einfluss der Klassifizierung auf das mittlere Z-Ringverhalten

Um den Einfluss der Klassifizierung anhand der Z-Ringgröße zum Zeitpunkt der Zugabe einzuordnen, wurden die Daten der optimierten Auswertung genutzt, da diese die Gesamtheit der Population besser repräsentiert. Die mittleren Z-Ringgrößen der unbehandelten und der mit Vancomycin und Oxacillin behandelten Proben sind in Abb. 42 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Verteilung der Z-Ringgröße im Falle der Kontrolle über die gesamte Population zu Beginn der Messung Schwankungen unterliegt, sich jedoch nach $t = 20$ min um 400 ± 25 nm stabilisiert. Die mit Oxacillin behandelten Zellen zeigen hingegen anfänglich eine leichte Abnahme, woraufhin die mittlere Z-Ringgröße ansteigt und sich um 670 ± 21 nm herum einpendelt. Im Kontrast dazu steigt die mittlere Z-Ringgröße bereits nach Zugabe von Vancomycin an und erreicht nach $t = 40$ min eine stabile Größe von 800 ± 7 nm. Lediglich die individuellen Z-Ringdynamiken (grau in Abb. 42) deuten auf einen Unterschied des Effekts von Vancomycin im Vergleich zu Oxacillin hin.

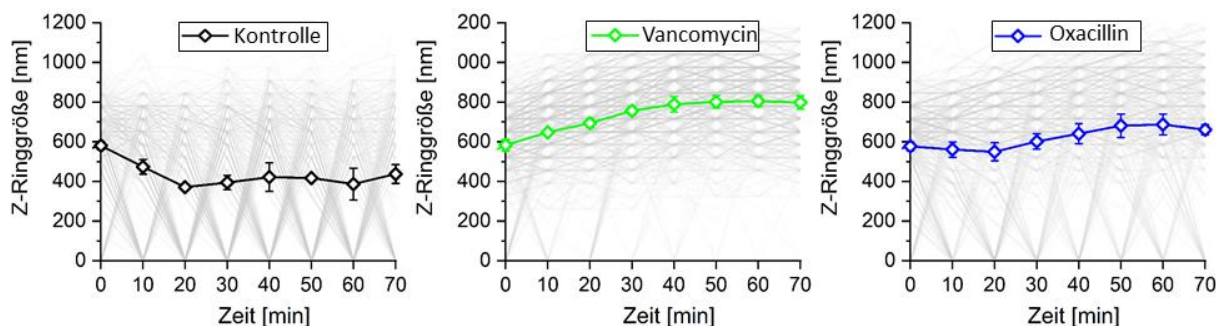


Abb. 42: Mittlere Z-Ringdynamik über die gesamte Population. Mittlere Z-Ringgröße aller Zellen $\pm$ SD über jeweils drei Replikate über den Beobachtungszeitraum der Experimente der Negativkontrolle und mit Vancomycin- und Oxacillinzugabe. Die grauen, transparenten Graphen zeigen die Z-Ringgrößendynamik individueller Bakterien. $n > 127$ Zellen für die Kontrolle, $n > 107$ für Oxacillin und $n > 173$ für Vancomycin je Replikat.

5.2.3. Einfluss der Antibiotika auf die PBP2-Lokalisierung

In vorläufigen Experimenten konnte Dr. Jan-Samuel Puls nachweisen, dass die Anzahl der Zellen mit septal lokalisierendem PBP2-GFP nach einer 25-minütigen Inkubation mit Oxacillin im Vergleich zu einer unbehandelten Probe signifikant abnimmt. Zudem wurde festgestellt, dass die Anzahl der Zellen mit septal lokalisierendem PBP2-GFP sogar weiter gesunken ist, als bei mit Glykopeptiden behandelten Zellen.¹⁷⁴ Diese vorläufigen Forschungsergebnisse zeigen deutlich, dass die Bakterien nach der Inkubation mit den genannten Antibiotika ein auffälliges Verhalten aufwiesen. Wie es zu den Verteilungen kommt, konnte allerdings nicht erklärt werden. Daher wurden zeitaufgelöste Experimente mit PBP2-GFP-exprimierenden Bakterien (*S. aureus* RN4220 RNpPBP2-31) durchgeführt, um dem zugrundeliegenden Prozess zu beleuchten.

Einfluss von zellwandsynthesehemmenden Antibiotika auf die PBP2-Lokalisierungsdynamik

Die unbehandelten Kontrollexperimente mit PBP2-GFP-exprimierenden *S. aureus*-Zellen zeigen deutlich, dass die Lokalisierung des PBP2-GFP zwei Verteilungen des Proteins in den Zellen aufweist (Abb. 43, a und b). Zum einen befindet sich vorhandenes Signal des Proteins vorzüglich im peripheren Bereich der Zellen. Hier können die Bakterien als nicht-septal Lokalisierend klassifiziert werden. Nach einer gewissen Zeit sammelt sich ein beträchtlicher Teil des Proteins in der septalen Ebene, was zu einer Klassifizierung als septal Lokalisierend führt. Die Bakterien lokalisieren hierbei PBP2 vorwiegend peripher, nachdem sie sich von ihrer Schwesterzelle getrennt haben. Im Prozess der Septumbildung und –progression lokalisieren sie PBP2 an dem Septum, bis sie sich wieder teilen (siehe Abb. 43, b). Der Prozess der Bildung septaler Lokalisierung wird auch als Rekrutierungsereignis bezeichnet. Die Überlappung der Flüsse von septaler zu nicht-septaler und nicht-septaler zu septaler Lokalisierung ist im Sankey-Diagramm (Abb. 43, c, KTRL) deutlich erkennbar. Der Anteil der Zellen, die PBP2 in der unbehandelten Kontrolle septal lokalisieren beträgt $37 \pm 6\%$. Der Anteil der PBP2 nicht-septal lokalisiert beträgt $63 \pm 6\%$.

Wie in Experimenten mit FtsZ-mCherry-Expression zu sehen, stoppt der Teilungsprozess auch wenn PBP2-GFP beobachtet wird bei Zugabe der Glykopeptide abrupt (Abb. 43, c, VAN und TELA). In der Folge ist kein Rekrutierungsprozess mehr zu beobachten, wenn Vancomycin zugegeben wird. Bei Telavancin ist lediglich in einer von 90 analysierten Zellen ein Rekrutierungsprozess festzustellen. In beiden Fällen wechseln einige Zellen aufgrund der Teilung zurück in die nicht-septal lokalisierende Gruppe. Bei der Zugabe von Vancomycin wechseln $26 \pm 12\%$ der Zellen, die zum Zeitpunkt der Zugabe eine septale PBP2-Lokalisierung aufweisen, in die Gruppe der PBP2 nicht-septal lokalisierenden Zellen. Bei der Anwendung von Telavancin sind es $18 \pm 12\%$. Der sich überkreuzende Fluss zwischen den Gruppen kommt im direkten Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle zum Erliegen.

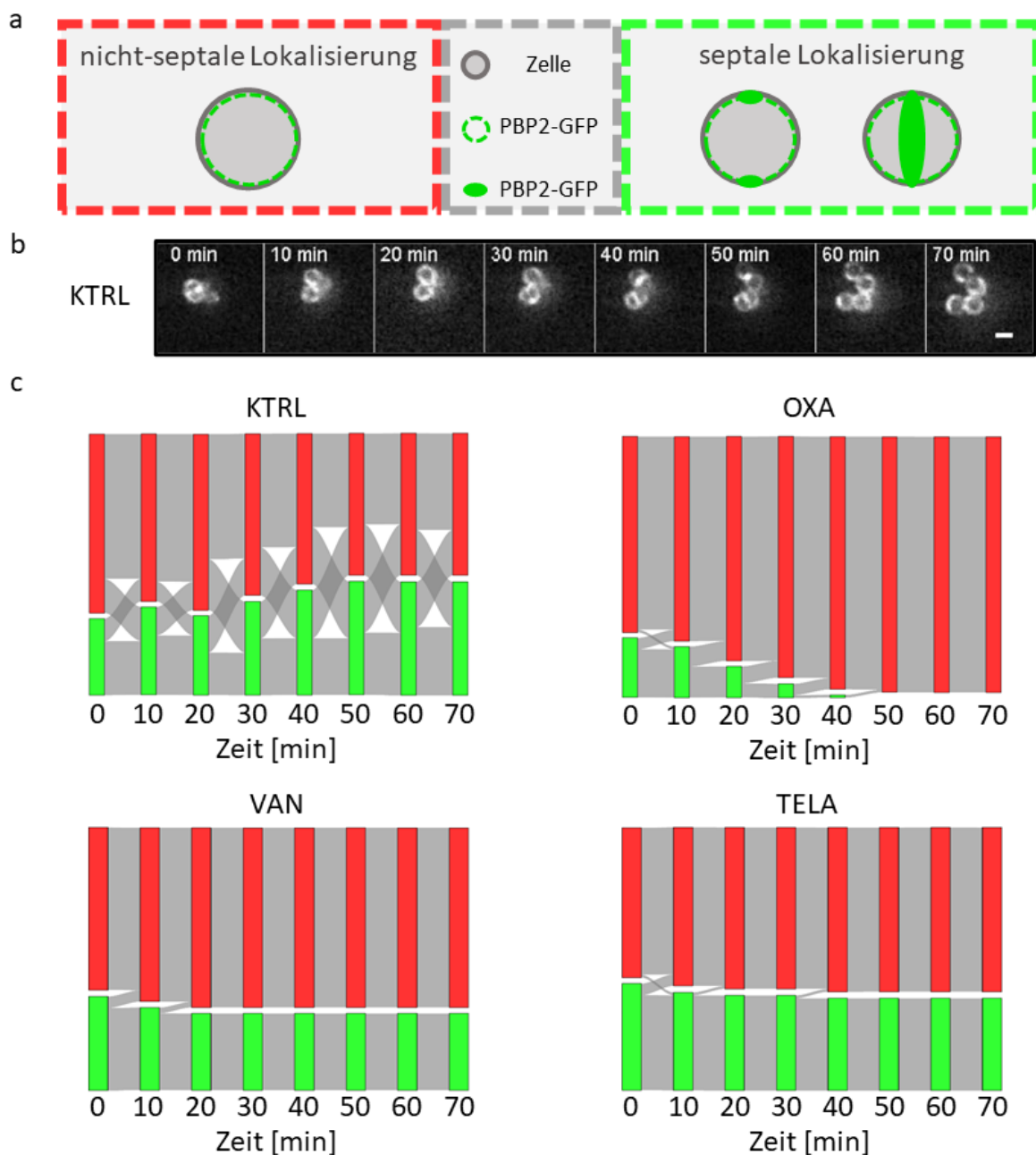


Abb. 43: Die Veränderung der PBP2-Lokalisierung unterscheidet sich abhängig von dem verwendeten Antibiotikum. (a) Schematisches Klassifizierungsbeispiel nach den Klassen „nicht-septale Lokalisierung“ und „septale Lokalisierung“. **(b)** Repräsentative Mikrogramme von *S. aureus* RN4220 RNpPBP2-31 aufgenommen über 70 Minuten in 10-minütigen Inkrementen. Abgebildet ist das fluoreszente Fusionsprotein PBP2-GFP. Skala 1 μm . **(c)** Verteilung der Kategorien in (a) mit dem Fluss (graue Verbindungsflächen) aufgetragen gegen die Zeit ohne Antibiotikum (KTRL), mit Oxacillin (OXA), mit Vancomycin (VAN) und mit Telavancin (TELA). Die roten Säulen geben den Anteil der Zellen mit nicht-septal lokalisiertem PBP2 und die grünen Säulen den Anteil der Zellen mit septal lokalisiertem PBP2 wieder. Gemeinsam ergeben zwei übereinander liegende Säulen 100 % der ausgewerteten Zellen. Die grauen Flächen zwischen den Säulen spiegeln den Fluss der Klassifizierung wider. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Replikaten. $n = 30$ Zellen pro Replikat. **(b)** und **(c)** modifiziert nach Puls *et al.* 2023)¹⁷⁴

Die mit Oxacillin behandelten Bakterien, welche PBP2-GFP-exprimieren, zeigen ein deutlich abgewandeltes Verhalten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und den mit Glykopeptiden behandelten Zellen. Es konnte festgestellt werden, dass der Fluss nahezu ausschließlich von einer septalen Lokalisierung zu einer nicht-septalen Lokalisierung von PBP2 beobachtet werden kann (Abb. 43, c). Dieser Wechsel wird ausschließlich mit der Teilung der Bakterien assoziiert und es wurde kein septal lokalisierendes PBP2 beobachtet, das nachträglich delokalisiert. Bei 90 analysierten Zellen wurde nur ein Rekrutierungsprozess von PBP2 beobachtet. Im direkten Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle wurde festgestellt, dass die Zahl der Rekrutierungsereignisse signifikant sinkt. In der Folge sinkt die Zahl der Zellen mit septal lokalisiertem PBP2 ab, bis keine Bakterien mit septal lokalisierendem PBP2 mehr beobachtet werden können.

Repräsentative Mikrogramme der Experimente mit Vancomycin, Telavancin und Oxacillin sind in Anhang Abb. 55 gezeigt.

5.2.4. Effekte der Antibiotika auf die Z-Ringgrößendynamik und PBP2-Lokalisierung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass alle untersuchten Antibiotika einen Einfluss auf die Dynamik der Z-Ringgröße ausüben. Die Behandlung mit Glykopeptiden führte dazu, dass die Z-Ringdurchmesser in einem Großteil der Population nach Zugabe des Antibiotikums nicht weiter abnahmen. Im Gegensatz dazu bewirkte die Behandlung mit Oxacillin, dass ausschließlich die Z-Ringdurchmesser von Bakterien in der frühen Teilungsphase nicht weiter abnahmen. Bakterien, die sich in der mittleren oder späten Teilungsphase befanden, zeigten weiterhin eine Abnahme des Z-Ringdurchmessers, wenngleich diese mit reduzierter Geschwindigkeit erfolgte. Betrachtet man die gesamte Population, so ist ersichtlich, dass die Entwicklung der Z-Ringgröße unter Vancomycin- und Oxacillin-Behandlung zwar nicht identisch, jedoch in ihrem Verlauf ähnlich ist und tendenziell ansteigt.

Auch die Effekte auf die Lokalisierung von PBP2 weisen unter Behandlung mit Glykopeptiden ein vergleichbares Muster auf: Innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe von Vancomycin oder Telavancin kommt der Klassenwechsel der PBP2-Lokalisation zum Erliegen. Im Gegensatz dazu zeigen die Experimente mit Oxacillin, dass alle Bakterien mit septaler PBP2-Lokalisierung ihre Klasse infolge von Zellteilung wechseln. Ein Klassenwechsel ohne begleitende Zellteilung konnte hingegen nicht beobachtet werden.

5.3. Untersuchung persistierender *Staphylococcus aureus*-Zellen

Zur Überprüfung der Hypothese, dass Persistenz in Beta-Laktam-behandelten Laborkulturen mit der Wachstumsphase der Bakterien zusammenhängt,¹³⁷ wurden Experimente zur Beobachtung über einen Zeitraum von 12 Stunden vorbereitet. Im Anschluss wurde das Antibiotikum entfernt und beobachtet, welche Bakterien überlebt haben und was sie von den abgestorbenen Zellen unterscheidet.

5.3.1. Test des Einsatzes für einfachen Volumenaustausch und Veränderung des Versuchsprotokolls

Primär sollte der Inkubationseinsatz für einfachen Volumenaustausch dazu dienen, das Experiment zur Langzeitbeobachtung ohne kontinuierlichen Volumenaustausch durchzuführen. In den entsprechenden Versuchen wurden FtsZ-mCherry-exprimierende *S. aureus*-Zellen untersucht, denen Oxacillin und SYTOX™ Green zugefügt wurden. SYTOX™ Green ermöglichte die zeitaufgelöste Quantifizierung abgestorbener Bakterien.

Hierfür wurde die Anzahl toter Zellen N_{tot} sowie die Gesamtzahl der Zellen N_{gesamt} anhand des SYTOX™- und FtsZ-mCherry-Signals bestimmt. Anschließend wurde der Quotient

$$R_{tot} = N_{tot}/N_{gesamt} \quad (3)$$

gebildet und als Funktion der Zeit aufgetragen (Abb. 44). Zusätzlich wurde die Zelldichte in den Aufgenommenen Bildfeldern näherungsweise bestimmt und die Kurven entsprechend eingefärbt. Der Zeitpunkt der Zugabe des Antibiotikums wurde als $t = 0$ min definiert.

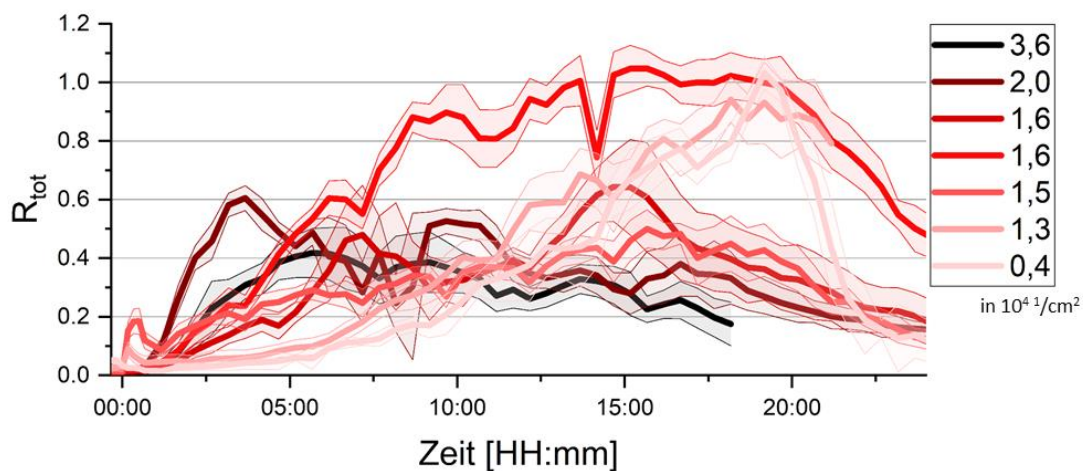


Abb. 44: Anteil toter Zellen in Experimenten mit einfachem Volumenaustausch. Ermittelter mittlerer Anteil toter Zellen $R_{tot} \pm SD$. Jeweils ermittelt aus fünf vermessenen Bildfeldern in jedem Experiment. Die näherungsweise bestimmte Zelldichte ist in 10^4 Zellen pro Quadratzentimeter [$10^4 \times 1/\text{cm}^2$] angegeben.

In den vorliegenden Experimenten zeigte sich, dass der Anteil abgestorbener Zellen über die Zeit hinweg ein stark variierendes, teilweise chaotisches Verhalten aufwies. In einigen Fällen starb lediglich ein geringer Teil der Population ab. Insgesamt folgten die beobachteten Verläufe keinem klaren oder einheitlichen Trend.

Basierend auf den vorherigen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein kontinuierlicher Fluss die Absterbebeschwindigkeit der Bakterien stabilisieren könnte. Zu diesem Zweck wurde der geschlossene Inkubationseinsatz für einfachen Volumenaustausch verwendet, um Experimente unter kontinuierlichem Volumenaustausch durchzuführen.

Die Temperatur wurde mittels eines nahe der Deckglasoberfläche positionierten Temperaturfühlers bei eingeschalteter Pumpe auf 37 °C geregelt. Anschließend wurde der Aufbau über einen längeren Zeitraum beobachtet und videografisch dokumentiert (Abb. 45). Die Aufnahmen zeigten, dass sich innerhalb von einer Stunde Gaseinschlüsse im geschlossenen System bildeten, deren Volumen im weiteren Verlauf zunahm. Innerhalb von weniger als sechs Stunden füllten diese Gaseinschlüsse das gesamte Probenvolumen des Inkubationseinsatzes aus.

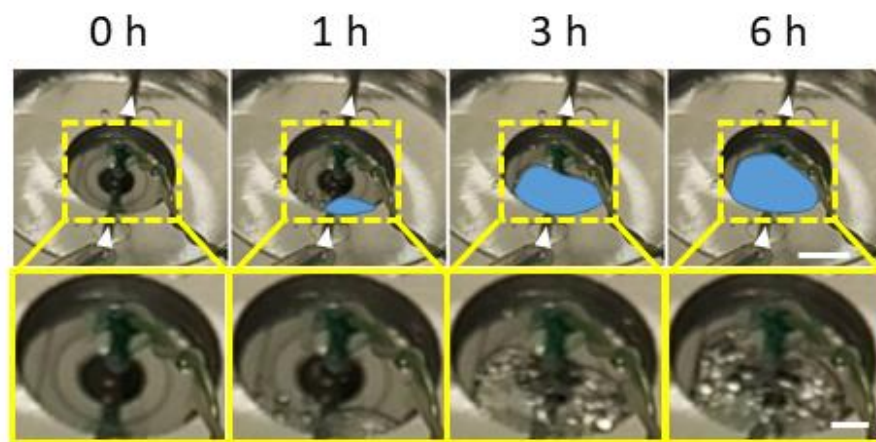


Abb. 45: Beispiel für die Bildung von Gas während des kontinuierlichen Volumenaustauschs. Standbilder eines Videos, welches über 10 h bei konstanten 37 °C und kontinuierlichem Fluss von ddH₂O durch den Einsatz für einfachen Volumenaustausch aufgezeichnet wurde. Die blauen Flächen (oben) deuten die mit gasförmigen Einschlüssen gefüllte Fläche an. Die weißen Pfeile deuten die Flussrichtung an. Die gelben gestrichelten Boxen oben markieren den Bereich der unten größer dargestellten Bildausschnitte. Skala (oben) 5 mm. Skala (unten) 2 mm.

Aufgrund der Gaseinschlüsse wurde entschieden, einen offenen Inkubationseinsatz für kontinuierlichen Volumenaustausch zu entwickeln.

Zur Bestimmung der zeitlichen Verzögerung, mit der Oxacillin nach Start der Pumpe die Bakterien im offenen Inkubationseinsatz für kontinuierlichen Volumenaustausch erreicht, wurden Experimenten mit FITC-Dextran durchgeführt. Bei einer Schlauchlänge von 8 m, einem Innendurchmesser von 0,5 mm und einer Netto-Volumenflussrate von 84 µL/min wurde eine Zeitspanne von 37,4 Minuten ermittelt, bis die Lösung das Probenvolumen erreichen sollte.

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu den nachfolgenden Experimenten mit Oxacillin. Dazu wurde FITC-Dextran in eine der Spritzen gefüllt und durch den offenen Inkubationseinsatz gepumpt, während die Fluoreszenzlösung in der Nähe der Deckglasoberfläche abgebildet wurde. Zusätzlich wurde der Entferungsprozess von Oxacillin durch den Einsatz eines kürzeren Schlauchs bei gefülltem Probenvolumen simuliert. Die gemessenen Intensitäten für den Additiven sowie den subtraktiven Prozess sind in Abb. 46 als Funktion der Zeit dargestellt. Die Intensitäten des additiven Prozesses wurden jeweils auf die maximale

erreichbare Intensität normiert, während für den subtraktiven Prozess eine Normierung auf die initial gemessene Intensität erfolgte.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Intensität im additiven Prozess (Abb. 46, links) im Mittel nach 40 ± 2 min um mehr als 5 % der Ausgangsintensität ansteigt. Ein Austauschgrad von über 80 % wurde nach 46 ± 2 min erreicht, während über 95 % Austausch im Mittel nach 55 ± 7 min erzielt wurden. Das Experiment mit der größten Verzögerung erreichte einen Austauschgrad von über 95 % erst nach 61 Minuten. Im Mittel betrug die Dauer bis zu einem Austauschgrad von über 80 % $4,3 \pm 3,2$ min, während ein Austausch von mehr als 95 % nach durchschnittlich $13,6 \pm 7,5$ min realisiert wurde.

Der subtraktive Prozess (Abb. 46, rechts) zeigte, dass eine stabile Restintensität unter 5 % der ursprünglichen Intensität im Mittel nach $15,3 \pm 7,1$ min erreicht wurde. Der längste gemessene Austauschvorgang dauerte 23 min.

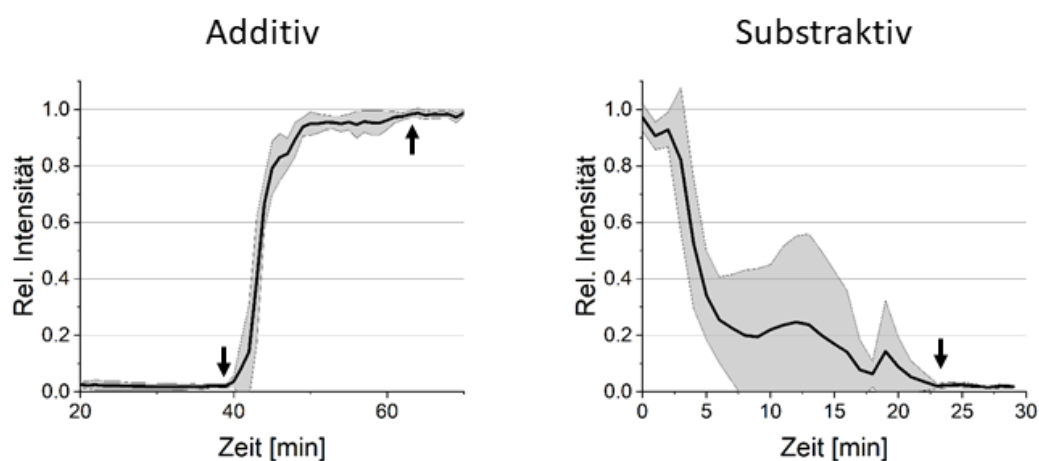


Abb. 46: Austausch der Probenlösung in Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch. Normierte mittlere Intensität des Beleuchtungsflecks $\pm$ SD des kontinuierlichen Austauschs des Probenvolumens von 1xPBS zu FITC-Dextran (links) und FITC-Dextran zu 1xPBS (rechts) angelehnt an Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch. Schlauchlänge (Additiv), 8 m; Schlauchlänge (Subtraktiv), 10 cm. Die schwarzen Pfeile deuten die Zeitpunkte an, zu denen der Austausch beginnt oder spätestens beendet ist.

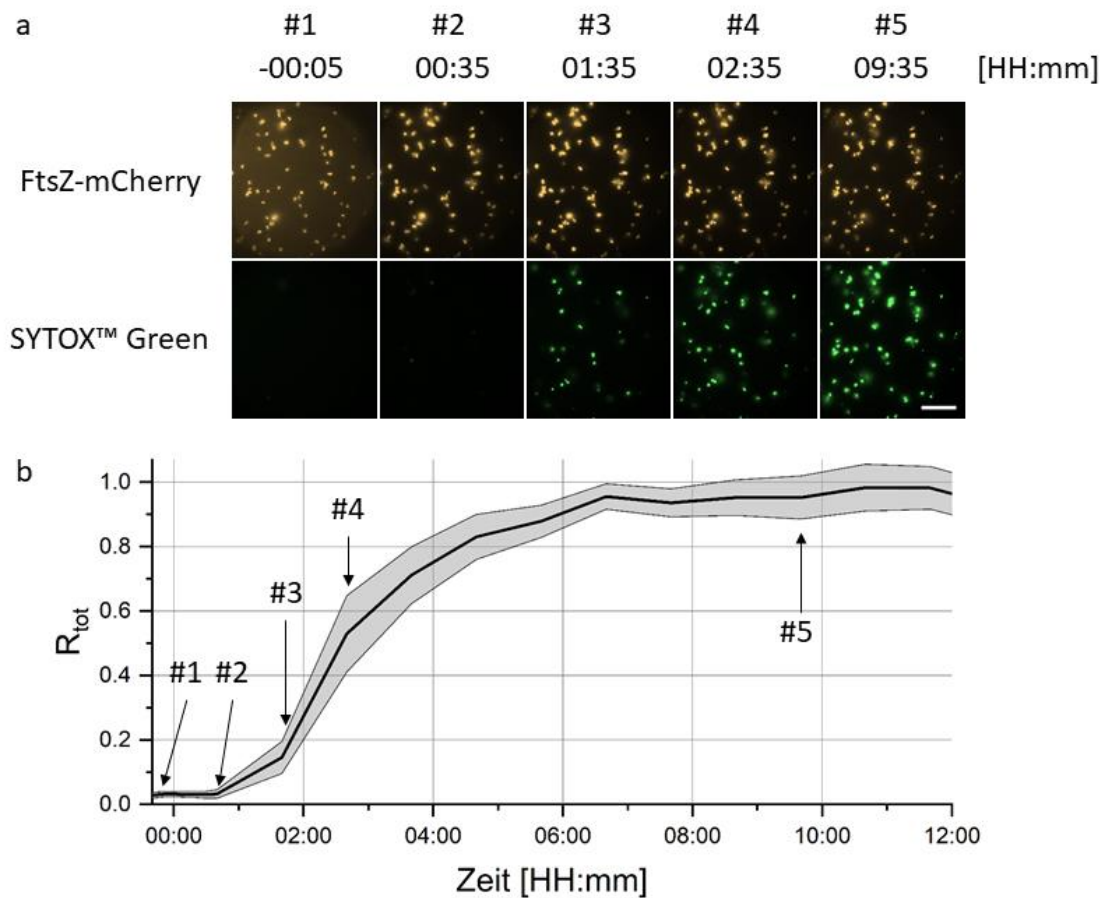


Abb. 47: Anteil toter Bakterien in Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch. (a) Beispielhafte Mikrogramme der FtsZ-mCherry- und SYTOXTM-Kanäle einer Messung zu ausgewählten Zeitpunkten. Skala 25 μ m. **(b)** Mittlerer Anteil toter Bakterien $R_{tot} \pm$ SD aus drei Replikaten. Bestimmt nach Gleichung (3) aus Experimenten mit SYTOXTM Green und kontinuierlichem Volumenaustausch.

Der Anteil abgestorbener Bakterien wurde unter Bedingungen eines kontinuierlichen Volumenaustauschs gemäß der Methodik in Kapitel 5.3.1 analysiert und gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 47). Der Zeitpunkt, zu dem Oxacillin die Bakterien erreichte, wurde als $t = 0$ min definiert. Im Vergleich zu den Experimenten mit einfachem Volumenaustausch und stehender Lösung zeigt der zeitliche Verlauf unter kontinuierlichem Austausch eine deutlich stabilere Dynamik. Die Experimente dienten dem Zweck, festzustellen, wann der Großteil der Bakterien abgestorben ist, um den Zeitpunkt zum Entfernen des Oxacillins festzulegen.

Die Auswertung der Daten zeigt auf, dass bereits nach acht Stunden ein stabiler Anteil abgestorbener Zellen von über 90 % erreicht wird. Auffällig ist die Standardabweichung in der Größenordnung von etwa 10 %. Diese relativ hohe Streuung ist jedoch auf die Methodik der Bestimmung der Zellzahlen zurückzuführen. Die Auswertung war primär auf die Ermittlung der zeitlichen Dynamik der Absterberate und nicht auf die exakte Zellzählung ausgelegt.

5.3.2. Überlebenswahrscheinlichkeit nach Zugabe von Oxacillin

Zwölf Stunden nach Zugabe des Oxacillins wurde das Antibiotikum entfernt, um die weitere Entwicklung der Bakterien zu beobachten. Ziel war es, potenziell überlebende bzw. persistente Zellen zu identifizieren. In die nachfolgende Analyse flossen zehn unabhängige Experimente ein: vier Experimente mit FtsZ-mCherry-exprimierenden Bakterien (RN4220 pcq11-FtsZ-mCherry) unter zusätzlicher Zugabe von SYTOX™ Green, drei weitere mit ausschließlich FtsZ-mCherry-exprimierenden Zellen sowie drei Experimente mit Bakterien, die MurJ-nGreen exprimierten (RN4220 pcq11-MurJ-nGreen).

Die Gesamtzahl analysierter Zellen variierte experimentell zwischen etwa 3.000 und 35.000 Bakterien pro Versuch. Die Anzahl identifizierter überlebender Zellen lag jeweils zwischen 1 und 22. Über alle Experimente hinweg wurden rund 120.000 Zellen erfasst, von denen 74 als überlebend oder persistent klassifiziert werden konnten. Daraus ergibt sich ein Anteil überlebender Zellen von etwa 6×10^{-4} .

5.3.3. Z-Ringgröße persistenter Bakterien während der Zugabe von Oxacillin

Die Auswertung der nachfolgenden Daten basiert auf der Hypothese, dass die Teilungsphase, in der sich ein Bakterium zum Zeitpunkt der Antibiotikazugabe befindet, maßgeblich zur Ausprägung eines persistenten Phänotyps beiträgt.¹³⁷ Zur Bestimmung der Teilungsphase wurde die Z-Ringgröße überlebender und nicht überlebender Bakterien analysiert (siehe Abb. 48), da sich der Z-Ring als geeigneter Marker für den Zellzyklusstatus erwiesen hat (siehe Kapitel 5.2.2).

Die mittleren Z-Ringgrößen $\pm$ SD wurden über einen Zeitraum von 25 Minuten vor bis 20 Stunden nach Oxacillinzugabe (entspricht 8 Stunden nach Entfernung des Antibiotikums) ermittelt und sind in Abb. 48, a und b dargestellt. Da ein erheblicher Anteil der nicht überlebenden Zellen im weiteren Verlauf der Experimente kollabierte, konnten diese nicht weiter vermessen werden (Anhang, Abb. 56, a). Zu Beginn konnten bis zu 67 Z-Ringe nicht überlebender Bakterien vermessen werden; nach zehn Stunden reduzierte sich die Anzahl jedoch auf unter 15 % der ursprünglich erfassten Anzahl. Für überlebende Bakterien (Abb. 48, b) war die Auswertung nur für eine kleine Zellzahl möglich (Anhang, Abb. 56, a). Deren Zahl lag jedoch über einen Zeitraum von bis zu 15 Stunden nach Antibiotikazugabe stabil zwischen 12 und 21. Aufgrund der nachfolgenden Zellteilungen wurden die überlebenden Zellen nur bis zu ihrer ersten Teilung nach Entfernen des Antibiotikums ($t > 12$ h) berücksichtigt. Zwischen 2 und 12 Stunden nach Zugabe des Oxacillin zeigten die analysierten Z-Ringe überlebender und nicht überlebender Bakterien eine weitgehend ähnliche Entwicklung, wobei die Aussagekraft dieser Beobachtung durch die geringe Stichprobengröße limitiert ist.

Aufgrund der höheren zeitlichen Auflösung in der frühen Phase des Experiments wurde ein vergrößerter Ausschnitt des Zeitfensters von 25 Minuten vor bis eine Stunde nach Oxacillinzugabe in Abb. 48, c und d dargestellt. Hier konnte ein klarer Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden: Bei überlebenden Zellen zeigte sich bereits kurz nach Zugabe von Oxacillin eine Abnahme der Z-Ringgröße auf unter 200 nm. Im Gegensatz dazu nahm der durchschnittliche Z-Ringdurchmesser bei den nicht überlebenden Bakterien kontinuierlich bis etwa 35 Minuten nach Zugabe des Antibiotikums zu.

Fünf Minuten vor der Zugabe lag die mittlere Z-Ringgröße $\pm$ SD überlebender Zellen ($n = 21$) bei 240 ± 290 nm und sank innerhalb der folgenden 10 Minuten auf 130 ± 380 nm. Bei den nicht überlebenden Zellen ($n = 67$) lagen die entsprechenden Werte bei 480 ± 380 nm bzw. 770 ± 330 nm.

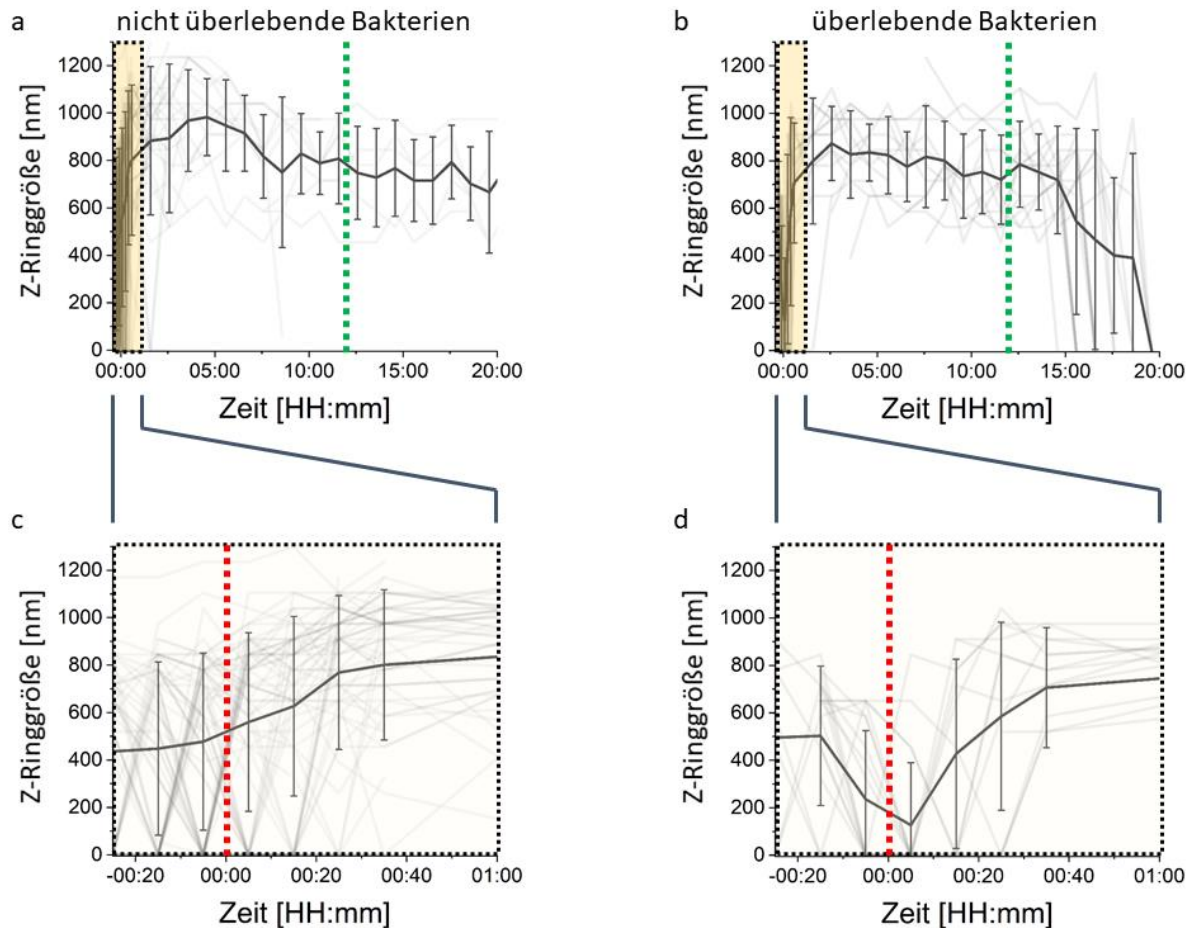


Abb. 48: Z-Ringgrößen der nicht überlebenden und überlebenden Bakterien. Z-Ringgröße nicht überlebender (a) und überlebender (b) Bakterien über den Zeitraum von 25 Minuten vor bis 20 Stunden nach Zugabe von Oxacillin. Abgebildet ist der Mittelwert aller ausgewerteten Zellen $\pm$ SD. Die grauen, transparenten Graphen zeigen die Z-Ringgrößendynamik individueller Bakterien. Die grüne, gepunktete Linie deutet den Zeitpunkt an, zu dem Oxacillin herausgewaschen wird. Z-Ringgröße nicht überlebender (c) und überlebender (d) Bakterien über den Zeitraum von 25 Minuten vor bis eine Stunde nach Zugabe von Oxacillin. Abgebildet ist der Mittelwert aller ausgewerteten Zellen $\pm$ SD. Die grauen, transparenten Graphen zeigen die Z-Ringgrößendynamik individueller Bakterien. Die rote, gepunktete Linie deutet den Zeitpunkt an, zu dem Oxacillin zugegeben wird. Der gelbe, transparente Kasten (oben) deutet den Bereich an, der darunter gezeigt ist.

5.3.4. Teilungszeitraum persistenter und nicht überlebender Bakterien unter Oxacillinzugabe

Aufgrund der geringen Anzahl auswertbarer Bakterien, deren Z-Ringgrößen bestimmt werden konnten, wurde ergänzend der Zeitraum der letzten Zellteilung analysiert. Der Teilungszeitraum beschreibt die Zeitspanne, in der eine Bakterienzelle ihre letzte Zellteilung vollzieht – also den Zeitraum, in dem die letzte Trennung der Tochterzellen voneinander stattfindet (Abb. 49, a).

Das Teilungsverhalten konnte bereits im Phasenkontrastbild beobachtet und durch das Signal der anderen Kanäle (FtsZ-mCherry oder MurJ-nGreen) zuverlässig bestätigt werden (siehe Abb. 49, a, Zeitbereich 00:00 bis 00:10). Insgesamt konnte der Teilungszeitraum für 55 der 74 als persistent klassifizierten Zellen bestimmt werden (Abb. 49, b). Dabei zeigte sich, dass sich 6 dieser 55 Zellen (11 %) im Zeitraum zwischen 35 und 155 Minuten nach Zugabe des Antibiotikums teilten. Der überwiegende Teil (84 %) der persistenten Bakterien vollzog die letzte Zellteilung innerhalb der ersten 35 Minuten nach Beginn der Oxacillinbehandlung.

Zum Vergleich wurde der Teilungszeitraum von 119 nicht überlebender Bakterien analysiert (siehe Abb. 49, b, NUB). Von diesen teilten sich 12 Zellen (10 %) zwischen 35 und 155 Minuten nach Oxacillinzugabe, während 48 % ihre letzte Zellteilung innerhalb der ersten 35 Minuten durchliefen. Die mittlere Zeit bis zur letzten Teilung betrug bei den persistierenden Bakterien 13 ± 9 Minuten, während nicht überlebende Zellen im Mittel bereits 2 ± 14 Minuten nach Zugabe des Antibiotikums ihre letzte Zellteilung vollzogen.

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass bei 95 ± 5 % der persistierenden Zellen die letzte Zellteilung nach Zugabe von Oxacillin erfolgte. Zum Vergleich lag dieser Anteil bei den nicht überlebenden Zellen bei 66 ± 22 %. Diese Analyse basiert auf einer konservativen Annahme: Teilungen, deren Zeitintervall auch nur eine Minute vor Antibiotikazugabe begann, wurden als prä-Antibiotikum-Teilungen gewertet. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich einige dieser Zellen tatsächlich erst nach Beginn der Behandlung teilten. Aufgrund des 10-minütigen Messintervalls wäre eine exakte zeitliche Einordnung der letzten Teilung dieser Bakterien prinzipiell nicht mit vollständiger Sicherheit möglich. In die Analyse einbezogen wurden ausschließlich experimentelle Replikate, bei denen entweder mindestens 10 Zellen ausgewertet werden konnten.

Bemerkenswert ist zudem, dass in allen Fällen, in denen beide Tochterzellen nach Zellteilung beobachtet werden konnten ($n = 40$), ausschließlich einer der Schwesterzellen überlebte (z.B. Abb. 49, a, grauer Pfeil).

Die persistierenden Zellen zeigten eine Erholung von der Antibiotikabehandlung und erreichten im Mittel 250 ± 90 Minuten nach Entfernung von Oxacillin erneut Teilungsfähigkeit (Abb. 49, d).

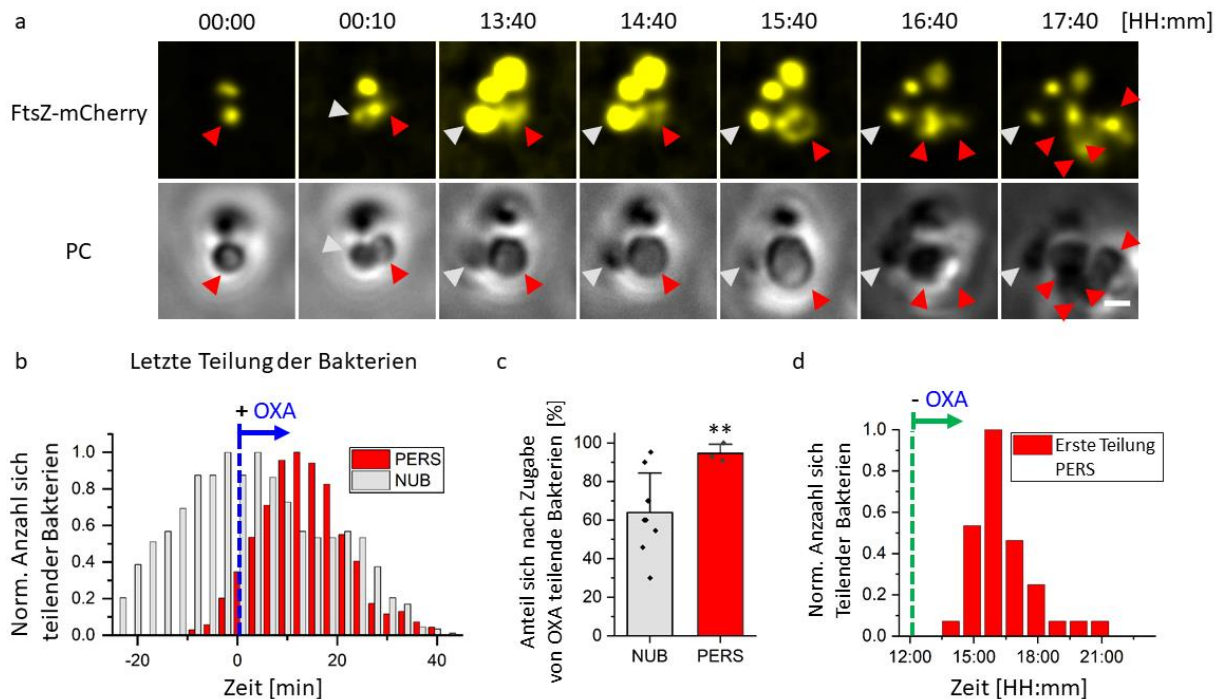


Abb. 49: Teilungszeitraum persistenter und sterbender Bakterien. **(a)** Beispiel einer überlebenden Zelle (roter Pfeil) im FtsZ-mCherry- und PC-Kanal zu ausgewählten Zeiten. Die Schwesterzelle der persistenten Zelle ist mit einem grauen Pfeil markiert. Maximumprojektion (FtsZ-mCherry) mit angepasstem Kontrast zur besseren Erkennung der persistenten Zelle. Rot markiert sind zusätzlich die Tochterzellen der persistierenden Zelle, welche sich nach mehr als 15 Stunden und 40 Minuten teilte. Die angegebenen Zeitpunkte wurde dem Messraster entsprechend korrigiert. **(b)** Jeweils auf das Maximum normierte Anzahl sich zum letzten Mal in den Zeitintervallen teilende Zellen. Persistente Bakterien – PERS; nicht überlebende Bakterien – NUB. Die blaue, gestrichelte Linie und der blaue Pfeil deuten den Zeitpunkt der Zugabe von Oxacillin (OXA) an. n (PERS) = 49; n (NUB) = 107. **(c)** Anteil der Zellen die sich nach Zugabe von Oxacillin ein weiteres Mal teilen. Die Säulendiagramme zeigen den Mittelwert $\pm$ SD. Die kleinen Symbole zeigen die einzelnen Replikate. $n > 10$ je Replikat. Berücksichtigt wurden nur Replikate in denen mehr als 10 Zellen definitiv ausgewertet werden konnten. Die Zuordnung erfolgte konservativ – alle Bakterien, deren Teilungszeitraum vor der Zugabe des Oxacillins beginnt, wurden ausgenommen. **(d)** Auf das Maximum normierte Anzahl der sich nach Entfernen des Antibiotikums teilenden Bakterien. $n = 71$. Die grüne, gestrichelte Linie und der grüne Pfeil deuten den Zeitpunkt des Entferns von Oxacillin (OXA) an. Signifikanz wurde gegen die nicht überlebenden Bakterien mittels eines ungepaarten Zweistichproben Welch's Test mit einem Signifikanzintervall von 95 % ermittelt. Statistische Signifikanz ist markiert mit **, $p = 0,01$ bis $0,001$.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Versuchsprotokolle für zeitaufgelöste fluoreszenzmikroskopische Experimente entwickelt. Die Experimente und die anschließende Analyse ermöglichten Einblicke in die zellulären Effekte der zellwandsynthesehemmenden Antibiotika Vancomycin, Telavancin und Oxacillin.

6.1. Einfluss der eingesetzten Methoden auf die Experimente mit *Staphylococcus aureus*

Im Folgenden wird untersucht, inwieweit die angewandten Methoden die Durchführung der geplanten Experimente mit *S. aureus*-Zellen beeinflusst haben und welchen Beitrag sie zur erfolgreichen Umsetzung der Experimente geleistet haben.

6.1.1. Auflösung und Kontrast profitieren von der Dekonvolution

Die Auflösungsgrenzen des Mikroskops geben uns Aufschluss über die kleinstmöglichen Objekte, die abgebildet und voneinander unterschieden werden können. In diesem Zusammenhang spielt die PSF des Mikroskops eine zentrale Rolle, da sie maßgeblich die laterale und axiale Auflösung bestimmt. Allerdings beeinflussen auch weitere Faktoren, die nicht vollständig durch die PSF erfasst werden, die tatsächliche Auflösung. Dazu zählen unter anderem die Intensität des fluoreszierenden des Emitters¹⁸² sowie lokale Abbildungsfehler im optischen System.^{183, 184} Darüber hinaus kann eine nachträgliche Dekonvolution der Bilddaten die effektive Auflösung verbessern, weshalb auch dieser Aspekt in die Bewertung der Auflösungsgrenze einbezogen werden sollte.

Um das tatsächliche Signal selbst einfließen zu lassen, erfolgte eine Charakterisierung des Signals der in dieser Arbeit vermessenen Struktur (FtsZ-mCherry) in Rohdaten sowie dekonvolvierten Daten (siehe Kapitel 5.1.2). Es lässt sich eindeutig feststellen, dass der Kontrast des FtsZ-mCherry-Signals durch die Anwendung beider Dekonvolutionsalgorithmen signifikant ansteigt. Zudem ist eine deutliche Abnahme der Halbwertsbreite des Signals zu verzeichnen, was mit einem höheren Auflösungsvermögen assoziiert wird. Die deutlich größere Halbwertsbreite der Rohdaten im Vergleich zu der Halbwertsbreite der experimentellen PSF (Kapitel 5.1.1) lässt sich womöglich durch Signal aus anderen Ebenen erklären. Die Schmälerung der Halbwertsbreite, die durch die Dekonvolution des Signals hervorgerufen wird, ist wahrscheinlich auch damit verbunden, dass Signal aus anderen z-Ebenen entfernt wird. Die Auswahl der Stichprobe ist dabei von entscheidender Relevanz. Im Rahmen der Analyse wurden Zellen ausgewählt, die durch eine große Z-Ringgröße charakterisiert sind und deren Z-Ring orthogonal zur Abbildungsebene orientiert ist. Infolgedessen können die ermittelten Halbwertsbreiten nicht als repräsentativ für das Auflösungsvermögen aller Orientierungen und Teilungsphasen angesehen werden. Nichtsdestotrotz erlaube sie die Ableitung einer Tendenz. Es lässt sich ableiten, dass die untere Grenze der R-L-dekonvolvierten Daten bei ca. 330 nm und die untere Grenze der CMLE-dekonvolvierten Daten bei ca. 290 nm liegt. Die genannte Annahme wird auf Grundlage des Mittelwerts mit der SD aufgestellt. In jedem Einzelfall ist eine Einschätzung der Situation erforderlich.

6.1.2. Die homogene HILO-Beleuchtung ermöglicht Experimente mit fluoreszierenden Nährmedien

Neben einer Dekonvolution besteht die Möglichkeit, den Kontrast in den erzeugten Daten auch auf alternativem Wegen zu optimieren. Aufgrund der Fluoreszenz des verwendeten MH-Nährmediums bei Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm¹⁵⁶, ergibt sich in Experimenten zur Abbildung von PBP2-GFP ein Hintergrundsignal. In derartigen Experimenten empfiehlt es sich, den Kontrast zu erhöhen und das Signal zu verringern, indem eine HILO-Beleuchtung verwendet wird. Die vorliegenden Messungen zeigen deutlich, dass die Beleuchtung mit dem geeigneten Lichtblatt in der Abbildungsfläche zu einem Anstieg des Kontrasts führt (Kapitel 5.1.4). In Kombination mit dem vergrößerten Laserdurchmesser besteht während der Messungen mit PBP2-GFP die Möglichkeit zur Auswertung großer Teile des Bildfeldes. Dies liegt daran, dass nahezu ausschließlich in Neigungsrichtung ein Intensitätsgradient aufgrund des fluoreszierenden Mediums beobachtet wird. Ohne die Vergrößerung wäre die Intensitätsverteilung noch inhomogener und manche Bakterien könnten zu stark belichtet werden, was dazu führen könnte, dass sie sich nicht mehr teilen (siehe Kapitel 5.2.1). Schließlich ist zu berücksichtigen, dass eine derartige HILO-Beleuchtung dazu führt, dass Intensitätsmessungen aufgrund des Intensitätsgradienten sorgfältig geplant werden sollten. Wenn allerdings hauptsächlich Größen gemessen und Lokalisierungen charakterisiert werden sollen, wie es in dieser Arbeit der Fall war, nimmt der Intensitätsgradient keinen so großen Einfluss auf die Daten.

6.1.3. Ein vollständiger Austausch des Probenvolumens ist möglich

Die Beobachtung der Reaktion der Bakterien auf die Antibiotika in den ersten Minuten erforderte die Applikation der Antibiotika auf dem Mikroskop. Zu diesem Zweck wurde das Probenvolumen in den Experimenten ausgetauscht. Die Experimente mit dem Einsatz für einfachen Volumenaustausch zeigen deutlich, dass das Volumen beinahe vollständig mit nur einem Milliliter Lösung ausgetauscht werden konnte (siehe Kapitel 5.1.5). Dies hat eine Reduktion der erforderlichen Ressourcen sowie eine Steigerung des Vertrauens in die erzielten Konzentrationen der Antibiotika zur Folge. Darüber hinaus erfolgt der Austausch mit einer Geschwindigkeit, die eine ausreichende Erholung der Temperatur gewährleistet. Somit können die nachfolgenden Aufnahmen ohne Korrektur des Fokus durchgeführt werden.

Im Rahmen der Experimente, bei denen ein kontinuierlicher Austausch des Mediums stattfand, war es erforderlich, den Zeitpunkt der Zugabe des Antibiotikums zu bestimmen. Dies war notwendig, da das Medium kontinuierlich durch die Probenzelle gepumpt wurde. Die Geschwindigkeit mit der Oxacillin das Probenvolumen in Experimenten mit kontinuierlichem Austausch erreicht hat, entspricht in etwa der Erwartung (siehe Kapitel 5.1.5). Trotz der geringen Volumengeschwindigkeit steigt die Oxacillinkonzentration innerhalb weniger Minuten an. Der Zeitpunkt der Zugabe des Antibiotikums konnte über die Volumengeschwindigkeit und die Schlauchlänge in etwa vorhergesagt und wenn nötig angepasst werden.

6.1.4. Die Verwendung einer Objektivheizung und einer Abdeckung verbessern die Temperaturstabilität

Neben dem Austausch und der Möglichkeit, die Bakterien abzubilden war es essenziell eine stabile Temperatur von 37 °C in dem Probenvolumen zu erreichen. Die Daten in Kapitel 5.1.6 zeigen deutlich, dass sowohl der Objektivheizer und als auch die Abdeckhaube signifikante Einflüsse auf die Temperatur während den Experimenten und zu einer Stabilisierung beitragen. Es konnte festgestellt werden, dass eine Temperatur von 37 °C in der Probenlösung bei Kontakt mit dem Objektiv ohne Objektivheizung kaum erreichbar wäre. Ohne Objektivheizung würde das Objektiv eine ähnliche Funktion wie eine Wärmesenke aufweisen, was zu einer Reduktion der Temperatur der Lösung führen würde. Selbst bei einer eingestellten Temperatur von 45 °C für den Objektivheizer ist es erst möglich, die über das Objektiv verloren gehende Wärme in Experimenten mit einfachem Volumenaustausch zu kompensieren.

Darüber hinaus wird die Bedeutung der Abdeckhaube für den offenen Inkubationseinsatz ersichtlich. Es ist anzunehmen, dass dem Probenvolumen durch die laboreigene Lüftungsanlage und die Verdunstung der Lösung viel Wärme entzogen wurde. In der Folge scheint die Temperatur über längere Zeiträume deutlich stärker zu schwanken. Die Abdeckhaube reduziert die Schwankungen auf weniger als die Hälfte. Dabei wird weiterhin der Zugang zu der Probe sowie den Leitungen zwischen Spritzenpumpe und Einsatz gewährleistet, die während den Experimenten gewechselt werden.

Eine Komplettverkleidung des Mikroskops hätte vermutlich einen noch größeren Effekt auf die Temperaturstabilität. Nichtsdestotrotz wurde sich für eine provisorische Abdeckhaube entschieden, um den Zugang zu laufenden Experimenten zu erleichtern.

6.1.5. Die entwickelten Versuchsprotokolle eignen sich zur Kultivierung von *Staphylococcus aureus* auf dem Mikroskop

Nachdem die Rahmenbedingungen für Experimente mit Bakterien auf dem Mikroskop gegeben sind, muss bestätigt werden, dass die Bakterien in diesem Umfeld überleben. Die Teilungsgeschwindigkeit der Bakterien unter den Versuchsbedingungen (siehe Kapitel 5.2.1) deutet darauf hin, dass das Teilungsverhalten der Bakterien durch die veränderte Umgebung nicht in erheblichem Maße beeinflusst wird. Es ist generell davon auszugehen, dass sich die Teilungsgeschwindigkeit leicht verlangsamt, da die Nährlösung, anders als in einem Inkubationsschüttler, nicht bewegt wird. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die Adhäsion der Bakterien an die Oberfläche mit der Verlangsamung in Zusammenhang steht. Es liegen jedoch keine Erkenntnisse darüber vor, dass *S. aureus* auf den Stimulus besonders reagieren sollte. Es sei darauf hingewiesen, dass die spezifische Adhäsion der Bakterien über Fc-Block in der Form von noch keiner Gruppe durchgeführt wurde. In der Vergangenheit wurde lediglich ein ähnlicher Ansatz mit Blutplasma verwendet, um die Biofilmbildung von *S. aureus* auf Fluoreszenzmikroskopen zu beobachten.¹⁸⁵ Weitere Möglichkeiten zur Immobilisierung der Bakterien werden in Kapitel 6.1.6 diskutiert.

Neben der leicht verlangsamten Teilungsgeschwindigkeit wird allerdings auch deutlich, dass die Bakterien durch die Beleuchtung mit Licht der Wellenlänge von 488 nm negativ beeinflusst werden. Aus den Experimenten mit erhöhter Anregungsleistung des Lasers lässt sich ein deutlicher Einbruch der Teilungsfähigkeit beobachten (Kapitel 5.2.1). Die Forschungsgruppe um Krasenkova hat nachgewiesen, dass Porphyrine und

Flavine, deren Absorption in der Region zwischen 405 nm und 445 nm liegt, möglicherweise die Hauptursache für den inaktivierenden Effekt des blauen Lichts sind.¹⁸⁶ Diese Verbindungen sind auch bei der Anregung mit 488 nm wahrscheinlich von Bedeutung. Nichtsdestotrotz lässt sich nicht vollständig ausschließen, dass die verlangsamte Teilungsgeschwindigkeit in Zusammenhang mit der Expression des PBP2-GFP steht. Dennoch sind die Bakterien in der Lage, sich bis zu 90 Minuten nach Beginn der Messungen auf dem Mikroskop ohne merkliche Einschränkung in dem Einsatz für einfachen Volumenaustausch zu teilen (Kapitel 5.2.1 und folgende).

Im Rahmen der Experimente mit kontinuierlichem Austausch wurde festgestellt, dass sich die persistenten Bakterien nach Entfernen des Antibiotikums noch teilten. Damit teilen sie sich bis zu 24 Stunden nachdem sie auf dem Mikroskop aufgebracht wurden. Es ist zu bedenken, dass sie über den gesamten Zeitraum zur Abbildung belichtet werden. Daher lässt sich ableiten, dass der Einsatz für kontinuierlichen Austausch mit dem verwendeten Protokoll geeignet ist, um Bakterien über einen Zeitraum von mehr als 20 Stunden auf dem Mikroskop zu beobachten.

6.1.6. Wieso mikrofluidische Systeme keine Verwendung fanden

Bei der Vorbereitung von Experimenten mit lebenden Organismen auf dem Mikroskop empfiehlt es sich, auf bereits etablierte Protokolle der Mikroskopie von Mikroorganismen zurückzugreifen. Die Nutzung mikrofluidischer Systeme zur Langzeitabbildung von Bakterien hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dabei werden die Bakterien beispielsweise in mikrometerbreiten Kanälen festgehalten, während frisches Medium kontinuierlich an ihnen vorbeifließt.^{187, 132, 188, 189} oder durch die Kanäle fließt.^{190–192} Alternativ werden Protokolle verwendet, bei denen die Bakterien auf einem Agarose-Gel appliziert werden und anschließend ein Deckglas aufgelegt wird, wodurch die Bakterien gegen das Deckglas gedrückt werden. Die Agarose-Gele können alternativ so verwendet werden, dass nachträglich eine Lösung appliziert werden kann.^{73, 83, 193} Beide experimentellen Ansätze weisen Vorteile auf, sind jedoch mit Nachteilen verbunden, die bedeutende Einschränkungen für die Planung der Experimente hatten.

Die Verwendung von Agarose-Gelen kann eine Applikation einer Lösung auf dem Mikroskop erlauben. Dennoch fanden sie vor allem in dieser Arbeit keine Anwendung, da die Diffusion der nachträglich applizierter Antibiotika und die vorliegende Konzentration schwierig einzuschätzen wäre.^{194, 195} Außerdem könnten die Gele ihre Funktion aufgrund der höheren Temperatur verlieren oder über die Zeiträume austrocknen.^{196, 197} Demgegenüber stehen die Bakterien in den entwickelten Protokollen in direktem Kontakt mit der umgebenden Lösung. Aufgrund der Möglichkeit des Austauschs des Probenvolumens kann das Antibiotikum auf dem Mikroskop appliziert und bei einer Temperatur von 37 °C gemessen werden.

Bei der sogenannten englisch „*Mother machine*“ („Mutter Maschine“), einer der gängigsten Methoden der hochauflösenden Mikroskopie von *Escherichia coli*, werden die Bakterien in Kanäle geladen und abgebildet. Das Nährmedium wird an den Kanälen vorbeigespült, wodurch ein Wachstum der Bakterien in den Kanälen ermöglicht wird. Sie eignet sich exzellent dazu, das Ausgangsbakterium (die „Mutter“) am Ende des Kanals festzuhalten, während die Tochterzellen aus den Kanälen getrieben und weggespült werden.¹⁸⁷ Allerdings gab es zu Beginn des Projektes noch kein bekanntes Analogon für *S. aureus*. Die Teilungsrichtung ändert sich anders als bei *E. coli* bei *S. aureus* mit jeder durchgeführten Teilung. Dieser Mechanismus könnte dazu führen, dass die Bakterien sich im Verlauf ihres Teilungsprozess gegenseitig zerdrücken und dadurch den

physischen Stress erhöhen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Ausdehnung der Bakterien während des Wachstums zu Problemen führt, sofern sie nicht aktiv festgehalten werden. Die Entwicklung eines ähnlichen oder anderen Modells wäre mit einem hohen Risiko verbunden, insbesondere da unser Labor über keine Erfahrung und Ausstattung für den Umgang mit mikrofluidischen Systemen verfügt. Es sei darauf hingewiesen, dass in der vorliegenden Arbeit die Effekte von zellwandsynthesehemmenden Antibiotika untersucht wurden. Daher besteht die Möglichkeit, dass zusätzlicher physischer Stress, wie er oben beschrieben wurde, zu einer zusätzlichen Belastung der Zellwand und somit zu fehlerhaften Ergebnissen führt.

6.2. Beobachtete zelluläre Effekte der Antibiotika auf *Staphylococcus aureus*

Die durchgeführten Experimente waren Teil eines Projektes, das darauf abzielte, die zellulären Effekte der untersuchten Antibiotika einzuordnen und die Rolle der PGS in der Zellteilung von *S. aureus* zu bestimmen (siehe Puls *et al.* 2023)¹⁷⁴. In den folgenden Abschnitten wird die Bedeutung der Daten dieser Arbeit in der Herleitung der Effekte der Antibiotika eingeordnet.

Wie bereits festgestellt wurde, zeigen die Größenverteilungen der Z-Ringe in Folge der Antibiotikabehandlung eine ähnliche Entwicklung (siehe Kapitel 5.2). Dies manifestiert sich ebenfalls in einer vergleichbaren Verteilung der Teilungsphasen in Folge der Antibiotikabehandlung, die mittels einer Membranmarkierung realisiert wurde (aus Puls *et al.* 2023)¹⁷⁴. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente demonstrieren, dass unterschiedliche Veränderungen der Subpopulation zu einer ähnlichen Verteilung der Gesamtpopulation führen können. Die Kontrollexperimente zeigen deutlich, dass sich der Teilungsprozess der Bakterien, ähnlich zu dem Vorgehen von Monteiro *et al.* 2018⁷³, über FtsZ-mCherry und den Z-Ring verfolgen lässt. Ein Vorteil dieser Arbeit besteht darin, dass das beobachtete Verhalten nahe an dem Verhalten der Bakterien in Kultur liegen sollte, da die Nährmedien den Experimenten der Standards für Antibiotikassuszeptibilitätsmessung (basierend auf Veröffentlichungen des CLSI)¹⁵⁴ entsprechen. Die Nicht-Nutzung eines Minimalmediums hat zur Folge, dass Artefakte durch einen gestörten Metabolismus^{198–201} reduziert werden können.

6.2.1. Antibiotika wirken sich unterschiedlich auf die Z-Ringgrößendynamik aus

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle die Glykopeptide Telavancin und Vancomycin das Zusammenziehen des Septums stark beeinflussen. Die Z-Ringgröße nimmt innerhalb weniger Minuten nach Kontakt mit den Glykopeptiden nicht weiter ab (Kapitel 5.2.2). Dies veranschaulicht die signifikante Hemmung des Teilungsprozesses durch die Hemmung der Zellwandsynthese und unterstreicht die essenzielle Rolle von PGS für das Fortlaufen der Teilung von *S. aureus*. Im Vergleich dazu ist der Effekt von Oxacillin deutlich selektiver, was die Teilungsphase der Zellen betrifft (Kapitel 5.2.2). Oxacillin inhibiert das Abschnüren des Septums insbesondere in den frühen Phasen der Zellteilung, während zahlreiche Bakterien in der mittleren und späten Teilungsphase dazu befähigt sind, ihr Septum langsam zu schließen. Des Weiteren ist interessant, dass der Trennungsprozess der Zellen im Assemblierungszustand von den verwendeten Antibiotika nicht stark beeinflusst wurde. Dies lässt darauf schließen, dass die für die

Separation erforderlichen Proteine durch die Hemmung der PGS nur in geringem Maße beeinflusst werden. Die vorliegende Beobachtung steht zudem im Einklang mit der Verteilungsänderung der Phasen, die mit dem Membranfarbstoff charakterisiert wurden (aus Puls *et al.* 2023)¹⁷⁴. Interessant ist hier aber, dass die TPase-Aktivität von PBP1 sehr stark mit dem Trennungsprozess der Zellen in Verbindung gebracht wird.⁷¹
⁵⁷ Dabei wurde das aktive Zentrum des PBP1 mutiert und eine erhöhte Anzahl von Zellen mit vollständigem Septum beobachtet. Leider wurden die Daten nicht in Zusammenhang mit den Zyklusphasen quantifiziert. Neuere, quantifizierte Ergebnisse der gleichen Gruppe mit dem gleichen Bakterienstamm als Grundlage zeigen hingegen, dass eine Mutation des aktiven Zentrums in PBP1 die Häufigkeit von Zellen mit vollständig geschlossenem Septum nicht beeinflusst.²⁰² In einer recht neuen Arbeit einer anderen Gruppe wurde gezeigt, dass ein Verlust der PBP1-Aktivität einen erheblichen Einfluss auf die Bildung, die Form und den Aufbau des Septums in Methicillin-suszeptiblem *S. aureus* (MSSA) hat. Der Verlust hat allerdings keinen Einfluss auf die Trennung der Zellen.⁸⁷ Da die Hemmung der PGS durch Vancomycin, Telavancin und Oxacillin die Trennung der Zelle nicht verhindert hat, unterstützt diese Arbeit die Hypothese, dass weder PBP1-Aktivität noch andere PGS-Aktivität in MSSA einen Einfluss auf den Trennprozess der Tochterzellen hat. Es ist nicht möglich, im vorliegenden Kontext eine valide Aussage darüber zu treffen, ob dies ebenfalls für MRSA gilt.

In Kapitel 6.2.5 wird die Bedeutung der Klassifizierung der Zellen bei der Zugabe der Bakterien auf die Aussagekraft erörtert.

6.2.2. Oxacillin hindert den Rekrutierungsprozess von PBP2 zum Septum

Die von Dr. Jan-Samuel Puls beobachteten Effekte der Antibiotika auf die PBP2-Lokalisierung in *S. aureus*¹⁷⁴ stimmten mit den von Pinho *et al.* 2005⁸⁴ beschriebenen Befunden nach Inkubation mit Oxacillin und Vancomycin überein. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass der Anteil der Bakterien mit septal-lokalisierendem PBP2 in beiden Fällen abnimmt. Darüber hinaus wurde dargelegt, dass bei Kulturen, die mit Vancomycin behandelt wurden, eine geringe Anzahl an Individuen die septale Lokalisierung von PBP2 beibehält, auch wenn keine quantitative Auswertung stattfand. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass die TPase-Aktivität von PBP2 eine signifikante Rolle für dessen Lokalisierung spielt. Der Unterschied der Antibiotika soll in der Bindungstasche des PBP2 liegen, die bei Oxacillin blockiert wird, während dies bei Vancomycin nicht der Fall ist. Es erfolgte jedoch keine weitere Erörterung der Frage, ob PBP2 die Lokalisierung des Proteins zum Septum hin stört oder das Protein aktiv delokalisiert wird.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde neben der Z-Ringgrößendynamik (Kapitel 5.2.2) auch die Lokalisierungsdynamik von PBP2 (Kapitel 5.2.3) untersucht. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Oxacillin vor allem die Rekrutierung des PBP2 zum Septum verhindert. Der Verlust der septalen Lokalisierung wurde lediglich in Konsequenz einer Teilung beobachtet. Anders als bei der unbehandelten Kontrolle wurde nicht beobachtet, dass PBP2 nachträglich septal lokalisiert. Es konnte festgestellt werden, dass ausschließlich Zellen mit septal lokalisiertem PBP2 noch in der Lage waren, sich zu teilen. Dies legt nahe, dass die Lokalisierung des PBP2 zum Septum hin zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Septumbildung bei *S. aureus* erfolgt. Dieser Effekt wird durch die Beobachtung verstärkt, dass die Zellen, die das PBP2 bereits an im Septum lokalisiert haben, zudem die Fähigkeit besaßen, das Septum weiter zu bilden und sich zu teilen. Sie sind dann in Folge der Teilung nicht mehr in der Lage PBP2 zum nötigen Zeitpunkt am Septum zu lokalisieren.

und verweilen in der Anfangsphase der Septumbildung. Dies legt nahe, dass das TPase-Zentrum eine signifikante Rolle bei der Lokalisierung zum Septum spielt. Die Stabilisierung des Proteins in der septalen Ebene wird hingegen durch andere Mechanismen reguliert, wie beispielsweise Protein-Protein-Interaktionen mit anderen in der Bildung des Septums involvierten Proteinen.^{84, 57, 85, 87} Diese Erkenntnisse erklären auch die beobachteten Unterschiede des Effekts von Oxacillin auf unterschiedliche Teilungsphasen (siehe Kapitel 5.2.2 und 6.2.1). In den frühen Phasen der Zellteilung haben Bakterien mit großen Z-Ringen noch kein PBP2 zum Septum rekrutiert. Somit sind sie nicht in der Lage, ihren Z-Ring zusammenzuziehen. Die Rekrutierung des PBP2 wird durch Oxacillin verhindert, sodass die Zellen in den frühen Phasen der Zellteilung steckenbleiben. Solche mit kleineren Z-Ringen befinden sich in späteren Phasen der Septumbildung und haben PBP2 zu großen Teilen bereits zum Septum rekrutiert bevor sie in Kontakt mit Oxacillin kommen. In der Folge kann das Septum weiter geschlossen werden und die Zellen teilen sich. Damit führt die gehemmte Rekrutierung des PBP2 zum Septum final zum Wachstumsarrest der Bakterien.

6.2.3. Einfluss von Vancomycin, Telavancin und Oxacillin auf den Teilungszyklus von *Staphylococcus aureus*

Auf Grundlage der in dieser Arbeit präsentierten Daten (Kapitel 5.2.2 und 5.2.3) und Zusammenhängen (Kapitel 6.2.1 und 6.2.2) sowie Daten und Zusammenhängen seiner eigenen Arbeit (Puls *et al.* 2023¹⁷⁴, Puls, J.-S. 2024¹⁷⁵) gelang es Dr. Jan-Samuel Puls, das folgende Modell¹⁷⁴ aufzustellen.

Schließlich lässt sich aus den gesammelten Daten folgern, dass alle drei zellwandsynthesehemmenden Antibiotika, Vancomycin, Telavancin und Oxacillin, die Zellteilung stoppen (siehe Abb. 50). Die Glykopeptide inhibieren die TGase- und TPase-Reaktionen der Proteine, die mit dem frühen Divisom assoziiert sind,^{73, 57, 202} indem sie das Substrat für diese Reaktionen binden. In der Folge wird die erste Abschnürphase des Septums unterbunden. Oxacillin hingegen inhibiert insbesondere die Rekrutierung von PBP2 zum Septum, indem das aktive TPase-Zentrum gebunden wird. In der Konsequenz führt dies dazu, dass das Beta-Laktam die Zelle daran hindert die zweite Abschnürphase zu erreichen. In dieser Phase ist die Anwesenheit von PBP2 am Septum essenziell für das Abschnüren des Septums. Analog zu der ersten Abschnürphase hemmen die Glykopeptide die Zellwandsynthesereaktionen, indem sie das Substrat binden. Infolgedessen ist die PBP2-Aktivität auch gehemmt, was ein Abschnüren des Septums verhindert. Außerdem verringert Oxacillin die Geschwindigkeit mit der die zweite Abschnürphase stattfindet, indem es die TPase-Aktivität hemmt. Die vorliegende Untersuchung kommt damit zu dem Schluss, dass die Hemmung der Zellteilung ein zentraler Effekt von zellwandsynthesehemmenden Antibiotika ist. Diese Erkenntnis bildet die Grundlage für weitere Forschungsarbeiten zu Antibiotika, die die Zellwandsynthese beeinflussen.

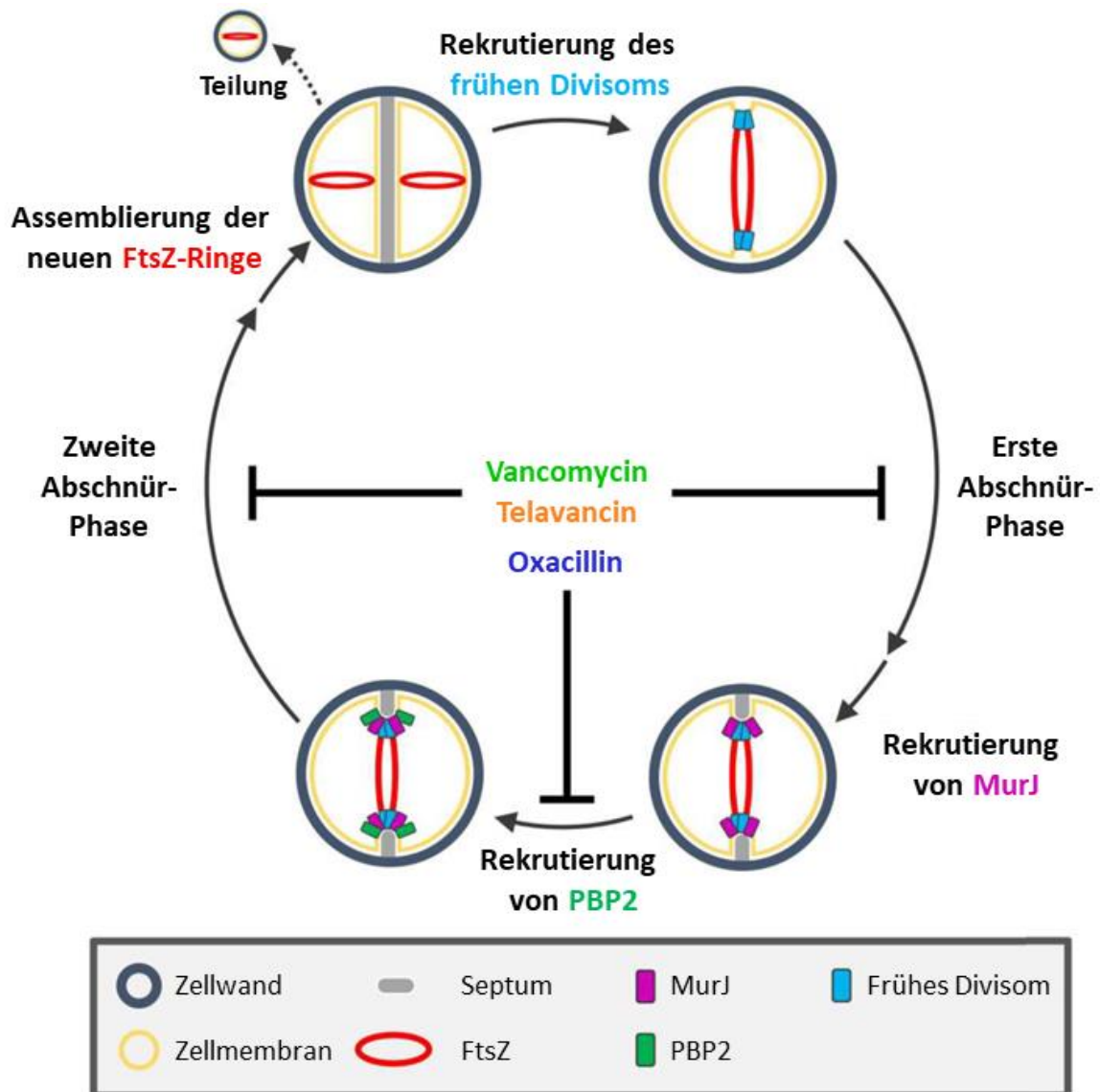


Abb. 50: Modell für die Hemmung des Teilungszyklus durch die zellwandsynthesehemmenden Antibiotika Vancomycin, Telavancin und Oxacillin. Hergeleitet von Dr. Jan-Samuel Puls. (Modifiziert von Puls *et al.* 2023)¹⁷⁴

6.2.4. Die optimierte Auswertung ist effizienter und bildet die Gesamtpopulation besser ab

Die präsentierte Optimierung gestattet die Auswertung und Analyse einer vergleichbaren Anzahl von Bakterien in einem Fünftel der Zeit (Kapitel 5.2.2). Aufgrund des Aufbaus der Auswertung und der erst anschließenden Klassifizierung, können signifikante Teile der Auswertung automatisiert werden. Die Auswertung erlaubt demzufolge eine Parallelisierung der Prozesse und infolgedessen einen erhöhten Durchsatz von Daten. Da die Daten erst anschließend klassifiziert werden, ergibt sich in der anteiligen Verteilung der Klassen auch eine zuvor beobachtete Verteilung der Klassen in der Gesamtpopulation (Puls *et al.* 2023).¹⁷⁴ Die Folge dessen ist, dass die Gesamtpopulation besser abgebildet wird. Allerdings werden dadurch der Assemblierungszustand und die späte Teilungsphase unterrepräsentiert. Für eine statistische Auswertung müssten

demzufolge insgesamt mehr Zellen ausgewertet werden. Ein weiteres Problem stellt die Segmentierung dar. Für eine vollautomatisierte Auswertung von Mikroskopdaten, welche *S. aureus* oder andere Kokken zeigen, ist ein solider Segmentierungsalgorithmus erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wurde der eHooke-Algorithmus¹⁶⁹ zur Segmentierung zweidimensionaler Datensätze genutzt, um eine Segmentierung zu Beginn der Messung durchzuführen. Es ist jedoch festzustellen, dass dieses Modell gewisse Limitierungen aufweist. So ist eHooke nicht in der Lage größere Gruppen von Bakterien gut zu segmentieren. Dies kann eine unerwünschte Voreingenommenheit der Daten zur Folge haben.

Obwohl die Anzahl der Zellen in den genannten Klassen geringer ist, lässt sich festhalten, dass die aus der optimierten Auswertung resultierenden Daten das Verhalten der Zellen adäquat abbilden. Die Auswertung profitiert in allen Fällen davon, die Gesamtzahl weiter zu erhöhen. Darüber hinaus ist festzustellen, dass die Auswertung in hohem Maße von der Verwendung der Dekonvolution mittels „Huygens Professional“ (Scientific Volume Imaging B.V.) profitiert (siehe Kapitel 5.1.2). Die ursprüngliche Auswertung könnte alternativ auch mit der Dekonvolution mittels „Huygens Professional“ durchgeführt werden.

6.2.5. Notwendigkeit der Klassifizierung zur differenzierten Wirkungserfassung

Die optimierte Auswertung ermöglichte zudem die Erfassung des Effekts der Klassifizierung auf die resultierenden Daten, da die erhaltenen Daten die Gesamtpopulation besser reflektieren. Daher bestand die Möglichkeit die Daten ohne Klassifizierung einer statistischen Auswertung zu unterziehen (Kapitel 5.2.2).

Es konnte festgestellt werden, dass die fehlende Klassifizierung die Daten in Bezug auf die spezifischen Effekte von Oxacillin und Vancomycin weniger aussagekräftig macht. Nur durch die Kombination der zeitaufgelösten Experimente, bei denen einzelne Bakterien verfolgt werden können, mit einer Klassifizierung zu Beginn des Experiments lassen sich die Unterschiede in der Dynamik der untersuchten Antibiotika herausarbeiten. Ohne die Klassifizierung könnten alternativ Experimente mit kultivierten Bakterien nach gegebenen Inkubationszeiten abgebildet werden. Diese würden besseres Signal aufweisen, da nicht auf das Überleben der Bakterien geachtet werden müsste. Die Aussagekraft der Daten resultiert folglich aus der zeitaufgelösten Natur sowie der durchgeführten Klassifizierung.

6.3. Einblicke in die Persistenz von *Staphylococcus aureus*

Neben den unmittelbar auftretenden Effekten der Antibiotika gibt es weitere interessante Aspekte, die mit den entwickelten Methoden untersucht werden können. Die Persistenz von Bakterien stellt ein Phänomen dar, welches mit vielen unbekannten Mechanismen verbunden ist, da sie in behandelten Populationen extrem selten auftritt und nicht genetisch codiert ist.^{127, 137} In diesem Kontext sollte anfangs der Einsatz für einfachen Volumenaustausch genutzt werden. Im Rahmen der Untersuchung sollten Langzeitbeobachtungen der Bakterien durchgeführt werden. Ziel war es, das Verhalten der persistenten *S. aureus* erstmals zum Zeitpunkt der Zugabe des Antibiotikums zu dokumentieren und analysieren. In den nachfolgenden Kapiteln erfolgt eine Auseinandersetzung mit den Limitationen des Einsatzes für einfachen Volumenaustausch. Zudem erfolgt eine Einordnung der Daten der erfolgreichen Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch in einen übergeordneten Kontext.

6.3.1. Ein kontinuierlicher Volumenaustausch stabilisiert die Sterberate

Die Lyse der Bakterien und damit der Zelltod bei Behandlung von Bakterien mit Beta-Laktamen wird in Zusammenhang mit der geschwächten Zellwand in Verbindung gebracht. Es wird vermutet, dass eine Hemmung der Zellwandsynthese autolytische Enzyme aktiviert oder das Ungleichgewicht der PGS und PG-Hydrolyse die Zellwandstruktur beeinträchtigt. Die vorliegende Beeinträchtigung soll demnach dazu führen, dass die Zellwand dem osmotischen Druck nicht weiter standhalten kann, was wiederum zur Folge hat, dass die Bakterien aufreißen.^{110, 203, 14}

Eine erste Versuchsreihe mit *S. aureus* über mehr als 10 Stunden Beobachtungszeitraum nach Zugabe des Oxacillins wurde mit dem Einsatz für einfachen Volumenaustausch durchgeführt (siehe Kapitel 5.3.1). In der Regel wäre ein sigmoidales Verhalten der Kurve nach Zugabe des Antibiotikums zu erwarten. Wenige Minuten nach Zugabe lysieren viele Bakterien der Gesamtpopulation, während andere etwas langsamer lysieren und schließlich die persistenten Bakterien überleben.¹¹⁰ Die Daten weisen darauf hin, dass der Anteil lysierter Bakterien nach der Zugabe des Oxacillins in einer scheinbar zufälligen Weise ansteigt. Die Daten wurden darüber hinaus nach der Zelldichte aufsteigend eingefärbt, jedoch ist keine signifikante Korrelation erkennbar. Für die chaotisch ansteigende Sterberate der Bakterien in der unbewegten Lösung existieren mehrere mögliche Ursachen. In einer unbewegten Lösung kann sich der osmotische Druck gleichmäßig auf die Zellwand eines nahezu runden Bakteriums verteilen. Hieraus resultiert eine gleichmäßige Belastung der Zellwand. In einer solchen Situation wäre ein asymmetrischer Impuls erforderlich, um ein Ungleichgewicht einzuführen und die Lyse zu initiieren. Dieser Effekt könnte zudem durch die mutmaßlich begünstigte Bildung eines Biofilms^{204, 205} verstärkt werden, da dessen Zusammensetzung potenziell Fluktuationen und Konvektion unterbindet.²⁰⁶ Außerdem könnten Biofilme die Diffusion der Antibiotika zu den Bakterien hin stören.²⁰⁷ Die Bildung solider Biofilme konnte unter vergleichbaren Bedingungen bereits in einem Zeitraum von weniger als 10 Stunden beobachtet werden.^{208, 209}

Die Hypothese, dass die eingeschränkte Mobilität der Lösung ursächlich für das chaotische Sterbeverhalten ist, diente als Grundlage für die Entwicklung eines Protokolls, das einen kontinuierlichen Volumenaustausch

vorsah. Erste Experimente mit dem geschlossenen Einsatz ergaben jedoch, dass aufgrund der leicht erhöhten Temperatur von circa 37 °C und der konstanten Flussgeschwindigkeit Gaseinschlüsse an der Kanülenöffnung, durch die die Lösung eintritt, entstehen (siehe Kapitel 5.3.1). Diese Einschlüsse stören die Experimente und können die Bakterien von der Glasoberfläche ablösen. Daher wurde der offene Inkubationseinsatz für Experimente mit kontinuierlichen Volumenaustausch hergestellt. Die entstehenden Gasblasen können ungehindert entweichen und die Lösung wird kontinuierlich gepumpt, um der Austrocknung der Lösung vorzubeugen.

Ein kontinuierlicher Lösungsstrom über die Bakterien resultierte in der erwarteten sigmoidalen Sterbekurve. Eine eingehende Untersuchung der Ursache für die Stabilisierung wurde nicht vorgenommen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich aufgrund der fließenden Lösung kein Biofilm ausbilden kann, der die Bakterien wie beschrieben stabilisieren könnte. Die Ursache für das Fehlen einer zweiphasigen Sterbekurve¹²⁹ ist vermutlich auf den Messzeitraum sowie die Präzision der Auswertung zurückzuführen. Das Ziel der Experimente und der Auswertung war es, zu zeigen, dass die Bakterien eine systematische und gleichmäßige Lyse aufweisen. Zudem sollte aufgezeigt werden, dass bereits lange vor 12 Stunden nach Beginn des Experiments ein Plateau von über 90 % lysierten Zellen beobachtet werden kann. Die Auswertung ist nicht darauf ausgerichtet, einzelne Zellen aus Tausenden zu zählen, was sich auch in einer relativen SD von bis zu 10 % widerspiegelt.

6.3.2. Die überlebenden Bakterien befinden sich in einer ähnlichen Teilungsphase

Der Anteil der überlebenden Bakterien, der 12 Stunden nach der Zugabe von Oxacillin festgestellt wurde, entspricht der in der Literatur dokumentierten Größenordnung¹²⁷. In der vorliegenden Arbeit werden persistente *S. aureus* charakterisiert, die nach dem Auswaschen des Oxacillins nach mehr als 12 Stunden als überlebende Bakterien aufgrund ihrer anschließenden Teilung erkannt wurden. Die Vermessung der Z-Ringgröße (siehe Kapitel 5.3.3) ist allerdings davon abhängig, dass das Signal des Z-Rings sichtbar ist und der Ring sich mit seinem größten Durchmesser in der Fokalebene befindet. Andere Störeinflüsse, wie überlappende Signale benachbarter Bakterien, führen dazu, dass die Daten zur Vermessung des Z-Rings nicht geeignet sind. Diese Umstände erklären, wieso nur maximal 21 Z-Ringe der 74 überlebenden Bakterien vermessen werden konnten (siehe Kapitel 5.3.3). Zudem nimmt die Anzahl der auswertbaren, sterbenden Zellen nach der Lyse des Großteils der Bakterien rapide ab. Nach etwa 4 Stunden sinkt die Zahl der auswertbaren Zellen auf weniger als 30 %, und nach 10 Stunden auf weniger als 15 %. Nichtsdestotrotz weist die vermessene Z-Ringgröße der überlebenden Zellen auf einen Trend hin, dem zufolge sich die persistenten *S. aureus*-Zellen wahrscheinlich in einer ähnlichen Teilungsphase befinden. Die geringe statistische Größe der auswertbaren Daten führte dazu, dass anschließend der Teilungszeitraum der überlebenden und nicht überlebenden Bakterien untersucht wurde.

6.3.3. Persistierende *Staphylococcus aureus*-Zellen müssen sich vermutlich teilen, um zu überleben

Aufgrund der unzureichenden Qualität der zu Beginn der Messung erhobenen Daten der persistierenden *S. aureus*-Zellen wurde die Entscheidung getroffen, den Teilungszeitraum der Bakterien zu untersuchen, da dieses Merkmal eine bessere Erkennbarkeit aufweist. Dazu wurden Intervalle bestimmt, in denen sich die Bakterien ein letztes Mal in dem beobachteten Zeitraum bis 12 Stunden nach der Zugabe von Oxacillin von ihren Schwesterzellen trennen (siehe Kapitel 5.3.4). Die in Kapitel 4.4.2 beschriebene Korrektur für die Messverzögerung ist in diesem Fall nur möglich, da die Verzögerung während der Messung des Rasters signifikant im Vergleich zum Messintervall und gut definiert ist. Die erhaltenen Daten erlauben demzufolge lediglich die Ableitung eines Zeitraums, in dem eine Teilung der Bakterien stattgefunden hat. Es lässt sich ableiten, dass die überwiegende Anzahl der Bakterien eine Teilung erst nach Zugabe des Oxacillins durchlaufen haben. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Auswertung auf konservativen Annahmen beruht und es durchaus möglich ist, dass sich alle persistenten Bakterien nach Kontakt mit dem Antibiotikum Teilen müssen, um zu überleben. Aus den Kapiteln 6.2.1 und 6.2.2 wird deutlich, dass nur solche Bakterien in der Lage sind ihr Septum zusammenzuziehen, die eine Phase erreichen, zu der PBP2 bereits zum Septum rekrutiert wurde. Wenn sich diese Bakterien in einer späten Phase befinden, sind sie womöglich auch in der Lage, sich im Anschluss zu teilen.

Die vorliegende Arbeit bestätigt somit teilweise die Hypothese, dass sich die persistenten Bakterien zum Zeitpunkt der Antibiotika-Zugabe in einer spezifischen Teilungsphase befinden müssen. Das haben bereits Holzhofer *et al.* 1985 in synchronisierten Kulturen beobachtet.¹³⁷ Es scheint nicht erforderlich zu sein, dass sich die Zellen in einem präzise definierten Zeitraum einer Teilungsphase befinden müssen, wie es der Anteil der überlebenden Subpopulation suggeriert. Vielmehr lässt sich schlussfolgern, dass die Bakterien eine Phase nach der Teilung durchlaufen müssen, um zu überleben.

Zudem wurde bestätigt, dass die persistierenden Bakterien in einen Zustand übergehen, in dem sie nicht mehr wachsen.^{130–136} Diese Entwicklung zeigt sich sowohl in den Z-Ringdynamiken (Kapitel 5.3.3 und 6.3.2) als auch in den Teilungszeiträumen (Kapitel 5.3.4). Sie stützt die Hypothese eines reduzierten Metabolismus, der als Faktor beschrieben wurde, der Toleranz induzieren und mit Persistenz in Verbindung gebracht wird.¹³¹ Nach dem Auswaschen des Antibiotikums wurde eine erneute Zellteilung der Bakterien beobachtet, was auf eine Erholung des Metabolismus hinweist.

6.3.4. Beta-Laktam-induzierter Zelltod durch PG-Hydrolasen

Die Hypothese, dass die Autolyse infolge des Beta-Laktam-induzierten PGS-Stopps durch PG-Hydrolasen erklärt wird^{14, 110, 203}, wird durch diese Arbeit gestützt. Die Experimente mit einfachem Volumenaustausch sowie die Untersuchung der Z-Ringgröße (siehe Kapitel 5.2.2) und der Z-Ringdaten mit kontinuierlichem Austausch (Kapitel 5.3.3) zeigen, dass sich Bakterien in mittleren bis späten Teilungsphasen noch teilen. Ein signifikanter Anteil der Zellen, die später lysieren, durchläuft nach Zugabe des Antibiotikums ein letztes Teilungsereignis. Anschließend wird die Rekrutierung von PBP2 unmöglich, und die betreffenden Zellen bleiben in der frühen Teilungsphase stecken (siehe Kapitel 6.2.1 und 6.2.2).

In der Folge besteht die Möglichkeit, dass die PG-Hydrolasen die Zellwand weit genug schwächen, sodass sie schließlich unter der Last des osmotischen Drucks lysieren. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings kein direkter Nachweis erbracht werden, dass die Zellen aufgrund ihrer PG-Hydrolase-Aktivität lysieren. Es wäre jedoch durchaus plausibel, dass die PG-Hydrolasen, die mit der Umformung und Ausdehnung der Zelle in Verbindung gebracht werden^{106, 210}, exprimiert werden und die Zellwand abbauen.

6.3.5. Persistierende Bakterien überleben nur durch Zufall

Nach der Zugabe von Oxacillin teilen sich 84 % der persistenten *S. aureus*-Zellen innerhalb der ersten 35 Minuten. Allerdings wurde auch beobachtet, dass sich 11 % der überlebenden Bakterien zu einem späteren Zeitpunkt teilten und dennoch überlebten. Diese Ereignisse implizieren, dass der Mechanismus der Persistenz zeitlich entkoppelt ist und potenziell einem zufallsbedingten Prozess folgt.

Die Mehrheit der persistierenden *S. aureus*-Zellen (circa 95 %) teilte sich nach der Zugabe von Oxacillin. Dies lässt darauf schließen, dass die Bakterien eine Teilungsphase nach der Trennung erreichen müssen, wenn sie mit Oxacillin in Kontakt kommen. Interessanterweise teilten sich auch etwa 66 % der Zellen, die letztlich starben, nach dem Kontakt mit Oxacillin. Dies weist darauf hin, dass die Zellteilung zwar eine notwendige Voraussetzung für die Persistenz darstellt, jedoch nicht als hinreichende Bedingung allein ausreicht, um das Leben der Zellen zu gewährleisten.

Die Beobachtungen im Hinblick auf die Teilungszeiträume und die Z-Ringdynamik legen nahe, dass die überlebenden Bakterien nach der Behandlung mit Oxacillin nicht weiterwachsen, bis das Antibiotikum ausgewaschen wird. Dies lässt darauf schließen, dass der Metabolismus der Bakterien in dieser Phase eine signifikante Verlangsamung erfahren hat. Diese Verlangsamung könnte als eine Reaktion auf einen initialen Stressimpuls durch Oxacillin interpretiert werden, der eine Verlangsamung der bakteriellen Teilung bewirkt. Ein verlangsamtes Wachstum der Bakterien wird in der Literatur häufig als Schlüsselmechanismus für die Induktion der Persistenz angesehen.^{130–136}

Falls als hinreichende Voraussetzung angenommen wird, dass die Bakterien sich in einem Zustand befinden müssen, in dem nur eine geringe Aktivität der PG-Hydrolasen zum Abbau der Zellwand vorliegt, könnte daraus eine Hypothese zur Persistenz abgeleitet werden (siehe Abb. 51). Salamaga *et al.* 2021²¹¹ konnten bereits zeigen, dass eine Stasis in *S. aureus* ausgelöst wird, wenn sowohl die PGS- als auch die PG-Hydrolyse-Aktivität verloren gehen.

Es ist plausibel, dass die Bakterien sich unmittelbar nach der Zelltrennung in einer Übergangsphase befinden müssen, die einem metabolisch statischen Zustand gleicht, um zu überleben. In diesem Zustand werden die PG-Hydrolasen, die mit der Zelltrennung assoziiert sind, abgebaut, während die Aktivität jener PG-Hydrolasen, die mit dem Zellwachstum und der Alterung der Zellwand verknüpft sind, üblicherweise ansteigt. Wenn es gelingt, den Anstieg der PG-Hydrolase-Aktivität zu verzögern oder zu verhindern, könnte die Zelle in diesem stabilen Zustand verharren, ohne dass die Hydrolasenaktivität zu Zellschäden führt. Ein geeigneter Stressfaktor scheint das Überleben der Zellen zu begünstigen, indem er den Zeitraum verlängert, den die Zellen benötigen, um diesen stabilen Zustand zu durchlaufen. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Überlebensmechanismus persistenter Zellen eng mit der Regulation der PG-Hydrolase-Aktivitäten verknüpft ist.

Es lässt sich annehmen, dass die Wahrscheinlichkeit, diesen stabilen Zustand zu erreichen und darin zu verbleiben, relativ gering ist, was die geringe Überlebensrate in den Experimenten erklärt. Man könnte diesen stabilen Zustand metaphorisch mit einer kleinen Potentialsenke vergleichen, deren Tiefe von den Aktivitätsniveaus der PG-Hydrolasen abhängt. Bei schnellem Zellwachstum laufen die Aktivitätsniveaus zusammen und überlappen zunehmend, während sie sich bei langsamem Wachstum auseinander bewegen. Wenn Stressfaktoren die Toleranz der Zellen fördern, vertieft sich diese Potentialsenke, da sich die Aktivitätsniveaus der PG-Hydrolasen weiter auseinanderbewegen, wodurch sie Zellen mit höherer Wahrscheinlichkeit in diesem stabilen Zustand verbleiben.

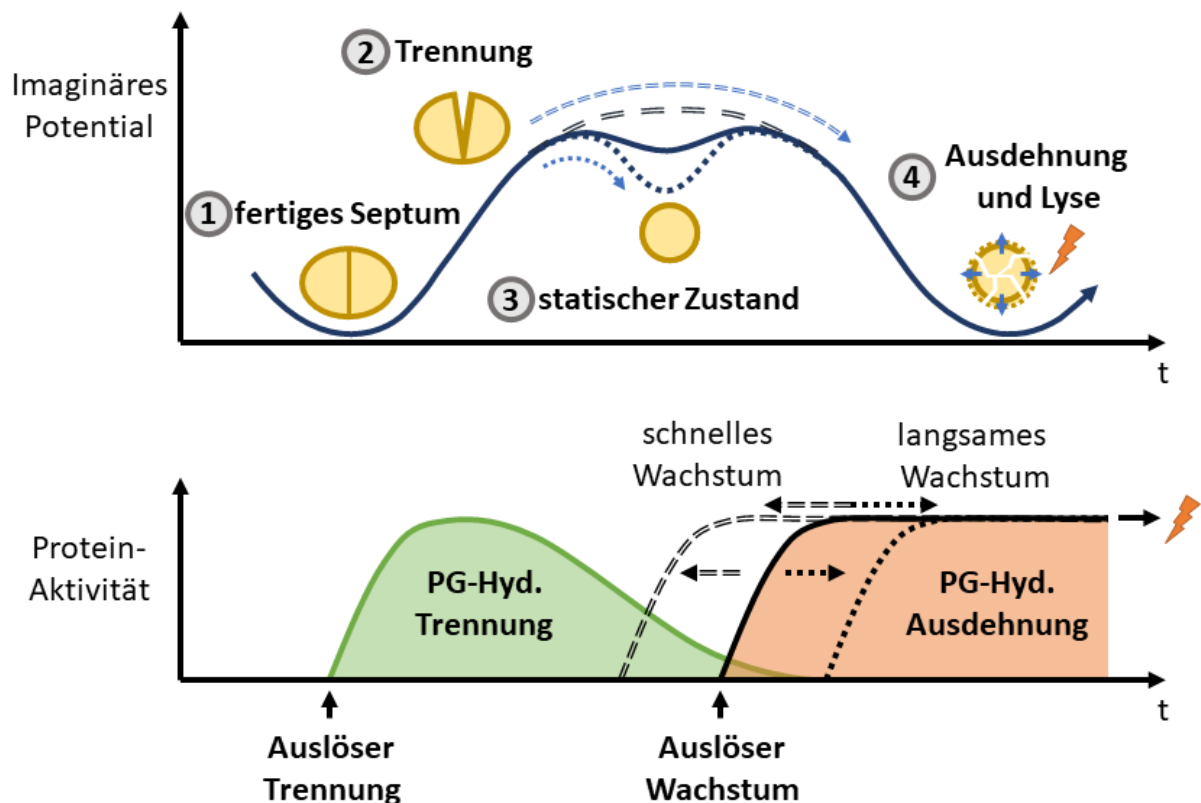


Abb. 51: Modell zur Erklärung des geringen Anteils der persistenten *S. aureus*-Zellen. Eine notwendige Voraussetzung für das Überleben der *S. aureus*-Zellen ist, dass sie sich vor der Trennung der Tochterzellen in einem Zustand mit vollständig gebildetem Septum befinden (1). In dieser Phase wird die Expression von PG-Hydrolasen (PG-Hyd.) aktiviert, die für die Zelltrennung verantwortlich sind. Anschließend trennen sich die Bakterien infolge der erhöhten PG-Hydrolase-Aktivität (2), woraufhin die entsprechenden Enzyme wieder Abgebaut werden. Nach einer gewissen Zeit wird durch einen bislang unbekannten Mechanismus das Zellwachstum erneut angeregt (4), was eine erneute Expression von PG-Hydrolasen zur Zellwandexpansion erforderlich macht. Diese Aktivität führt schließlich zur Lyse der Zellen. Da für das Überleben eine möglichst geringe Aktivität der PG-Hydrolasen vorteilhaft ist, sollten sich die Bakterien idealerweise in einem Zustand (3) befinden, in dem kaum aktive PG-Hydrolasen vorhanden sind. Die Geschwindigkeit des Zellwachstums beeinflusst dabei den Zeitpunkt, zu dem die erneute Expansion eingeleitet wird.

7. Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines experimentellen Aufbaus, eines Versuchsprotokolls und einer Auswertungsmethode, die zeitaufgelöste fluoreszenzmikroskopische Experimente an *Staphylococcus aureus* sowohl über kurze als auch über lange Zeiträume ermöglicht. Dabei lag der Schwerpunkt darauf, die experimentellen Bedingungen auf dem Mikroskop an etablierte Parameter der bakteriellen Zellkultur anzupassen. Mit dem entwickelten Protokoll sollten erste Effekte zellwandsynthesehemmender Antibiotika sowie längerfristige Phänomene wie die Persistenz untersucht werden.

Die fluoreszenzmikroskopischen Experimente konnten erfolgreich etabliert werden und ermöglichten Einblicke in die zellulären Auswirkungen zellwandsynthesehemmender Antibiotika auf *S. aureus*. Insbesondere Experimente mit einfachem Volumenaustausch erwiesen sich als geeignet, frühe Effekte der Antibiotika Vancomycin, Telavancin und Oxacillin sichtbar zu machen. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellwandsynthese essenziell für das Abschnüren des Septums ist. Darüber hinaus wurde die hohe Wirksamkeit von Vancomycin und Telavancin hinsichtlich der Hemmung der Zellwandsynthese bestätigt, während Oxacillin primär den Rekrutierungsprozess des PBP2 zum Septum hin und die TPase-Aktivität hemmt.

Darüber hinaus konnten Experimente durchgeführt werden, in deren Rahmen persistente Bakterien über nahezu 24 Stunden kontinuierlich beobachtet wurden. Erstmals war es möglich, persistente *S. aureus*-Zellen vom Zeitpunkt der Antibiotikazugabe bis zur erneuten Zellteilung nach Auswaschen des Antibiotikums zu verfolgen. Aufgrund technischer Einschränkungen und der Natur persistenter Bakterien war es jedoch nur möglich, eine begrenzte Menge an Daten zu ihrem Verhalten und ihren Besonderheiten zu erfassen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Teilungsphase und die anschließende Zelltrennung eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung von Persistenz darstellen könnten. Eine Hypothese, die sich aus den Beobachtungen ableitet, ist, dass das Überleben persistenter Zellen davon abhängt, ob sie nach der Teilung in einen metabolisch statischen Zustand übergehen – ein Prozess, der vermutlich von zahlreichen weiteren Faktoren beeinflusst wird.

Zur weiteren Charakterisierung persistenter *S. aureus*-Zellen und der durch Beta-Laktame induzierten Autolyse sind zusätzliche Datensätze erforderlich. Insbesondere eine detaillierte Analyse der Faktoren, die letztlich zum Zelltod führen, könnte wesentlich zum Verständnis des Persistenzmechanismus beitragen. Weitere fluoreszenzmikroskopische Langzeitexperimente, wie sie im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden, würden die Validität der bisherigen Beobachtungen erhöhen.

Die in Kapitel 6.3.5 aufgestellte Hypothese bedarf einer eingehenden Überprüfung. Hierbei könnten insbesondere Informationen zur Expression und Aktivität von PG-Hydrolasen in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase wichtige Erkenntnisse liefern. Ebenso könnten gezielte Inaktivierungen spezifischer PG-Hydrolasen Hinweise darauf geben, ob diese Enzyme eine Schlüsselrolle im Persistenzmechanismus spielen.

Zudem eröffnet sich die Möglichkeit, ergänzende Experimente mit Glykopeptiden durchzuführen, um das Verhalten persistenter *S. aureus*-Zellen zu erforschen. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Teilungsfähigkeit auch unter Vancomycin-Behandlung nicht vollständig inhibiert ist. Sollte sich bestätigen, dass vornehmlich teilende Zellen persistieren, würde dies die Hypothese stützen, dass eine erfolgreiche Teilung eine Voraussetzung für das Überleben unter Behandlung mit zellwandsynthesehemmenden Antibiotika darstellt. Da Glykopeptide das Abschnüren des Septums vollständig blockieren, könnte sich der Zeitraum der

Teilungsaktivität überlebender Zellen zusätzlich verringern, was die hier formulierte Hypothese weiter unterstützen würde.

8. Anhang

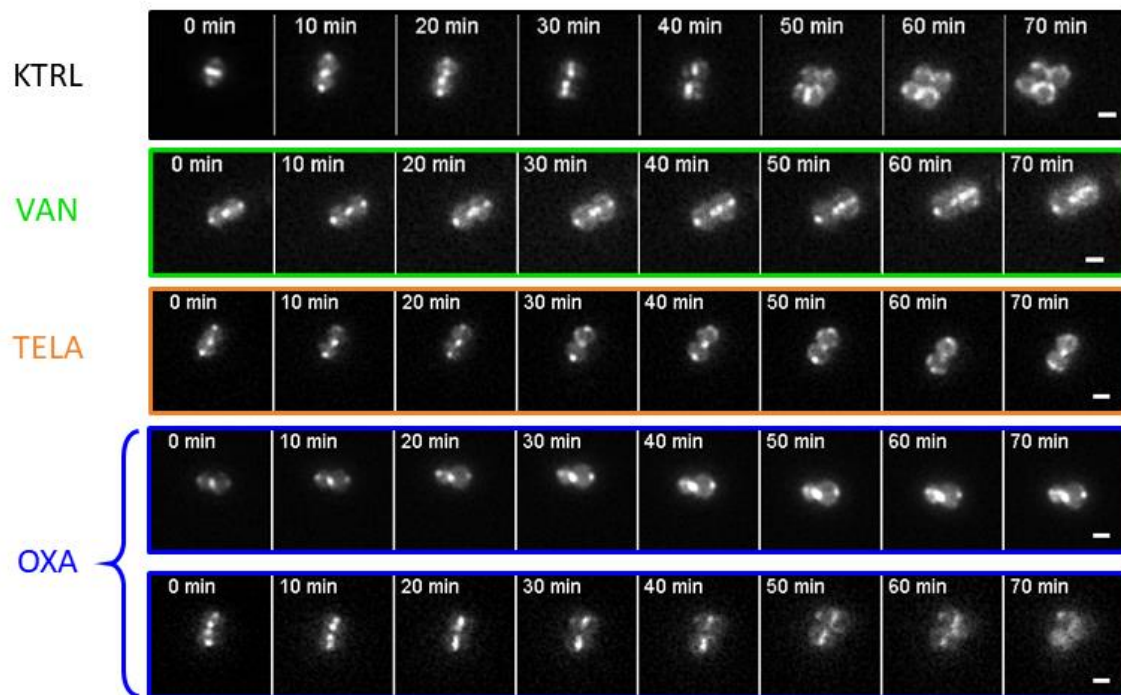


Abb. 52: Beispiele für zeitaufgelöste Experimente mit FtsZ-mCherry und einfachem Volumenaustausch. Negativkontrolle (KTRL) und unter Zugabe von Vancomycin (VAN), Telavancin (TELA) und Oxacillin (OXA). Gezeigt sind FtsZ-mCherry-exprimierende *S. aureus*-Zellen. Skala 1 μm . (Daten in KTRL und CAN aus Puls et al, 2023)¹⁷⁴

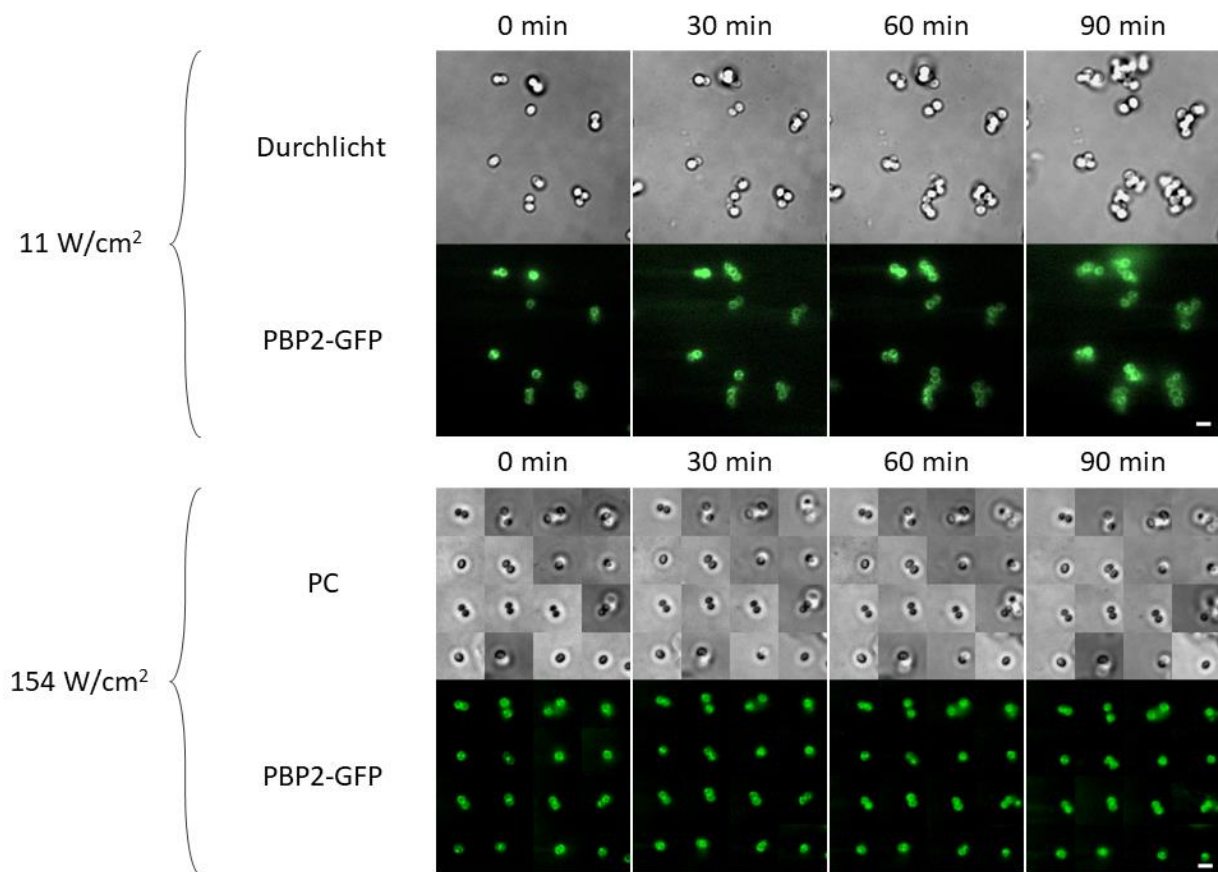


Abb. 53: Repräsentative Beispiele für den Effekt erhöhter Leistungsdichte bei Beleuchtung mit 488 nm. Mikrogramme mit repräsentativen Bakterien im Durchlicht-, PC- und PBP2-GFP-Kanal über 90 Minuten. Aufgenommen jeweils mit einer Leistungsdichte von 11 W/cm^2 bzw. 154 W/cm^2 . Skala $2 \mu\text{m}$.

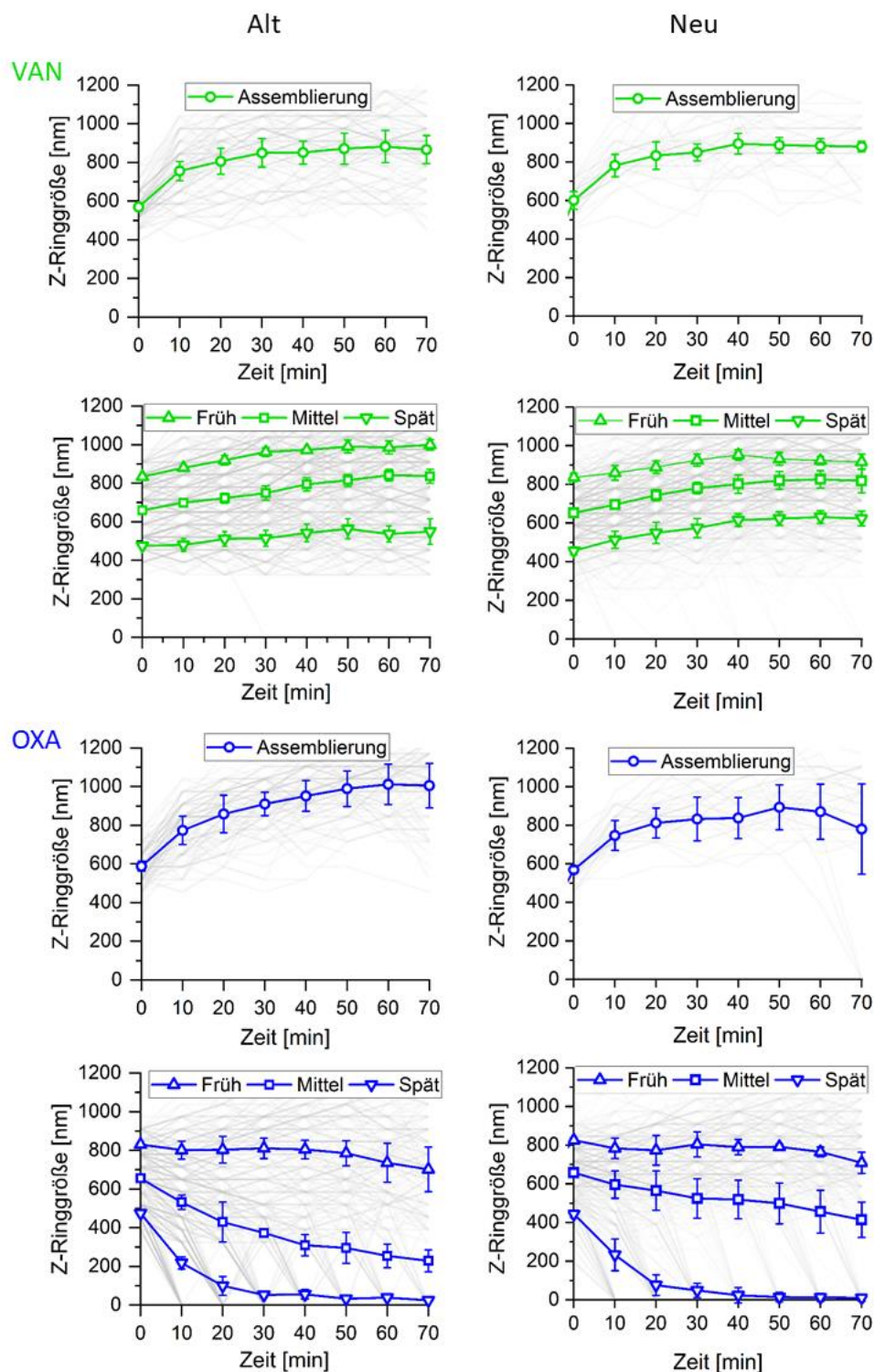


Abb. 54: Vergleich der alten mit der neuen Auswertemethode für Vancomycin und Oxacillin. Abgebildet sind die Mittelwerte der Z-Ringgrößen $\pm$ SD. $n > 28$ Zellen wurden in der alten Auswertung je Replik, Klasse und Antibiotikum ausgewertet. $n > 5$, $n > 26$, $n > 34$ und $n > 17$ Zellen wurden jeweils für jedes Replikat des Assemblierungszustandes und der frühen, mittleren und späten Teilungsphase betrachtet. Insgesamt wurden ausgewertet: VAN(Neu, Assemblierung) – 30; VAN(Neu, Früh) – 120; VAN(Neu, Mittel) – 229; VAN(Neu, Spät) – 102; OXA(Neu, Assemblierung) – 31; OXA(Neu, Früh) – 75; OXA(Neu, Mittel) – 173; OXA(Neu, Spät) – 101. (alte Graphen modifiziert nach Puls et al. 2023¹⁷⁴)

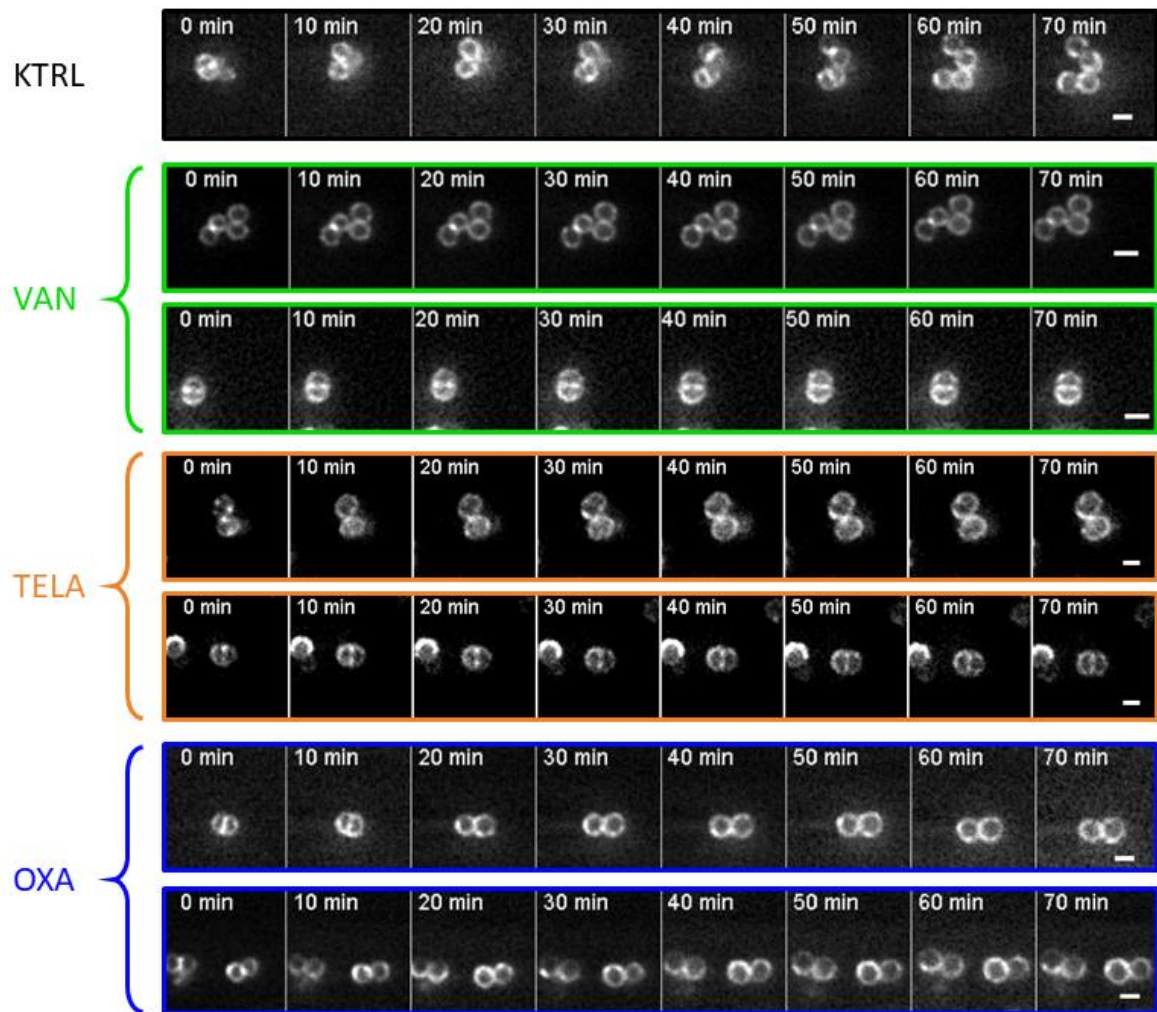


Abb. 55: Beispiele für zeitaufgelöste Experimente mit PBP2-GFP-Expression und einfachem Volumenaustausch. Abgebildet ist PBP2-GFP. Unbehandelte Kontrolle (KTRL) und unter Zugabe von Vancomycin (VAN), Telavancin (TELA) und Oxacillin (OXA). Skala 1 μm . (Mikrogramme in KTRL, VAN und OXA modifiziert nach Puls et al, 2023)¹⁷⁴

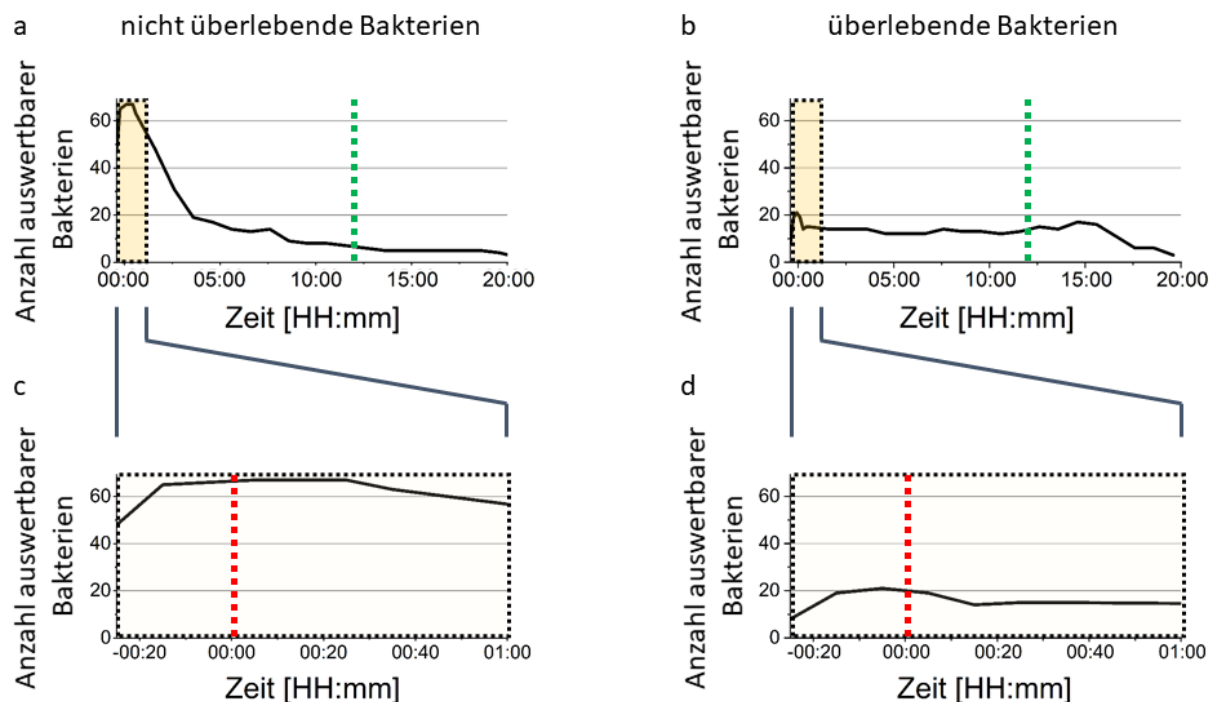


Abb. 56: Anzahl auswertbarer Bakterien in Abb. 48 über den Verlauf des Experiments. Anzahl der auswertbaren nicht überlebenden (a) und überlebenden (b) Bakterien zu jedem Zeitpunkt über den Zeitraum von 25 Minuten vor bis 20 Stunden nach Zugabe von Oxacillin. Die grünen, gepunkteten Linien deuten den Zeitpunkt an, zu dem Oxacillin herausgewaschen wurde. Anzahl der auswertbaren nicht überlebenden (c) und überlebenden (d) Bakterien zu jedem Zeitpunkt über den Zeitraum von 25 Minuten vor bis 1 Stunden nach Zugabe von Oxacillin. Die roten, gepunkteten Linien deuten den Zeitpunkt an, zu dem Oxacillin zugegeben wurde. Die gelben Kästen (oben) deuten die Bereiche an, die darunter gezeigt sind.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
RSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C ₅₅ P	Undecaprenylphosphat
CAMH	Kationisch angepasstes Mueller-Hinton-Medium, engl. <i>cation adjusted</i> Mueller Hinton Broth
CLSI	Institut für Klinik- und Laborstandards, engl. <i>Clinical and Laboratory</i> <i>Standards Institute</i>
CMLE	klassische Maximum-Likelihood-Schätzung, engl. <i>classic maximum li-</i> <i>kelihood estimation</i>
ddH ₂ O	Reinstwasser
Dr.	Doktor
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
Fc	Kristallisierbares Fragment eines Antikörpers (engl. <i>Fragment crystal-</i> <i>lizable</i>)
FcB	Human BD Fc-Block
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FWHM	Halbwertsbreite
GFP	grün fluoreszierendes Protein, engl. <i>green fluorescent protein</i>
GlyNAc	N-Acetylglukosamin
GTPase	Guanosintriphosphat-Hydrolase
HILO	engl. <i>highly inclined laminar optical</i>
IPTG	Isopropyl-β-d-thiogalactopyranosid
KTRL	unbehandelte Kontrolle
LED	Licht-emittierende Diode
Lipid II – SA	C ₅₅ PP–MurNac–GlcNAc–L-Ala–D-Gln–L-Lys–D-Ala–D-Ala–Gly ₅
MH	Mueller Hinton Broth
MHK	minimale Hemmkonzentration
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-suszeptibler <i>Staphylococcus aureus</i>
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
NA	Numerische Apertur
NM1	Nährmedium 1
NM2	Nährmedium 2

OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OXA	Oxacillin
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phasenkontrast
PERS	Persister
PG	Peptidoglykan
PGS	Peptidoglykansynthese
PSF	Punktspreizfunktion
PFS	Fokusstabilisierung (Eigenname, Nikon, engl. <i>Perfect Focus System</i>)
px	Pixel
R-L	Richardson-Lucy
rpm	Umdrehungen pro Minute
NUB	nicht überlebende Bakterien
Sbi	zweites immunoglobulinbindendes Protein, engl. <i>second binding protein of immunoglobulin</i>
SD	Standardabweichung, engl. <i>standard deviation</i>
SG	SYTOX™ Green
SpA	Oberflächenprotein A, engl. <i>surfaceprotein A</i>
TELA	Telavancin
TGase	Transglykosidase
TPase	Transpeptidase
UDP	Uridindiphosphat
VAN	Vancomycin
vWF	von Willebrand Faktor
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Staphylococcus aureus</i> Zellwandsyntheseweg	9
Abb. 2: Zusammenhang der Peptidoglykansynthese (PGS) mit der Zellteilung.....	11
Abb. 3: Strukturformeln der Glykopeptide an zwei Beispielen.....	13
Abb. 4: Penicillin Kernstruktur und Oxacillin.....	14
Abb. 5: Schema der HILO-Beleuchtung.....	19
Abb. 6: Strahlengänge der Phasenkontrastmikroskopie.....	21
Abb. 7: Strahlengang Phasenkontrast.....	28
Abb. 8: Strahlengang Fluoreszenzmikroskopie.....	29
Abb. 9: Strahlengang zur Aufweitung und Homogenisierung des Laserprofils.....	31
Abb. 10: Aufbau des verschiebbaren optischen Tisches zur Verschiebung der optischen Achse des Beleuchtungsstrahlenganges.....	32
Abb. 11: Aufbau des Inkubationseinsatzes für einfachen Volumenaustausch.....	34
Abb. 12: Aufbau des Inkubationseinsatzes für einfachen Volumenaustausch.....	35
Abb. 13: Verbindungsschemata der Spritzenpumpe mit dem Inkubationseinsatz für zeitaufgelöste Experimente mit Bakterien.....	36
Abb. 14: Beispielhafte Darstellung der Abdeckhaube des Mikroskoptisches.....	39
Abb. 15: Pumpschema und Messintervalle für zeitaufgelöste Experimente mit kontinuierlichem Volumenaustausch.....	46
Abb. 16: Analyse der Daten aus Experimenten mit einfachem Volumenaustausch.....	50
Abb. 17: Beispiele der Kategorien zur Messung der Z-Ringgröße.....	51
Abb. 18: Optimierte Datenverarbeitung zur Bestimmung der Z-Ringgröße.....	52
Abb. 19: Algorithmus zur halbautomatischen Auswertung der Z-Ringgröße.....	54
Abb. 20: Verarbeitung und Analyse der Daten zur Ermittlung der Anzahl toter Bakterien.....	57
Abb. 21: Verarbeitung der Daten aus Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch.....	58
Abb. 22: Beispielmontagen, welche für die Auswertung des Teilungszeitraums persistenter Bakterien angefertigt wurden.....	59
Abb. 23: Fließdiagramm zur Ermittlung der im Bildfeld befindlichen Bakterien.....	60
Abb. 24: Beispiel für die Lokalisierung der Bakterien anhand des FtsZ-mCherry- oder MurJ-nGreen-Signals.	61
Abb. 25: Messablauf der Rasteranordnung.....	63
Abb. 26: Schematischer Ablauf des Korrekturalgorithmus.....	63
Abb. 27: Experimentelle PSFs des verwendeten Mikroskops.....	65
Abb. 28: Beispiel der Veränderung des FtsZ-mCherry-Signals durch Dekonvolution anhand eines Bakteriums.....	67
Abb. 29: Veränderung der Intensitätsverteilung der Beleuchtung durch Vergrößerung des Laserstrahlendurchmessers und Abblenden der Ränder.....	69
Abb. 30: Veränderung des Intensitätsprofils in der Fokusebene bei Wechsel von EPI- zu HILO-Beleuchtung.	70
Abb. 31: Effekt der HILO-Beleuchtung auf die Signalqualität und den Kontrast im GFP-Kanal.....	71
Abb. 32: Austausch einer gefärbten Lösung in dem Einsatz für einfachen Volumenaustausch.....	72
Abb. 33: Austausch einer gefärbten Lösung in dem Einsatz für kontinuierlichen Volumenaustausch.....	73

Abb. 34: Temperaturmessung in dem Inkubationseinsatz für einfachen Volumenaustausch mit und ohne Objektivheizung.....	75
Abb. 35: Temperaturverlauf einer Zeitspanne von 30 Minuten mit und ohne eingeschaltete Objektivheizung.....	76
Abb. 36: Temperaturverlauf einer Zeitspanne von 10 Stunden mit und ohne Abdeckhaube bei kontinuierlichem Volumenaustausch.....	77
Abb. 37: Bakterien teilen sich bei stärkerer Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 488 nm nicht mehr.	79
Abb. 38: Z-Ringgröße der Gesamtpopulation steigt nach Behandlung mit Vancomycin, Telavancin und Oxacillin.....	80
Abb. 39: Z-Ringgröße der unbehandelten Kontrolle über einen Zeitraum von 70 Minuten.	81
Abb. 40: Effekte der Antibiotika Vancomycin, Telavancin und Oxacillin auf die Z-Ringdynamik.....	83
Abb. 41: Vergleich der händischen und optimierten Analyse der Z-Ringdynamik der unbehandelten Kontrolle.....	84
Abb. 42: Mittlere Z-Ringdynamik über die gesamte Population.....	85
Abb. 43: Die Veränderung der PBP2-Lokalisierung unterscheidet sich abhängig von dem verwendeten Antibiotikum.....	87
Abb. 44: Anteil toter Zellen in Experimenten mit einfachem Volumenaustausch.....	89
Abb. 45: Beispiel für die Bildung von Gas während kontinuierlichem Volumenaustausch.	90
Abb. 46: Austausch der Probenlösung in Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch.	91
Abb. 47: Anteil toter Bakterien in Experimenten mit kontinuierlichem Volumenaustausch.	92
Abb. 48: Z-Ringgrößen der nicht überlebenden und überlebenden Bakterien.	94
Abb. 49: Teilungszeitraum persistenter und sterbender Bakterien.....	96
Abb. 50: Modell für die Hemmung des Teilungszyklus durch die zellwandsynthesehemmenden Antibiotika Vancomycin, Telavancin und Oxacillin.	104
Abb. 51: Modell zur Erklärung des geringen Anteils der persistenten <i>S. aureus</i> -Zellen.	110
Abb. 52: Beispiele für zeitaufgelöste Experimente mit FtsZ-mCherry und einfachem Volumenaustausch.	113
Abb. 53: Repräsentative Beispiele für den Effekt erhöhter Leistungsdichte bei Beleuchtung mit 488 nm.	114
Abb. 54: Vergleich der alten mit der neuen Auswertemethode für Vancomycin und Oxacillin.	115
Abb. 55: Beispiele für zeitaufgelöste Experimente mit PBP2-GFP-Expression und einfachem Volumenaustausch.....	116
Abb. 56: Anzahl auswertbarer Bakterien in Abb. 48 über den Verlauf des Experiments.	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1 – Verwendete Chemikalien und entsprechende Hersteller	23
Tabelle 4-2 – Spezielle Verbrauchsmaterialien und entsprechende Hersteller.....	24
Tabelle 4-3 – Geräte/Bauteile und entsprechende Hersteller.....	24
Tabelle 4-4 – Zur Realisierung des zeitaufgelösten Mikroskopaufbaus verwendeten speziellen Geräte und Bauteile	25
Tabelle 4-5 – Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen und Nährmedien	26
Tabelle 4-6 – Zur Verarbeitung und Auswertung verwendete Programme und Erweiterungen	26
Tabelle 4-7 – Bezeichnungen für verwendete Bakterienstämme mit selektivem Antibiotikum	27
Tabelle 4-8 – Pumpeinstellungen zur Temperaturmessung und zur Prüfung der Objektivheizung bei einfachem Volumenaustausch (basierend auf manuell durchgeführtem Volumenaustausch).....	38
Tabelle 4-9 – Pumpeinstellungen zur Temperaturmessung und zur Prüfung der Objektivheizung und der Abdeckhaube bei kontinuierlichem Volumenaustausch.....	38
Tabelle 4-10 – Experimentelle Parameter für <i>in-vivo</i> Experimente mit FtsZ-mCherry- und PBP2-GFP-exprimierenden <i>S. aureus</i> (RN4220 pcq11-FtsZ-mCherry, RN4220 RNpPBP2-31) und einfachem Volumenaustausch.....	43
Tabelle 4-11 – Messparameter für <i>in-vivo</i> Experimente mit FtsZ-mCherry-exprimierenden <i>S. aureus</i> (RN4220 pcq11-FtsZ-mCherry) unter Zusatz von SYTOX™ Green mit einfachem Volumenaustausch	44
Tabelle 4-12 – Experimentelle Parameter für Experimente mit und ohne Zugabe von SYTOX™ Green, Expression von FtsZ-mCherry oder MurJ-nGreen und kontinuierlichem Volumenaustausch.....	47
Tabelle 4-13 – Klassen aufgrund der Z-Ringgröße und zusätzliche Kriterien.....	51
Tabelle 5-1 – Näherungsparameter der Gaußfunktionen (1), welche an die jeweiligen x-, y- und z-Profile der PSFs für 488 nm/515 nm und 561 nm/580 nm angepasst wurden. Festgelegte Parameter: $\mu = 0 \text{ nm}$; $I_{Max} = 1$	66
Tabelle 5-2 – In Rohdaten und dekonvolvierten Daten gemessene Halbwertsbreiten und Kontrast nach Michaelson des FtsZ-mCherry-Signals.....	68
Tabelle 5-3 – Größe der beiden periodischen Temperaturschwankungen ΔT und deren Dauer mit und ohne Haube.....	77

Literaturverzeichnis

1. Piggott, T., Moja, L., Huttner, B., Okwen, P., Raviglione, M., Kredo, T., and Schünemann, H.J. (2024). WHO Model list of essential medicines: visions for the future. *Bull World Health Organ* 102, 722–729.
2. Brown, E.D., and Wright, G.D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* 529, 336–343.
3. Laxminarayan, R. (2022). The overlooked pandemic of antimicrobial resistance. *Lancet* 399, 606–607.
4. Hutchings, M.I., Truman, A.W., and Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 51, 72–80.
5. Murray, C.J., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G.R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., and Wool, E., et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399, 629–655.
6. Cook, M.A., and Wright, G.D. (2022). The past, present, and future of antibiotics. *Sci Transl Med* 14, eabo7793.
7. van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., and Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 14, 742–750.
8. Klein, E.Y., van Boeckel, T.P., Martinez, E.M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S.A., Goossens, H., and Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *PNAS* 115, E3463–E3470.
9. Craig, M., Jernigan, D., Laserson, K., McBride, S., Fairbanks, J., Sievert, D., Armstrong, P.A., Ewing Ogle, H., and Zucker, H. (2024). Antimicrobial resistance at a crossroads: the cost of inaction. *Lancet* 404, 1083–1085.
10. O'Neill J. (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for health and wealth of nations: The Review on Antimicrobial Resistance chaired by Jim O'Neill.
11. Ikuta, K.S., Swetschinski, L.R., Aguilar, G.R., Sharara, F., Mestrovic, T., Gray, A.P., Weaver, N.D., Wool, E.E., Han, C., and Hayoon, A.G., et al. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 400, 2221–2248.
12. Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., and Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2, 40–61.
13. Tenson, T., Lovmar, M., and Ehrenberg, M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol* 330, 1005–1014.
14. Cho, H., Uehara, T., and Bernhardt, T.G. (2014). Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell* 159, 1300–1311.
15. Fernández-Villa, D., Aguilar, M.R., and Rojo, L. (2019). Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications. *Int J Mol Sci* 20.
16. Park, J.T., and Strominger, J.L. (1957). Mode of action of penicillin. *Science* 125, 99–101.
17. Blumberg, P.M., and Strominger, J.L. (1971). Inactivation of D-alanine carboxypeptidase by penicillins and cephalosporins is not lethal in *Bacillus subtilis*. *PNAS* 68, 2814–2817.
18. Eagle, H. (1954). The binding of penicillin in relation to its cytotoxic action. I. Correlation between the penicillin sensitivity and combining activity of intact bacteria and cell-free extracts. *J Exp Med* 99, 207–226.
19. Ghuysen, J.M. (1991). Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* 45, 37–67.
20. Ghuysen, J.M. (1994). Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol* 2, 372–380.

21. Ulm, H., and Schneider, T. (2016). Targeting bactoprenol-coupled cell envelope precursors. *Appl Microbiol Biotechnol* *100*, 7815–7825.
22. Schneider, T., and Sahl, H.-G. (2010). An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *Int J Med Microbiol* *300*, 161–169.
23. Salmond, G.P.C., and Welch, M. (2008). Antibiotic resistance: adaptive evolution. *The Lancet* *372*, S97–S103.
24. Baquero, F., Alvarez-Ortega, C., and Martinez, J.L. (2009). Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environ Microbiol Rep* *1*, 469–476.
25. Webber, M.A., and Piddock, L.J.V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* *51*, 9–11.
26. WHO (2024). Antibacterial products in clinical development for priority pathogens. <https://www.who.int/observatories/global-observatory-on-health-research-and-development/monitoring/antibacterial-products-in-clinical-development-for-priority-pathogens>.
27. WHO (2024). WHO antibacterial preclinical pipeline review. <https://www.who.int/observatories/global-observatory-on-health-research-and-development/monitoring/who-antibacterial-preclinical-pipeline-review>.
28. Wertheim, H.F.L., Vos, M.C., Ott, A., van Belkum, A., Voss, A., Kluytmans, J.A.J.W., van Keulen, P.H.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Meester, M.H.M., and Verbrugh, H.A. (2004). Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* *364*, 703–705.
29. Mainous, A.G., Hueston, W.J., Everett, C.J., and Diaz, V.A. (2006). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S aureus* in the United States, 2001–2002. *Ann Fam Med* *4*, 132–137.
30. Sollid, J.U.E., Furberg, A.S., Hanssen, A.M., and Johannessen, M. (2014). *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infect Genet Evol* *21*, 531–541.
31. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050 (2024). *Lancet* *404*, 1199–1226.
32. Grein, F., Schneider, T., and Sahl, H.-G. (2019). Docking on Lipid II-A Widespread Mechanism for Potent Bactericidal Activities of Antibiotic Peptides. *J Mol Biol* *431*, 3520–3530.
33. Silhavy, T.J., Kahne, D., and Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a000414.
34. Scheffers, D.-J., and Pinho, M.G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev* *69*, 585–607.
35. Mitchell, P., and Moyle, J. (1957). Autolytic release and osmotic properties of protoplasts from *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* *16*, 184–194.
36. Vollmer, W., Blanot, D., and Pedro, M.A. de (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* *32*, 149–167.
37. Sutton, J.A.F., Carnell, O.T., Lafage, L., Gray, J., Biboy, J., Gibson, J.F., Pollitt, E.J.G., Tazoll, S.C., Turnbull, W., and Hajdamowicz, N.H., et al. (2021). *Staphylococcus aureus* cell wall structure and dynamics during host-pathogen interaction. *PLoS Pathog* *17*, e1009468.
38. Giesbrecht, P., Kersten, T., Maidhof, H., and Wecke, J. (1998). Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev* *62*, 1371–1414.
39. Vollmer, W., and Seligman, S.J. (2010). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol* *18*, 59–66.
40. Yao, X., Jericho, M., Pink, D., and Beveridge, T. (1999). Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy. *J Bacteriol* *181*, 6865–6875.
41. Kumar, S., Mollo, A., Kahne, D., and Ruiz, N. (2022). The Bacterial Cell Wall: From Lipid II Flipping to Polymerization. *Chem Rev* *122*, 8884–8910.

42. Garde, S., Chodiseti, P.K., and Reddy, M. (2021). Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation. *EcoSal Plus* 9.
43. Bouhss, A., Crouvoisier, M., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2004). Purification and characterization of the bacterial MraY translocase catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis. *J Biol Chem* 279, 29974–29980.
44. Higashi, Y., Strominger, J.L., and Sweeley, C.C. (1967). Structure of a lipid intermediate in cell wall peptidoglycan synthesis: a derivative of a C55 isoprenoid alcohol. *PNAS* 57, 1878–1884.
45. Aanderson, J.S., and Strominger, J.L. (1965). Isolation and utilization of phospholipid intermediates in cell wall glycopeptide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 21, 516–521.
46. Neuhaus, F.C. (1971). Initial translocation reaction in the biosynthesis of peptidoglycan by bacterial membranes. *Acc. Chem. Res.* 4, 297–303.
47. Pless, D.D., and Neuhaus, F.C. (1973). Initial Membrane Reaction in Peptidoglycan Synthesis. *J Biol Chem* 248, 1568–1576.
48. Umbreit, J.N., and Strominger, J.L. (1972). Isolation of the lipid intermediate in peptidoglycan biosynthesis from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 112, 1306–1309.
49. Anderson, J.S., Matsushashi, M., Haskin, M.A., and Strominger, J.L. (1965). LIPID-PHOSPHOACETYLMURAMYL-PENTAPEPTIDE AND LIPID-PHOSPHODISACCHARIDE-PENTAPEPTIDE: PRESUMED MEMBRANE TRANSPORT INTERMEDIATES IN CELL WALL SYNTHESIS. *PNAS* 53, 881–889.
50. Schneider, T., Senn, M.M., Berger-Bächi, B., Tossi, A., Sahl, H.-G., and Wiedemann, I. (2004). In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 53, 675–685.
51. Münch, D., Roemer, T., Lee, S.H., Engeser, M., Sahl, H.G., and Schneider, T. (2012). Identification and in vitro analysis of the GatD/MurT enzyme-complex catalyzing lipid II amidation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 8, e1002509.
52. Rubino, F.A., Kumar, S., Ruiz, N., Walker, S., and Kahne, D.E. (2018). Membrane Potential Is Required for MurJ Function. *J Am Chem Soc* 140, 4481–4484.
53. Rubino, F.A., Mollo, A., Kumar, S., Butler, E.K., Ruiz, N., Walker, S., and Kahne, D.E. (2020). Detection of Transport Intermediates in the Peptidoglycan Flippase MurJ Identifies Residues Essential for Conformational Cycling. *J Am Chem Soc* 142, 5482–5486.
54. Sham, L.-T., Butler, E.K., Lebar, M.D., Kahne, D., Bernhardt, T.G., and Ruiz, N. (2014). Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* 345, 220–222.
55. Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Distèche, M., Kruijff, B. de, and Breukink, E. (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* 30, 1425–1432.
56. Meeske, A.J., Riley, E.P., Robins, W.P., Uehara, T., Mekalanos, J.J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A.C., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2016). SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* 537, 634–638.
57. Reichmann, N.T., Tavares, A.C., Saraiva, B.M., Jousset, A., Reed, P., Pereira, A.R., Monteiro, J.M., Sobral, R.G., VanNieuwenhze, M.S., and Fernandes, F., et al. (2019). SEDS-bPBP pairs direct lateral and septal peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Nat Microbiol* 4, 1368–1377.
58. Yuan, Y., Barrett, D., Zhang, Y., Kahne, D., Sliz, P., and Walker, S. (2007). Crystal structure of a peptidoglycan glycosyltransferase suggests a model for processive glycan chain synthesis. *PNAS* 104, 5348–5353.
59. Barrett, D., Leimkuhler, C., Chen, L., Walker, D., Kahne, D., and Walker, S. (2005). Kinetic characterization of the glycosyltransferase module of *Staphylococcus aureus* PBP2. *J Bacteriol* 187, 2215–2217.
60. Lovering, A.L., Castro, L.H. de, Lim, D., and Strynadka, N.C.J. (2007). Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis. *Science* 315, 1402–1405.

61. Emami, K., Guyet, A., Kawai, Y., Devi, J., Wu, L.J., Allenby, N., Daniel, R.A., and Errington, J. (2017). RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway. *Nat Microbiol* 2, 16253.
62. Huang, C.-Y., Shih, H.-W., Lin, L.-Y., Tien, Y.-W., Cheng, T.-J.R., Cheng, W.-C., Wong, C.-H., and Ma, C. (2012). Crystal structure of *Staphylococcus aureus* transglycosylase in complex with a lipid II analog and elucidation of peptidoglycan synthesis mechanism. *PNAS* 109, 6496–6501.
63. Reed, P., Atilano, M.L., Alves, R., Hoiczky, E., Sher, X., Reichmann, N.T., Pereira, P.M., Roemer, T., Filipe, S.R., and Pereira-Leal, J.B., et al. (2015). *Staphylococcus aureus* Survives with a Minimal Peptidoglycan Synthesis Machine but Sacrifices Virulence and Antibiotic Resistance. *PLoS Pathog* 11, e1004891.
64. Reed, P., Veiga, H., Jorge, A.M., Terrak, M., and Pinho, M.G. (2011). Monofunctional transglycosylases are not essential for *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis. *J Bacteriol* 193, 2549–2556.
65. Wang, Q.M., Peery, R.B., Johnson, R.B., Alborn, W.E., Yeh, W.K., and Skatrud, P.L. (2001). Identification and characterization of a monofunctional glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183, 4779–4785.
66. Memmi, G., Filipe, S.R., Pinho, M.G., Fu, Z., and Cheung, A. (2008). *Staphylococcus aureus* PBP4 is essential for beta-lactam resistance in community-acquired methicillin-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3955–3966.
67. Pinho, M.G., Filipe, S.R., Lencastre, H. de, and Tomasz, A. (2001). Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183, 6525–6531.
68. Pinho, M.G., Lencastre, H. de, and Tomasz, A. (2000). Cloning, characterization, and inactivation of the gene *pbpC*, encoding penicillin-binding protein 3 of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182, 1074–1079.
69. Pinho, M.G., Lencastre, H. de, and Tomasz, A. (2001). An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *PNAS* 98, 10886–10891.
70. Sieradzki, K., Pinho, M.G., and Tomasz, A. (1999). Inactivated *pbp4* in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 274, 18942–18946.
71. Pereira, S.F.F., Henriques, A.O., Pinho, M.G., Lencastre, H. de, and Tomasz, A. (2009). Evidence for a dual role of PBP1 in the cell division and cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 72, 895–904.
72. Pereira, S.F.F., Henriques, A.O., Pinho, M.G., Lencastre, H. de, and Tomasz, A. (2007). Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189, 3525–3531.
73. Monteiro, J.M., Pereira, A.R., Reichmann, N.T., Saraiva, B.M., Fernandes, P.B., Veiga, H., Tavares, A.C., Santos, M., Ferreira, M.T., and Macário, V., et al. (2018). Peptidoglycan synthesis drives an FtsZ-treadmill-independent step of cytokinesis. *Nature* 554, 528–532.
74. Kuzin, A.P., Liu, H., Kelly, J.A., and Knox, J.R. (1995). Binding of cephalothin and cefotaxime to D-ala-D-ala-peptidase reveals a functional basis of a natural mutation in a low-affinity penicillin-binding protein and in extended-spectrum beta-lactamases. *Biochemistry* 34, 9532–9540.
75. Taguchi, A., Welsh, M.A., Marmont, L.S., Lee, W., Sjodt, M., Kruse, A.C., Kahne, D., Bernhardt, T.G., and Walker, S. (2019). FtsW is a peptidoglycan polymerase that is functional only in complex with its cognate penicillin-binding protein. *Nat Microbiol* 4, 587–594.
76. Martínez-Caballero, S., Mahasenan, K.V., Kim, C., Molina, R., Feltzer, R., Lee, M., Bouley, R., Heseck, D., Fisher, J.F., and Muñoz, I.G., et al. (2021). Integrative structural biology of the penicillin-binding protein-1 from *Staphylococcus aureus*, an essential component of the divisome machinery. *Comput Struct Biotechnol J* 19, 5392–5405.
77. Barrows, J.M., and Goley, E.D. (2021). FtsZ dynamics in bacterial division: What, how, and why? *Curr Opin Cell Biol* 68, 163–172.

78. Lund, V.A., Wacnik, K., Turner, R.D., Cotterell, B.E., Walther, C.G., Fenn, S.J., Grein, F., Wollman, A.J., Leake, M.C., and Olivier, N., et al. (2018). Molecular coordination of *Staphylococcus aureus* cell division. *Elife* 7.
79. Pinho, M.G., Kjos, M., and Veening, J.-W. (2013). How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 11, 601–614.
80. Pazos, M., Peters, K., Casanova, M., Palacios, P., VanNieuwenhze, M., Breukink, E., Vicente, M., and Vollmer, W. (2018). Z-ring membrane anchors associate with cell wall synthases to initiate bacterial cell division. *Nat Commun* 9, 5090.
81. Atilano, M.L., Pereira, P.M., Yates, J., Reed, P., Veiga, H., Pinho, M.G., and Filipe, S.R. (2010). Teichoic acids are temporal and spatial regulators of peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*. *PNAS* 107, 18991–18996.
82. Monteiro, J.M., Covas, G., Rausch, D., Filipe, S.R., Schneider, T., Sahl, H.-G., and Pinho, M.G. (2019). The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity. *Sci Rep* 9, 5010.
83. Monteiro, J.M., Fernandes, P.B., Vaz, F., Pereira, A.R., Tavares, A.C., Ferreira, M.T., Pereira, P.M., Veiga, H., Kuru, E., and VanNieuwenhze, M.S., et al. (2015). Cell shape dynamics during the staphylococcal cell cycle. *Nat Commun* 6, 8055.
84. Pinho, M.G., and Errington, J. (2005). Recruitment of penicillin-binding protein PBP2 to the division site of *Staphylococcus aureus* is dependent on its transpeptidation substrates. *Mol Microbiol* 55, 799–807.
85. Steele, V.R., Bottomley, A.L., Garcia-Lara, J., Kasturiarachchi, J., and Foster, S.J. (2011). Multiple essential roles for EzrA in cell division of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 80, 542–555.
86. Veiga, H., Jousselin, A., Schäper, S., Saraiva, B.M., Marques, L.B., Reed, P., Wilton, J., Pereira, P.M., Filipe, S.R., and Pinho, M.G. (2023). Cell division protein FtsK coordinates bacterial chromosome segregation and daughter cell separation in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* 42, e112140.
87. Wacnik, K., Rao, V.A., Chen, X., Lafage, L., Pazos, M., Booth, S., Vollmer, W., Hobbs, J.K., Lewis, R.J., and Foster, S.J. (2022). Penicillin-Binding Protein 1 (PBP1) of *Staphylococcus aureus* Has Multiple Essential Functions in Cell Division. *mBio* 13, e0066922.
88. Baranova, N., Radler, P., Hernández-Rocamora, V.M., Alfonso, C., López-Pelegri, M., Rivas, G., Vollmer, W., and Loose, M. (2020). Diffusion and capture permits dynamic coupling between treadmilling FtsZ filaments and cell division proteins. *Nat Microbiol* 5, 407–417.
89. Bisson-Filho, A.W., Hsu, Y.-P., Squyres, G.R., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., Sun, Y., Dekker, C., Holden, S., and VanNieuwenhze, M.S., et al. (2017). Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science* 355, 739–743.
90. Squyres, G.R., Holmes, M.J., Barger, S.R., Pennycook, B.R., Ryan, J., Yan, V.T., and Garner, E.C. (2021). Single-molecule imaging reveals that Z-ring condensation is essential for cell division in *Bacillus subtilis*. *Nat Microbiol* 6, 553–562.
91. Whitley, K.D., Jukes, C., Tregidgo, N., Karinou, E., Almada, P., Cesbron, Y., Henriques, R., Dekker, C., and Holden, S. (2021). FtsZ treadmilling is essential for Z-ring condensation and septal constriction initiation in *Bacillus subtilis* cell division. *Nat Commun* 12, 2448.
92. Myrbråten, I.S., Stamsås, G.A., Chan, H., Morales Angeles, D., Knutsen, T.M., Salehian, Z., Shapaval, V., Straume, D., and Kjos, M. (2022). SmdA is a Novel Cell Morphology Determinant in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 13, e0340421.
93. Tinajero-Trejo, M., Carnell, O., Kabli, A.F., Pasquina-Lemonche, L., Lafage, L., Han, A., Hobbs, J.K., and Foster, S.J. (2022). The *Staphylococcus aureus* cell division protein, DivIC, interacts with the cell wall and controls its biosynthesis. *Commun Biol* 5, 1228.

94. Coltharp, C., Buss, J., Plumer, T.M., and Xiao, J. (2016). Defining the rate-limiting processes of bacterial cytokinesis. *PNAS* *113*, E1044–53.
95. Erickson, H.P., Anderson, D.E., and Osawa, M. (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev* *74*, 504–528.
96. McQuillen, R., and Xiao, J. (2020). Insights into the Structure, Function, and Dynamics of the Bacterial Cytokinetic FtsZ-Ring. *Annu Rev Biophys* *49*, 309–341.
97. Nguyen, L.T., Oikonomou, C.M., Ding, H.J., Kaplan, M., Yao, Q., Chang, Y.-W., Beeby, M., and Jensen, G.J. (2019). Simulations suggest a constrictive force is required for Gram-negative bacterial cell division. *Nat Commun* *10*, 1259.
98. Nguyen, L.T., Oikonomou, C.M., and Jensen, G.J. (2021). Simulations of Proposed Mechanisms of FtsZ-Driven Cell Constriction. *J Bacteriol* *203*.
99. Osawa, M., and Erickson, H.P. (2013). Liposome division by a simple bacterial division machinery. *PNAS* *110*, 11000–11004.
100. Szwedziak, P., Wang, Q., Bharat, T.A.M., Tsim, M., and Löwe, J. (2014). Architecture of the ring formed by the tubulin homologue FtsZ in bacterial cell division. *Elife* *3*, e04601.
101. Yang, X., Lyu, Z., Miguel, A., McQuillen, R., Huang, K.C., and Xiao, J. (2017). GTPase activity-coupled treadmilling of the bacterial tubulin FtsZ organizes septal cell wall synthesis. *Science* *355*, 744–747.
102. Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* *32*, 259–286.
103. Wang, M., Buist, G., and van Dijk, J.M. (2022). Staphylococcus aureus cell wall maintenance - the multifaceted roles of peptidoglycan hydrolases in bacterial growth, fitness, and virulence. *FEMS Microbiol Rev* *46*.
104. Zhou, X., Halladin, D.K., Rojas, E.R., Koslover, E.F., Lee, T.K., Huang, K.C., and Theriot, J.A. (2015). Bacterial division. Mechanical crack propagation drives millisecond daughter cell separation in Staphylococcus aureus. *Science* *348*, 574–578.
105. Matias, V.R.F., and Beveridge, T.J. (2007). Cryo-electron microscopy of cell division in Staphylococcus aureus reveals a mid-zone between nascent cross walls. *Mol Microbiol* *64*, 195–206.
106. Wheeler, R., Turner, R.D., Bailey, R.G., Salamaga, B., Mesnage, S., Mohamad, S.A.S., Hayhurst, E.J., Horsburgh, M., Hobbs, J.K., and Foster, S.J. (2015). Bacterial Cell Enlargement Requires Control of Cell Wall Stiffness Mediated by Peptidoglycan Hydrolases. *mBio* *6*, e00660.
107. Do, T., Schaefer, K., Santiago, A.G., Coe, K.A., Fernandes, P.B., Kahne, D., Pinho, M.G., and Walker, S. (2020). Staphylococcus aureus cell growth and division are regulated by an amidase that trims peptides from uncrosslinked peptidoglycan. *Nat Microbiol* *5*, 291–303.
108. Jensen, C., Bæk, K.T., Gallay, C., Thalsø-Madsen, I., Xu, L., Jousselin, A., Ruiz Torrubia, F., Paulander, W., Pereira, A.R., and Veening, J.-W., et al. (2019). The ClpX chaperone controls autolytic splitting of Staphylococcus aureus daughter cells, but is bypassed by β -lactam antibiotics or inhibitors of WTA biosynthesis. *PLoS Pathog* *15*, e1008044.
109. Kirsch, V.C., Fetzter, C., and Sieber, S.A. (2021). Global Inventory of ClpP- and ClpX-Regulated Proteins in Staphylococcus aureus. *J Proteome Res* *20*, 867–879.
110. Wong, F., Wilson, S., Helbig, R., Hegde, S., Aftenieva, O., Zheng, H., Liu, C., Pilizota, T., Garner, E.C., and Amir, A., et al. (2021). Understanding Beta-Lactam-Induced Lysis at the Single-Cell Level. *Front Microbiol* *12*, 712007.
111. Blaskovich, M.A.T., Hansford, K.A., Butler, M.S., Jia, Z., Mark, A.E., and Cooper, M.A. (2018). Developments in Glycopeptide Antibiotics. *ACS Infect Dis* *4*, 715–735.
112. Butler, M.S., Hansford, K.A., Blaskovich, M.A.T., Halai, R., and Cooper, M.A. (2014). Glycopeptide antibiotics: back to the future. *J Antibiot (Tokyo)* *67*, 631–644.

113. Nicolaou, K.C., Boddy, C.N.C., Bräse, S., and Winssinger, N. (1999). Chemistry, Biology, and Medicine of the Glycopeptide Antibiotics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2096–2152.
114. Bordet, C., and Perkins, H.R. (1970). Iodinated vancomycin and mucopeptide biosynthesis by cell-free preparations from *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochem J* **119**, 877–883.
115. Culp, E.J., Waglechner, N., Wang, W., Fiebig-Comyn, A.A., Hsu, Y.-P., Koteva, K., Sychantha, D., Coombes, B.K., van Nieuwenhze, M.S., and Brun, Y.V., et al. (2020). Evolution-guided discovery of antibiotics that inhibit peptidoglycan remodelling. *Nature* **578**, 582–587.
116. Reynolds, P.E. (1989). Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **8**, 943–950.
117. Pereira, P.M., Filipe, S.R., Tomasz, A., and Pinho, M.G. (2007). Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3627–3633.
118. Cui, L., Murakami, H., Kuwahara-Arai, K., Hanaki, H., and Hiramatsu, K. (2000). Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2276–2285.
119. Cui, L., Iwamoto, A., Lian, J.-Q., Neoh, H., Maruyama, T., Horikawa, Y., and Hiramatsu, K. (2006). Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 428–438.
120. Cui, L., Ma, X., Sato, K., Okuma, K., Tenover, F.C., Mamizuka, E.M., Gemmell, C.G., Kim, M.-N., Ploy, M.-C., and El-Solh, N., et al. (2003). Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **41**, 5–14.
121. Higgins, D.L., Chang, R., Debatov, D.V., Leung, J., Wu, T., Krause, K.M., Sandvik, E., Hubbard, J.M., Kaniga, K., and Schmidt, D.E., et al. (2005). Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1127–1134.
122. Lunde, C.S., Hartouni, S.R., Janc, J.W., Mammen, M., Humphrey, P.P., and Benton, B.M. (2009). Telavancin disrupts the functional integrity of the bacterial membrane through targeted interaction with the cell wall precursor lipid II. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 3375–3383.
123. Song, Y., Lunde, C.S., Benton, B.M., and Wilkinson, B.J. (2012). Further insights into the mode of action of the lipoglycopeptide telavancin through global gene expression studies. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 3157–3164.
124. David Greenwood (2008). *Antimicrobial Drugs: Chronicle of a twentieth century medical triumph* (Oxford University Press).
125. Simon, H.J. (1962). THE NEWER PENICILLINS. *Calif Med* **97**, 135–141.
126. Kirby, W.M., Rosenfeld, L.S., and Brodie, J. (1962). Oxacillin: laboratory and clinical evaluation. *JAMA* **181**, 739–744.
127. Bigger, J. (1944). TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet* **244**, 497–500.
128. Hobby, G.L., Meyer, K., and Chaffee, E. (1942). Observations on the Mechanism of Action of Penicillin. *Exp Biol Med* **50**, 281–285.
129. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., and Balaban, N.Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* **14**, 320–330.
130. Peyrusson, F., Varet, H., Nguyen, T.K., Legendre, R., Sismeiro, O., Coppée, J.-Y., Wolz, C., Tenson, T., and van Bambeke, F. (2020). Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. *Nat Commun* **11**, 2200.

131. Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Hertegonne, S., Bergada-Pijuan, J., Chang, C.-C., Pereira, S., Gómez-Mejia, A., van Gestel, L., Bär, J., and Vulin, C., et al. (2023). Serine-threonine phosphoregulation by PknB and Stp contributes to quiescence and antibiotic tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Sci Signal* *16*, eabj8194.
132. Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* *305*, 1622–1625.
133. Conlon, B.P., Rowe, S.E., Gandt, A.B., Nuxoll, A.S., Donegan, N.P., Zalis, E.A., Clair, G., Adkins, J.N., Cheung, A.L., and Lewis, K. (2016). Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat Microbiol* *1*.
134. Balaban, N.Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D.I., Brynildsen, M.P., Bumann, D., Camilli, A., and Collins, J.J., et al. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol* *17*, 441–448.
135. Wang, Y., Bojer, M.S., George, S.E., Wang, Z., Jensen, P.R., Wolz, C., and Ingmer, H. (2018). Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase. *Sci Rep* *8*, 10849.
136. Zheng, E.J., Andrews, I.W., Grote, A.T., Manson, A.L., Alcantar, M.A., Earl, A.M., and Collins, J.J. (2022). Modulating the evolutionary trajectory of tolerance using antibiotics with different metabolic dependencies. *Nat Commun* *13*, 2525.
137. Holzhofer, S., Süssmuth, R., and Haag, R. (1985). Oscillating tolerance in synchronized cultures of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* *28*, 456–457.
138. Zheng, E.J., Stokes, J.M., and Collins, J.J. (2020). Eradicating Bacterial Persisters with Combinations of Strongly and Weakly Metabolism-Dependent Antibiotics. *Cell Chem Biol* *27*, 1544-1552.e3.
139. Fauvart, M., Groote, V.N. de, and Michiels, J. (2011). Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol* *60*, 699–709.
140. Aly, R., Shinefield, H.R., Litz, C., and Maibach, H.I. (1980). Role of teichoic acid in the binding of *Staphylococcus aureus* to nasal epithelial cells. *J Infect Dis* *141*, 463–465.
141. Heptinstall, S., Archibald, A.R., and Baddiley, J. (1970). Teichoic acids and membrane function in bacteria. *Nature* *225*, 519–521.
142. Peterson, P.K., Verhoef, J., Sabath, L.D., and Quie, P.G. (1977). Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infect Immun* *15*, 760–764.
143. Becker, S., Frankel, M.B., Schneewind, O., and Missiakas, D. (2014). Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *PNAS* *111*, 1574–1579.
144. Goodyear, C.S., and Silverman, G.J. (2004). Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes. *PNAS* *101*, 11392–11397.
145. DeDent, A.C., McAdow, M., and Schneewind, O. (2007). Distribution of protein A on the surface of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* *189*, 4473–4484.
146. Zhang, L., Jacobsson, K., Ström, K., Lindberg, M., and Frykberg, L. (1999). *Staphylococcus aureus* expresses a cell surface protein that binds both IgG and beta2-glycoprotein I. *Microbiology (Reading)* *145* (Pt 1), 177–183.
147. Zhang, L., Jacobsson, K., Vasi, J., Lindberg, M., and Frykberg, L. (1998). A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading)* *144* (Pt 4), 985–991.
148. Herrmann, M., Hartleib, J., Kehrel, B., Montgomery, R.R., Sixma, J.J., and Peters, G. (1997). Interaction of von Willebrand factor with *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* *176*, 984–991.
149. Hartleib, J., Köhler, N., Dickinson, R., Chhatwal, G., Sixma, j., Hartford, O., Foster, T., Peters, G., Kehrel, B., and Hermann, M. (2000). Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* *6*, 2149–2156.

150. Claes, J., Liesenborghs, L., Peetermans, M., Veloso, T.R., Missiakas, D., Schneewind, O., Mancini, S., Entenza, J.M., Hoylaerts, M.F., and Heying, R., et al. (2017). Clumping factor A, von Willebrand factor-binding protein and von Willebrand factor anchor *Staphylococcus aureus* to the vessel wall. *J Thromb Haemost* 15, 1009–1019.
151. Claes, J., Vanassche, T., Peetermans, M., Liesenborghs, L., Vandenbriele, C., Vanhoorelbeke, K., Missiakas, D., Schneewind, O., Hoylaerts, M.F., and Heying, R., et al. (2014). Adhesion of *Staphylococcus aureus* to the vessel wall under flow is mediated by von Willebrand factor-binding protein. *Blood* 124, 1669–1676.
152. Pappelbaum, K.I., Gorzelanny, C., Grässle, S., Suckau, J., Laschke, M.W., Bischoff, M., Bauer, C., Schorpp-Kistner, M., Weidenmaier, C., and Schneppenheim, R., et al. (2013). Ultralarge von Willebrand factor fibers mediate luminal *Staphylococcus aureus* adhesion to an intact endothelial cell layer under shear stress. *Circulation* 128, 50–59.
153. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32, 234–258.
154. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (2024) (Clinical Laboratory Standards Institute).
155. Tokunaga, M., Imamoto, N., and Sakata-Sogawa, K. (2008). Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat Methods* 5, 159–161.
156. Mihalcescu, I., Van-Melle Gateau, M., Chelli, B., Pinel, C., and Ravanat, J.-L. (2015). Green autofluorescence, a double edged monitoring tool for bacterial growth and activity in micro-plates. *Phys Biol* 12, 66016.
157. Agard, D.A., Hiraoka, Y., Shaw, P., and Sedat, J.W. (1989). Fluorescence microscopy in three dimensions. *Methods Cell Biol* 30, 353–377.
158. Gibson, S.F., and Lanni, F. (1991). Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A* 8, 1601.
159. Agard, D.A. (1984). Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions. *Annu Rev Biophys Bioeng* 13, 191–219.
160. Hopwood, D.A. (1960). Phase-contrast observations on *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol* 22, 295–302.
161. Razin, S., and Cosenza, B.J. (1966). Growth phases of *Mycoplasma* in liquid media observed with phase-contrast microscope. *J Bacteriol* 91, 858–869.
162. Tzagoloff, H., and Novick, R. (1977). Geometry of cell division in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 129, 343–350.
163. Vicar, T., Balvan, J., Jaros, J., Jug, F., Kolar, R., Masarik, M., and Gumulec, J. (2019). Cell segmentation methods for label-free contrast microscopy: review and comprehensive comparison. *BMC Bioinformatics* 20, 360.
164. Nikon (2013). Nikon - Inverted Microscope: ECLIPSE Ti-E Ti-E/U. Instructions, 43.
165. Zernike, F. (1942). Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica* 9, 686–698.
166. Zernike, F. (1942). Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II. *Physica* 9, 974–986.
167. Pelc, R., Hostounský, Z., Otaki, T., and Katoh, K. (2020). Conventional, Apodized, and Relief Phase-Contrast Microscopy. In *Neurohistology and Imaging Techniques*, R. Pelc, W. Walz and J.R. Doucette, eds. (Springer US), pp. 275–323.
168. Pluta, M. (1993). Stray-light problem in phase contrast microscopy or toward highly sensitive phase contrast devices: a review. *Opt Eng* 32, 3199.

169. Saraiva, B.M., Krippahl, L., Filipe, S.R., Henriques, R., and Pinho, M.G. (2021). eHooke: A tool for automated image analysis of spherical bacteria based on cell cycle progression. *Biol Imaging* 1, e3.
170. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., and Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682.
171. Sage, D., Donati, L., Soulez, F., Fortun, D., Schmit, G., Seitz, A., Guet, R., Vonesch, C., and Unser, M. (2017). DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods* 115, 28–41.
172. Aguet, F., van de Ville, D., and Unser, M. (2008). Model-based 2.5-d deconvolution for extended depth of field in brightfield microscopy. *IEEE Trans Image Process* 17, 1144–1153.
173. Herbert, S., Ziebandt, A.-K., Ohlsen, K., Schäfer, T., Hecker, M., Albrecht, D., Novick, R., and Götz, F. (2010). Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect Immun* 78, 2877–2889.
174. Puls, J.-S., Brajtenbach, D., Schneider, T., Kubitscheck, U., and Grein, F. (2023). Inhibition of peptidoglycan synthesis is sufficient for total arrest of staphylococcal cell division. *Sci Adv* 9, eade9023.
175. Puls, J.-S. (2024). Dissecting the cellular effects of antimicrobial agents: The spatio-temporal impact of peptidoglycan synthesis inhibiting antibiotics in *Staphylococcus aureus* and mechanism of action elucidation of epilancin A37. Ph D Thesis, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
176. Born, M., and Wolf, E. (2016). Principles of optics: Electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light (Cambridge Univ. Press).
177. Csiszar, I. (1991). Why Least Squares and Maximum Entropy? An Axiomatic Approach to Inference for Linear Inverse Problems. *Ann. Statist.* 19.
178. Fu, G., Huang, T., Buss, J., Coltharp, C., Hensel, Z., and Xiao, J. (2010). In vivo structure of the *E. coli* FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM). *PLoS One* 5, e12682.
179. Michaelson, A.A. (1927). *Studies in Optics* (U. Chicago Press).
180. Henry, C.A., Dyer, B., Wagner, M., Judy, M., and Matthews, J.L. (1996). Phototoxicity of argon laser irradiation on biofilms of *Porphyromonas* and *Prevotella* species. *J Photochem Photobiol B* 34, 123–128.
181. Henry, C.A., Judy, M., Dyer, B., Wagner, M., and Matthews, J.L. (1995). Sensitivity of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in liquid media to argon laser. *Photochem Photobiol* 61, 410–413.
182. Tapang, G., and Saloma, C. (2002). Behavior of the point-spread function in photon-limited confocal microscopy. *Appl Opt* 41, 1534–1540.
183. Blythe, K.L., Titus, E.J., and Willets, K.A. (2015). Objective-Induced Point Spread Function Aberrations and Their Impact on Super-Resolution Microscopy. *Anal Chem* 87, 6419–6424.
184. Li, Y., Zhou, H., Liu, X., Li, Y., and Le Wang (2018). Effects of aberrations on effective point spread function in STED microscopy. *Appl Opt* 57, 4164–4170.
185. Walker, J.N., and Horswill, A.R. (2012). A coverslip-based technique for evaluating *Staphylococcus aureus* biofilm formation on human plasma. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 39.
186. Plavskii, V.Y., Mikulich, A.V., Tretyakova, A.I., Leusenka, I.A., Plavskaya, L.G., Kazyuchits, O.A., Dobysh, I.I., and Krasnenkova, T.P. (2018). Porphyrins and flavins as endogenous acceptors of optical radiation of blue spectral region determining photoinactivation of microbial cells. *J Photochem Photobiol B* 183, 172–183.
187. Wang, P., Robert, L., Pelletier, J., Dang, W.L., Taddei, F., Wright, A., and Jun, S. (2010). Robust growth of *Escherichia coli*. *Curr Biol* 20, 1099–1103.
188. Moffitt, J.R., Lee, J.B., and Cluzel, P. (2012). The single-cell chemostat: an agarose-based, microfluidic device for high-throughput, single-cell studies of bacteria and bacterial communities. *Lab Chip* 12, 1487–1494.

189. Stricker, J., Cookson, S., Bennett, M.R., Mather, W.H., Tsimring, L.S., and Hasty, J. (2008). A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator. *Nature* *456*, 516–519.
190. Endesfelder, U. (2019). From single bacterial cell imaging towards in vivo single-molecule biochemistry studies. *Essays Biochem* *63*, 187–196.
191. Okumus, B., Landgraf, D., Lai, G.C., Bakshi, S., Arias-Castro, J.C., Yildiz, S., Huh, D., Fernandez-Lopez, R., Peterson, C.N., and Toprak, E., et al. (2016). Mechanical slowing-down of cytoplasmic diffusion allows in vivo counting of proteins in individual cells. *Nat Commun* *7*, 11641.
192. Allard, P., Papazotos, F., and Potvin-Trottier, L. (2022). Microfluidics for long-term single-cell time-lapse microscopy: Advances and applications. *Front Bioeng Biotechnol* *10*, 968342.
193. Schäper, S., Brito, A.D., Saraiva, B.M., Squyres, G.R., Holmes, M.J., Garner, E.C., Hensel, Z., Henriques, R., and Pinho, M.G. (2024). Cell constriction requires processive septal peptidoglycan synthase movement independent of FtsZ treadmilling in *Staphylococcus aureus*. *Nat Microbiol* *9*, 1049–1063.
194. Arabski, M., Wasik, S., Piskulak, P., Gózdź, N., Slezak, A., and Kaca, W. (2011). Analiza dyfuzji antybiotyków z zelu agarozowego metodami spektrofotometrii i interferometrii laserowej. *Polim Med* *41*, 25–32.
195. Wenger, L., and Hubbuch, J. (2022). Investigation of Lysozyme Diffusion in Agarose Hydrogels Employing a Microfluidics-Based UV Imaging Approach. *Front Bioeng Biotechnol* *10*, 849271.
196. Mao, B., Divoux, T., and Snabre, P. (2016). Drying of agarose gels monitored by in-situ interferometry.
197. Nweke, M.C., Turmaine, M., McCartney, R.G., and Bracewell, D.G. (2017). Drying techniques for the visualisation of agarose-based chromatography media by scanning electron microscopy. *Biotechnol J* *12*.
198. Mukherjee, R., Verma, T., Nandi, D., and Umapathy, S. (2020). Understanding the effects of culture conditions in bacterial growth: A biochemical perspective using Raman microscopy. *J Biophotonics* *13*, e201900233.
199. Wegkamp, A., Teusink, B., Vos, W.M. de, and Smid, E.J. (2010). Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. *Lett Appl Microbiol* *50*, 57–64.
200. Ortiz-Severín, J., Stuardo, C.J., Jiménez, N.E., Palma, R., Cortés, M.P., Maldonado, J., Maass, A., and Cambiza, V. (2021). Nutrient Scarcity in a New Defined Medium Reveals Metabolic Resistance to Antibiotics in the Fish Pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Front Microbiol* *12*, 734239.
201. Anutrakunchai, C., Bolscher, J.G.M., Krom, B.P., Kanthawong, S., Chareonsudjai, S., and Tawe-chaisupapong, S. (2018). Impact of nutritional stress on drug susceptibility and biofilm structures of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* grown in static and microfluidic systems. *PLoS One* *13*, e0194946.
202. Schäper, S., Brito, A.D., Saraiva, B.M., Squyres, G.R., Holmes, M.J., Garner, E.C., Hensel, Z., and Henriques, R. (2023). Processive movement of *Staphylococcus aureus* essential septal peptidoglycan synthases is independent of FtsZ treadmilling and drives cell constriction.
203. Yao, Z., Kahne, D., and Kishony, R. (2012). Distinct single-cell morphological dynamics under beta-lactam antibiotics. *Mol Cell* *48*, 705–712.
204. Manuel, C.M., Nunes, O.C., and Melo, L.F. (2007). Dynamics of drinking water biofilm in flow/non-flow conditions. *Water Res* *41*, 551–562.
205. Chun, A.L.M., Mosayyebi, A., Butt, A., Carugo, D., and Salta, M. (2022). Early biofilm and streamer formation is mediated by wall shear stress and surface wettability: A multifactorial microfluidic study. *Microbiologyopen* *11*, e1310.
206. Jha, S., Singh, A.A., and Thakur, N. (2022). Role of exopolysaccharide and biofilms in microorganisms for alleviating salt stress. In *Mitigation of Plant Abiotic Stress by Microorganisms* (Elsevier), pp. 205–230.
207. Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H.K., Song, Z., Moser, C., Jensen, P.Ø., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., and Bjarnsholt, T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* *3*, 55–65.

208. Moormeier, D.E., and Bayles, K.W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol* *104*, 365–376.
209. Sutipornpalangkul, W., Nishitani, K., and Schwarz, E.M. (2021). Quantitative flow chamber system for evaluating in vitro biofilms and the kinetics of *S. aureus* biofilm formation in human plasma media. *BMC Microbiol* *21*, 314.
210. Loskill, P., Pereira, P.M., Jung, P., Bischoff, M., Herrmann, M., Pinho, M.G., and Jacobs, K. (2014). Reduction of the peptidoglycan crosslinking causes a decrease in stiffness of the *Staphylococcus aureus* cell envelope. *Biophys J* *107*, 1082–1089.
211. Salamaga, B., Kong, L., Pasquina-Lemonche, L., Lafage, L., zur Und Muhlen, M. von, Gibson, J.F., Grybchuk, D., Tooke, A.K., Panchal, V., and Culp, E.J., et al. (2021). Demonstration of the role of cell wall homeostasis in *Staphylococcus aureus* growth and the action of bactericidal antibiotics. *PNAS* *118*.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck zum einen für die Bereitstellung des Themas danken. Ich möchte mich außerdem für die Freiheiten bedanken, die ich während der Anfertigung dieser Arbeit genossen habe, genauso wie das Vertrauen, das er in mich hatte, die Hürden der Promotion und des Projektes zu meistern.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Rudolf Merkel für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Prof. Dr. Arne Lützen und Prof. Dr. Ulrike Endesfelder als fachnahes bzw. fachfremdes Mitglied meiner Promotionskommission.

Ich bedanke mich bei Dr. Jan-Peter Siebrasse für die Hilfestellung und die Zusammenarbeit bezüglich des Aufbaus des Mikroskops und des Projektes.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Jan-Samuel Puls und Dr. Fabian Grein für die wunderbare Zusammenarbeit und den tollen Austausch während der gemeinsamen Projekte. Ich möchte Dr. Jan-Samuel Puls und Viola Middelhaue zusätzlich einen besonderen Dank dafür aussprechen, dass sie mich dem Fachbereich der Mikrobiologie nähergebracht haben und bei Fragen jederzeit zur Stelle waren.

Außerdem möchte ich der Feinmechanik- und Elektrowerkstatt meinen Dank aussprechen, die jederzeit zur Stelle waren, als es darum ging den Aufbau zu verändern und Dinge anzufertigen.

Einen besonderen Dank möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe widmen, die jederzeit ausgesprochen liebevoll, aufgeweckt und aktiv war. Es hat immer Spaß gemacht Dinge mit euch zu unternehmen und ihr habt selbst in den schwereren Zeiten immer die Stimmung gehoben.

Mein Dank gilt auch Juan-Edo, Annika und Jan-Peter, die sich bereit erklärt haben, diese Arbeit Korrektur zu lesen. Danke, dass ihr euch die Zeit genommen habt und für die hilfreichen Kommentare und Anmerkungen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder für die Unterstützung danken, die ich während meines gesamten Studiums erfahren habe. Vielen Dank, dass ihr nie Zweifel an mir hattet und mir immer unter die Arme gegriffen habt, wenn es nötig war.

Von besonderem, unschätzbarem Wert war die Unterstützung und das Verständnis, das mir meine Verlobte Anna-Lena entgegengebracht hat. Es ist wunderbar, wie sie jeden meiner Tage zu einem besonderen macht und mich immer wieder aufmuntert, weiter zu machen. Für den immerwährenden Halt, den sie mir gibt, bin ich ihr zutiefst dankbar.