

Das essentielle YycFGHI-Regulationssystem von
Staphylococcus aureus:
Charakterisierung von Überexpressions-Mutanten
und die Etablierung zweier *in vitro*-Modellsysteme

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dipl.-Biol.
Michael Türck

aus Bonn

BONN Juli 2009

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP) unter Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Bierbaum angefertigt.

Promotionskommission

Erstgutachterin:	Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Bierbaum
Zweitgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Sahl
Fachnahes Mitglied:	Prof. Dr. rer. nat. Dieter Volkmann
Fachangrenzendes Mitglied:	Prof. Dr. med. vet. Anna Maria Eis-Hübinger

Tag der Promotion:	10. September 2009
--------------------	--------------------

Erscheinungsjahr:	2009
-------------------	------

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2	Die klinische Relevanz von <i>S. aureus</i>	2
1.3	Zwei-Komponentenregulationssysteme	4
1.4	Das essentielle Zwei-Komponentenregulationssystem YycFG	5
1.5	Strukturelle Organisation der orthologen <i>yyc</i> -Operons	6
1.5.1	Die Einteilung der <i>yyc</i> -Operons in zwei Klassen	6
1.5.2	Die Expression der <i>yyc</i> -Gene in <i>B. subtilis</i> und <i>S. aureus</i>	9
1.5.3	Die mögliche Funktion und Rolle der YycHIJK-Proteine	10
1.6	Die bakterielle Zellwand – Synthese, Abbau, Zellteilung und das YycFG-TCS	13
1.7	Ziel dieser Arbeit	16
2.	Material und Methoden	19
2.1	Chemikaliennachweis	19
2.2	Gerätenachweis	20
2.3	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	21
2.3.1	Bakterienstämme	21
2.3.2	Plasmide	22
2.3.3	Oligonukleotide	23
2.4	Stammhaltung und Medien	24
2.5	Molekularbiologische Arbeitstechniken	25
2.5.1	Isolierung von genomischer DNA	25
2.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA	26
2.5.3	Agarosegelelektrophorese	26
2.5.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	27
2.5.5	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA	27

2.5.6	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.....	27
2.5.7	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
2.5.8	Restriktion und Ligation von DNA.....	28
2.5.9	DNA-Sequenzierung.....	28
2.5.10	Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	28
2.5.11	Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	29
2.5.12	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. aureus</i>	30
2.5.13	cDNA-Synthese und Aufreinigung für die qRT-PCR.....	31
2.5.14	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	32
2.6	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	34
2.7	Untersuchung der Empfindlichkeit von <i>S. aureus</i> gegenüber oxidativem Stress.....	35
2.8	Untersuchung der Biofilmbildung bei <i>S. aureus</i>	36
2.9	Biochemische Arbeitstechniken.....	37
2.9.1	Rekombinante Überexpression der C-His ₆ -getaggten Yyc-Proteine.....	37
2.9.1.1	Der <i>groESL</i> konstitutiv exprimierende Vektor pREP4groESL(MT).....	37
2.9.1.2	Der Proteinexpressionsvektor pET22b.....	38
2.9.1.3	Der Proteinexpressionsvektor pET22bΔpelB.....	39
2.9.1.4	Expression der C-His ₆ -getaggten Proteine YycF & YycH.....	40
2.9.1.5	Expression der C-His ₆ -getaggten Proteine YycG, YycG(Y308N) & YycI.....	40
2.9.2	Ni-NTA-Affinitätschromatographie zur Proteinaufreinigung.....	40
2.9.2.1	Die C-His ₆ -getaggten Proteine YycF & YycH.....	40
2.9.2.2	Die C-His ₆ -getaggten Proteine YycG, YycG(Y308N) & YycI.....	41
2.9.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Test.....	43
2.9.4	Dialyse und Lagerung der rekombinant exprimierten Yyc-C-His ₆ -Proteine.....	43
2.9.5	SDS-Page zur Analyse von Proteinen.....	44
2.9.6	Crosslinking von Proteinen mit Formaldehyd.....	45
2.9.7	Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE).....	47
2.9.8	Herstellung von multilamellaren Vesikeln (MLVs).....	48

2.9.8.1	Herstellung von Lipid II- und C ₅₅ -P-dotierten Vesikeln.....	48
2.9.9	Herstellung von unilamellaren Vesikeln (ULVs).....	49
2.9.10	Rekonstitution von rekombinanten C-His ₆ -getaggten Proteinen in ULVs	49
2.9.11	Phosphat-Test zur Bestimmung des P _i -Gehalts von Proteoliposomen.....	51
2.9.12	Phosphorylierungsassays / Etablierung zweier Modell-Systeme.....	51
2.9.12.1	Die C-His ₆ -getaggten Proteine im Detergenz-Mizellen-Modell.....	52
2.9.12.2	Rekonstitution von YycG und YycG(Y308N) in ULVs.....	53
2.9.12.3	Die C-His ₆ -getaggten Proteine im Phospholipid-Liposomen-Modell	55
3.	Ergebnisse	57
3.1	Strukturelle Organisation des <i>yyc</i> -Operons in <i>S. aureus</i>	57
3.2	Analyse der konservierten Domänen der Sensor-Histidin-Kinase YycG	58
3.3	Der Aminosäure-Austausch in der PAS-Domäne der mutierten YycG-Kinase.....	62
3.4	<i>S. aureus</i> -Klone mit Xylose-induzierter Überexpression von <i>yycFG</i>	69
3.5	Quantitative Real-Time-PCRs (qRT-PCRs).....	70
3.5.1	Quantifizierung der in <i>S. aureus</i> induzierten Überexpression von <i>yycFG</i>	70
3.5.2	Untersuchung der Autoregulation der <i>yycFG</i> -Expression durch YycFG	72
3.6	Phänotypischer Einfluss der <i>yycFG</i> -Überexpression in <i>S. aureus</i>	77
3.6.1	Einfluss auf die Pigmentierung	78
3.6.2	Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber O ₂ -vermitteltem Stress.....	79
3.6.3	Einfluss auf die Biofilmbildung	86
3.6.4	Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin	87
3.7	Konstruktion des Plasmids pREP4groESL(MT).....	89
3.8	Klonierung der <i>yyc</i> -Gene in den Expressionsvektor pET22bΔpelB	89
3.9	Expression und Aufreinigung der Yyc-C-His ₆ -Proteine	91
3.10	Crosslinking: Untersuchung des oligomeren Status der Yyc-C-His ₆ -Proteine.....	95
3.11	BN-PAGE: Untersuchung des oligomeren Status der Yyc-C-His ₆ -Proteine.....	97
3.12	Phosphorylierungsassays	102
3.12.1	Detergenz-Mizellen-Modell	103

3.12.1.1	Einfluss der Salzkonzentration (KCl) auf die Kinase-Aktivität.....	103
3.12.1.2	Phosphorylgruppentransfer von YycG bzw. YycG(Y308N) auf YycF....	104
3.12.1.3	Dephosphorylierung von YycG(Y308N)~P und YycF~P durch Hitze	106
3.12.1.4	Aktivität der YycG-Kinase in Anwesenheit von YycH und oder YycI....	107
3.12.2	Phospholipid-Liposomen-Modell.....	108
3.12.2.1	Phosphorylierungsaktivität von YycG-ULVs / YycG(Y308N)-ULVs.....	108
3.12.2.2	Einfluss von C ₅₅ -P / Lipid II auf die Aktivität von YycG(Y308N)-ULVs	110
3.12.3	Die beiden Modellsysteme im Vergleich	111
4.	Diskussion	115
4.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>yycFG</i> -Überexpression in <i>S. aureus</i>	115
4.1.1	Autoregulation der <i>yycFG</i> -Expression durch das YycFG-System.....	115
4.1.2	Der Einfluss der YycFG-Aktivität auf die Pigmentierung.....	117
4.1.3	Staphyloxanthin als Antioxidans und Virulenzfaktor	119
4.1.4	Die <i>S. aureus</i> -Biofilmbildung und das YycFG-System.....	121
4.1.5	Die Rolle des YycFG-TCS in der Antibiotikaresistenz	124
4.2	Charakterisierung des YycFGHI-Systems auf Proteinebene.....	126
4.2.1	Regulation der YycG-Kinase durch die auxiliären Proteine YycH & YycI	127
4.2.2	Mögliche Signale der YycG-Sensor-Histidin-Kinase	129
4.2.2.1	Osmotischer Stress	129
4.2.2.2	Oxidativer Stress	131
4.2.2.3	Komponenten der Zellwandbiosynthese.....	132
4.2.3	Einfluss des AS-Austausches in der PAS-Domäne von YycG(Y308N).....	133
4.3	Ausblick.....	134
5.	Zusammenfassung	137
6.	Literaturverzeichnis.....	143
7.	Anhang	155
7.1	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	155
7.1.1	Berechnung der Kopienzahl für die Standards.....	155

7.1.2	Kopienstandards in der qRT-PCR.....	155
7.1.3	Programm-Parameter der Läufe mit dem LightCycler®-Instrument.....	156
7.2	Sequenz der <i>yycFG</i> -Gene auf pTvicRK / pTvicRK(Y306N).....	157
7.3	Sequenz der konstitutiv exprimierten Gene <i>groESL</i> auf pREP4groESL(MT).....	158
7.4	Gensequenzen der rekombinant exprimierten Yyc-C-His ₆ -Proteine.....	158
7.5	Vektorkarten	161
7.5.1	pTX15.....	161
7.5.2	pTvicRK / pTvicRK(Y306N).....	162
7.5.3	pREP4.....	162
7.5.4	pREP4groESL(MT)	163
7.5.5	pET22b	163
7.5.6	pET22bΔpelB	164
7.5.7	pET22bΔpelBvicR	164
7.5.8	pET22bΔpelBvicK	165
7.5.9	pET22bΔpelBvicK(Y308N).....	165
7.5.10	pET22bΔpelByycH	166
7.5.11	pET22bΔpelByycI.....	166
7.6	Theoretische Betrachtung der Yyc-C-His ₆ -Proteinparameter	167
7.7	Laufhöhe der Markerproteine in der BN-PAGE	172
8.	Publikationen.....	173

Nachfolgend aufgeführt sind die häufig gebrauchten Abkürzungen in dieser Arbeit. Erläuterungen zu selten verwendeten Abkürzungen sind an den jeweiligen Stellen im Text gegeben.

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampere
Å	Ångström (Nicht-SI-Einheit), 1 Å = 0,1 nm
à	zu, zu je
A ₂₃₀ / A ₂₆₀ / A ₂₈₀	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 230, 260 oder 280 nm
Abs.	Absorption
Acc.	Acceleration, Beschleunigung
ad	auffüllen auf ... mit ...
ADP	Adenosindiphosphat
aka	also known as, auch bekannt als
Amp.	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-resistent, Resistenz gegenüber Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
[γ ³³ P]ATP	Adenosintriphosphat mit radioaktivem ³³ P-Rest in der γ-Position
aq. dest.	aqua destillata, destilliertes Wasser
Bio-Beads	Adsorbens aus Polystyren-Divenyl-Benzen in Form von porösen Kügelchen
BHI	Brain Heart Infusion, Hirn-Herz-Dextrose (Komplexmedium)
BHI½	BHI halbkonzentriert
BN-PAGE	Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
Br.	Bremse
BSA	bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
C ₅₅ -P	Bactoprenol
cDNA	copy DNA
Ci / μCi	Curie / Mikrocurie
C-His ₆	C-terminaler Tag mit 6 Histidin-Resten
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat
CMC	critical micelle concentration, kritische Mizellenkonzentration
Δ	„Delta“, steht für Deletion oder deletiert
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltosid
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

Abkürzung	Bedeutung
ds	double strand, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii, und andere
F / μ F	Farad / Mikrofarad
Fa.	Firma
G+C-Gehalt	Anteil der DNA-Basen Guanin und Cytosin an der Gesamtheit der Basen
GlucNAc	N-Acetylglucosamin (NAG)
g	Gramm
gr.	griechisch
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin- N'-(2-ethansulfonsäure)
His	Histidin
His ₆	sechs Histidin-Reste
HU	Hydroxyurea (Hydroxycarbamid)
hVISA	heterogenously Vancomycin intermediate-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kana.	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycin-resistent, Resistenz gegenüber Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
lat.	lateinisch
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium (Komplexmedium)
LDS	Lithiumdodecylsulfat
Lipid II	C ₅₅ -Undecaprenyl-Pyrophosphat-N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid
μ g	Mikrogramm
M	mol/l
Mb	Megabase
MCS	multiple cloning sites
Met ^R	Methicillin-resistent, Resistenz gegenüber Methicillin
Met ^S	Methicillin-susceptible, Empfindlichkeit gegenüber Methicillin
mg	Milligramm
MH-Bouillon	Müller-Hinton-Bouillon (Komplexmedium)
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MilliQ	steht stellvertretend für Reinstwasser
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol/l
MLS _B	Makrolid-Lincosamid-Streptogramin B
MLST	Multilocus sequence-typing
MLVs	multilamellare Vesikel
MRSA	Methicillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i> , Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
ms	Millisekunde(n)

Abkürzung	Bedeutung
MSSA	Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> , Methicillin-empfindlicher <i>S. aureus</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure (NAM)
MV	Methylviologen (Paraquat)
NAG	N-Acetylglucosamin (GlucNAc)
NAM	N-Acetylmuraminsäure (MurNAc)
n.b.	nicht bestimmt
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
nm	Nanometer
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
ori	origin of replication, Replikationsursprung
P / ~P	Phosphatrest
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Domäne u.a. im Drosophila Period-, Vertebraten Arnt- und dem Drosophila Single-Minded-Protein
PAS _C -Domäne	cytoplasmatische PAS-Domäne
PAS _P -Domäne	periplasmatische PAS-Domäne
PBP	Penicillinbindeprotein
PC	Polycarbonat
PCR	Polymerase Chain-Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Polyethylen
P _i	inorganic phosphate, anorganisches Phosphat
pI	isoelektrischer Punkt
pH	pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR, quantitative Real-Time-PCR
R ²	Bestimmtheitsmaß
rbs	ribosome binding site, Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Rounds per Minute = Umdrehungen pro Minute
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffradikale
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time PCR, Real-Time-PCR
$\sigma^A / \sigma^B / \sigma^G$	Sigmafaktor A, B oder G
s	Sekunde(n)
SDS	sodiumdodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
ss	single strand, einzelsträngig
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCS	two-component regulatory system, Zweikomponentenregulationssystem
TE	Tris-EDTA(-Puffer)

Abkürzung	Bedeutung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine
Tet.	Tetracyclin
Tet ^R	Tetracyclin-resistent, Resistenz gegenüber Tetracyclin
TM-Domäne	Transmembran-Domäne
T _M	Schmelztemperatur
Triton X-100	Octoxynol-9 oder Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSB	Tryptic Soy Broth (Soybean Casein Digest Medium), Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon
U	Unit, Einheit
ULVs	unilamellare Vesikel
ÜN	über Nacht
undef.	undefiniert
UV	Ultraviolett
V	Volt
VISA	Vancomycin intermediate-resistant <i>S. aureus</i> , Vancomycin-intermediär-resistenter <i>S. aureus</i>
VRSA	Vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , Vancomycin-resistenter <i>S. aureus</i>
VSSA	Vancomycin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> , Vancomycin empfindlicher <i>S. aureus</i>
(v/v)	volume per volume, Volumenprozent
WB	Wasserbad
(w/v)	weight per volume, Gewichtsprozent

Nukleotide, Aminosäuren und physikalische Einheiten wurden generell nach den IUPAC-Regeln abgekürzt.

1. Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus*

Bei *Staphylococcus aureus* handelt es sich um ein Gram-positives, nicht sporenbildendes, unbewegliches, opportunistisch pathogenes Bakterium mit niedrigem G+C-Gehalt, das bei etwa 25 % der Bevölkerung dauerhaft zur Normalflora des oberen Respirationstraktes gehört und hier besonders den Nasenvorhof besiedelt; und weitere 50 % der Bevölkerung sind von *S. aureus* zumindest zeitweilig besiedelt (LINDSAY, 2008). Der Name *Staphylococcus* (staphyle (gr.): Traube; kokkos (gr.): Beere, Samenkorn) wurde von OGSTON (1883) erstmalig für die Gruppe der Micrococci eingeführt, die Entzündungen und Eiter verursachen (GÖTZ et al., 2006). Durch die Verwendung des Begriffes „*Staphylococcus*“ für die beschriebene Anordnung zu Gruppen und Haufen unterschied OGSTON erstmals innerhalb der entzündungsverursachenden Kokken zwischen einem zweiten Typ von Kokken, für den BILLROTH (1874) zuvor den Begriff „*Streptococcus*“ (strepto (gr.): Kette) eingeführt hatte, um deren Anordnung in Ketten zu beschreiben (PETERS and PULVERER, 2001; GÖTZ et al., 2006). Abbildung 1.1 zeigt, wie treffend der Gattungsname *Staphylococcus* als Bezeichnung für die kokkenförmigen Bakterienzellen ist, die einen Durchmesser von etwa 1 µm besitzen und deren Teilung in mehreren Ebenen zur Bildung von unregelmäßigen Ansammlungen führt, die tatsächlich sehr stark an Bündel von Weintrauben an Rispen erinnern.

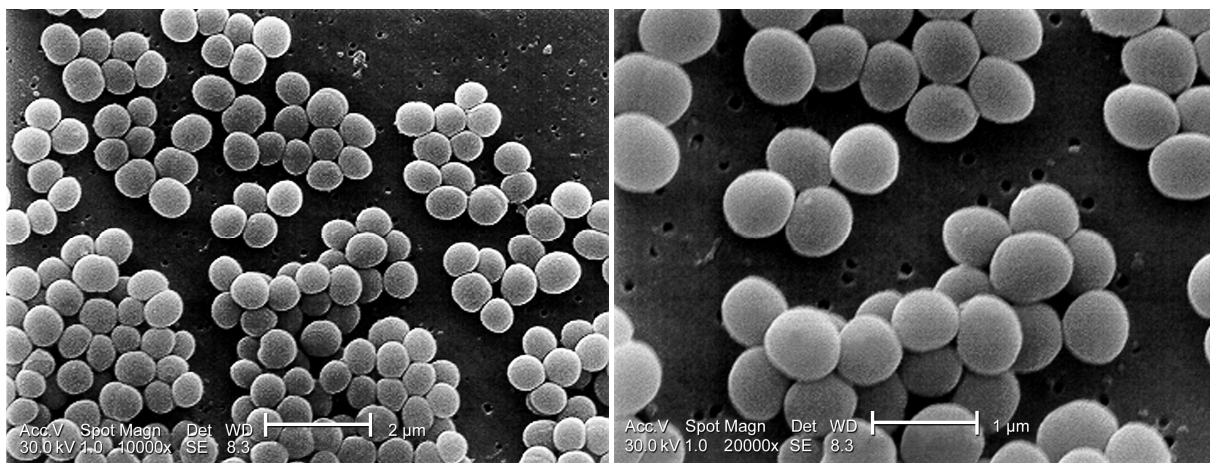


Abbildung 1.1: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von *Staphylococcus aureus*-Zellen in 10.000-facher (links) und 20.000-facher (rechts) Vergrößerung. Bilder (ID# 11154 und ID# 11156) aus der Public Health Image Library (PHIL) des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) unter <http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>. Content Credit: CDC/ Matthew J. Arduino, DRPH. Photo Credit: Janice Haney Carr (2001).

Eine formale Beschreibung der Gattung *Staphylococcus* erfolgte durch ROSENBACH (1884), der die Gattung in die beiden Spezies *Staphylococcus aureus* (aureus (lat.): golden) und

S. albus (albus (lat.): weiß) unterteilte (GÖTZ et al., 2006) und damit zwischen zwei Spezies unterschied, die orange-gelbe Kolonien oder weiße Kolonien bilden. Während *S. albus* später in *S. epidermidis* umbenannt wurde, blieb die Bezeichnung „*aureus*“ für *S. aureus* erhalten und verweist nach wie vor auf die charakteristische Pigmentierung, die durch das orange *S. aureus*-Hauptpigment Staphyloxanthin (MARSHALL and RODWELL, 1972) zu Stande kommt. Bei Staphyloxanthin handelt es sich um ein Triterpen-Carotinoid (C₃₀) (MARSHALL and WILMOTH, 1981a). Die Klassifizierung für *S. aureus* lautet: Reich: *Bacteria*, Phylum: 'Firmicutes', Klasse: 'Bacilli', Ordnung: 'Bacillales', Familie: 'Staphylococcaceae', Gattung: *Staphylococcus*, Spezies: *aureus* (Taxonomy Browser unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Das Temperaturspektrum, in dem ein Wachstum von *S. aureus* möglich ist, reicht von etwa 10 °C bis 45 °C. Das Optimum liegt dabei bei 30 – 37 °C. Eine Vermehrung der Zellen ist auch noch bei sehr hohen Kochsalzkonzentrationen (10 % und mehr) möglich. Die meisten *S. aureus*-Stämme haben komplexe Nährstoffansprüche und sind bis auf wenige Ausnahmen fakultativ aerob (PETERS and PULVERER, 2001; GÖTZ et al., 2006).

1.2 Die klinische Relevanz von *S. aureus*

Die häufigste Ursache von nosokomialen Infektionen ist *S. aureus* (FRIEDRICH et al., 2008). Als Eintrittspforten in den Körper dienen dabei insbesondere die Wunden, die nach chirurgischen Eingriffen verbleiben und vaskuläre Eintrittsstellen, die durch das Legen von Kathetern und venösen Zugängen entstehen. *S. aureus* verursacht neben lokalen Infektionen, die sich in der Haut unmittelbar an der Eintrittsstelle befinden, auch tiefe invasive Infektionen, die zahlreiche Gewebe und Organe betreffen können. So können das Blut (Bakteriämie), das Herz (Endokarditis), die Lungen (Pneumonie), die Muskeln (Abszess), die Knochen (Osteomyelitis), die Bindehaut der Augen (Konjunktivitis) und auch die Gelenke (bakterielle Arthritis) betroffen sein (LINDSAY, 2008). Die Entwicklung einer *S. aureus*-Infektion kann dabei sehr schnell (akut), aber auch langsam und langwierig (chronisch) sein, und der Verlauf kann sowohl mild, als auch ernsthaft, bis hin zum Tode führend sein. In den letzten 15 Jahren hat sich die Situation in den Krankenhäusern dadurch drastisch verschärft, dass es bei *S. aureus*-Stämmen, die insbesondere in medizinischen Pflegeeinrichtungen anzutreffen sind, zu einer verstärkten Resistenz gegenüber den bis dato sehr gebräuchlichen und massiv eingesetzten Antibiotika, den β -Lactamase-festen Penicillin-Derivaten wie Flucloxacillin, Oxacillin und Methicillin, gekommen ist (LINDSAY, 2008). Diese sogenannten

Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) Stämme machen in einigen Ländern 40 – 80 % aller *S. aureus*-Isolate in Krankenhäusern aus (LINDSAY, 2008). Aber auch außerhalb des Krankenhauses hat sich in den letzten Jahren durch MRSA-Stämme ein neues Gefahrenpotential entwickelt. Diese sogenannten „community-acquired MRSA“ (CA-MRSA) Stämme werden seit den späten 1990er Jahren beschrieben (CDC, 1999), wobei die Anzahl der Fälle zunehmend ansteigt (KENNEDY et al., 2008). Die besondere Bedeutung, die von den CA-MRSA-Stämmen ausgeht, liegt darin begründet, dass diese Stämme Infektionen bei an sich vollkommen gesunden Personen verursachen (MALTEZOU and GIAMARELLOU, 2006), besonders bei solchen Menschen, die sich in sozialen Gemeinschaften wie Sportmannschaften, den bewaffneten Streitkräften, Gefängnissen und Schulen befinden (LINDSAY, 2008). Die häufigsten Infektionen sind dabei schwere Haut- und Weichteilinfektionen aber es wird ebenfalls, wenn auch wesentlich seltener, von lebensbedrohlichen invasiven Prozessen wie Bakteriämien und nekrotisierenden Lungenentzündungen berichtet (GILLET et al., 2002). Epidemiologische und klinische Daten legen den Schluss nahe, dass die hohe Virulenz der CA-MRSA-Stämme mit den Genen *lukS-PV* und *lukF-PV* einhergeht, die für die beiden Untereinheiten des Panton-Valentine-Leukocidin Toxins (PVL-Toxin) codieren (BOYLE-VAVRA and DAUM, 2007). Dies würde zumindest erklären, warum es durch die CA-MRSA-Stämme primär zu den beschriebenen Hautinfektionen und den bisweilen auftretenden nekrotisierenden Lungenentzündungen kommt (VANDENESCH et al., 2003). Bei der Behandlung von Infektionen mit MRSA ist das Antibiotikum Vancomycin seit Jahrzehnten die erste Wahl. Die zunehmende Resistenzentwicklung in den letzten Jahren bereitet aber großen Anlass zu Sorge und so ist es nicht verwunderlich, dass die Isolierung des ersten MRSA-Stammes mit verminderter Vancomycin-Empfindlichkeit (HIRAMATSU et al., 1997) große Aufmerksamkeit erregte. Neben diesen sogenannten Vancomycin-intermediär-resistenten *S. aureus* (VISA) Stämmen, die in der Klinik verstärkt zu Therapieversagen führen (MUSTA et al., 2009), gibt es auch immer wieder Fälle von Isolaten mit sehr hohen Resistenzleveln, den sogenannten VRSA (Vancomycin-resistente *S. aureus*) Stämmen (SIEVERT et al., 2008). Neben Vancomycin zur Behandlung von MRSA-Infektionen gibt es zwar noch Antibiotika-Alternativen wie Linezolid, Daptomycin und Tigecyclin (MICEK, 2007), aber auch gegen diese wurden zum Teil bereits Resistenzentwicklungen beobachtet (PILLAI et al., 2002; FRIEDMAN et al., 2006).

1.3 Zwei-Komponentenregulationssysteme

Zwei-Komponentenregulationssysteme (TCSs; two-component regulatory systems) können in allen Prokaryoten, außer in *Mycoplasma* gefunden werden (STOCK et al., 2000) und stellen bei Bakterien eine verbreitete Form der Signaltransduktion dar, um auf die sich ändernden Bedingungen der Umwelt reagieren zu können (HOCH, 2000; STOCK et al., 2000). Die TCSs bestehen aus einem Sensor-Protein, bei dem es sich meistens um eine Histidin-Kinase handelt, und einem kognaten Responseregulator. In Anwesenheit eines Signals kommt es, unter Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP), zur Autophosphorylierung des Sensor-Proteins an einem konservierten Histidin-Rest (His). Die Phosphorylgruppe an dem Histidin-Rest der Kinase wird nachfolgend auf einen konservierten Aspartat-Rest (Asp) des zugehörigen Responseregulator übertragen, was zu einer Änderung der Affinität des Regulators für bestimmte DNA-Sequenzbereiche führt (HOCH, 2000; STOCK et al., 2000). In dem es direkt auf die Genexpression (Transkription) einwirkt, kann ein Bakterium auf ein äußeres Signal, das eine Veränderung in den Umweltbedingungen darstellt, reagieren. Eine schematische Darstellung der Vorgänge, die bei der Signalwahrnehmung und Übermittlung stattfinden, ist in Abbildung 1.2 gegeben.

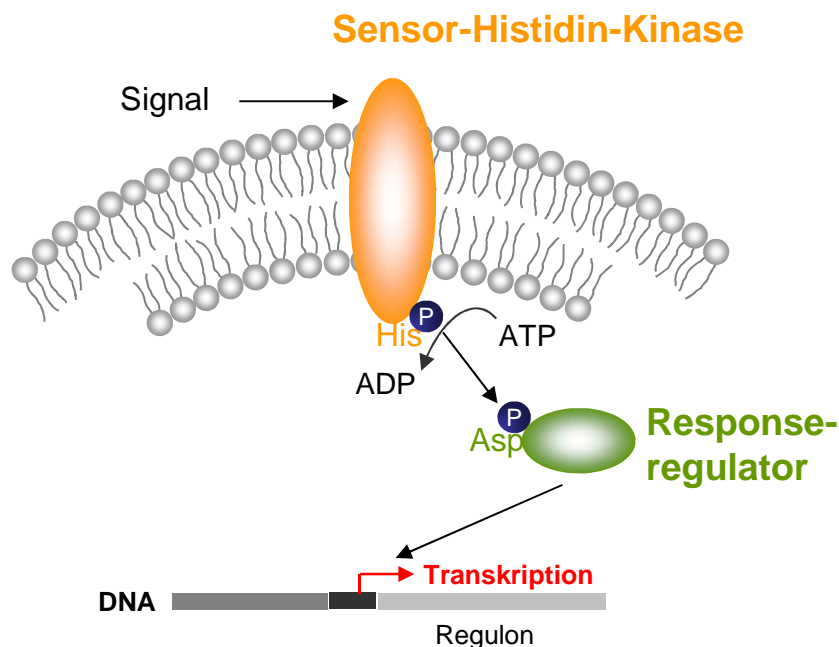


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Zwei-Komponentenregulationssystems (TCS). Abbildung von DR. TANJA SCHNEIDER, leicht modifiziert TÜRK.

1.4 Das essentielle Zwei-Komponentenregulationssystem YycFG

Das Zwei-Komponentensystem (TCS) YycFG, ist innerhalb des Phylums der Firmicutes fast ubiquitär verbreitet und bildet innerhalb dieser Gruppe auch das einzig essentielle TCS. Das System umfasst die Sensor-Histidin-Kinase YycG und den zugehörigen Responseregulator YycF. Das YycFG-TCS wurde zuerst in *Bacillus subtilis* entdeckt und als essentiell für das Wachstum der Zellen bestimmt (FABRET and HOCH, 1998; FUKUCHI et al., 2000). Seitdem wurde es für zahlreiche, nahe verwandte, pathogene Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. mutans*, *S. pyogenes* ebenfalls als essentiell und unter verschiedenen Bezeichnungen (VicRK, MicAB) beschrieben (LANGE et al., 1999; MARTIN et al., 1999; THROUP et al., 2000; ECHENIQUE and TROMBE, 2001; WAGNER et al., 2002; DUBRAC and MSADEK, 2004; SENADHEERA et al., 2005; M. LIU et al., 2006). Versuche, die orthologen *yycFG*-Gene in *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus epidermidis* zu inaktivieren, verliefen nicht erfolgreich, was ein Hinweis darauf ist, dass diese Gene auch in diesen Bakterien essentiell sind (KALLIPOLITIS and INGMER, 2001; HANCOCK and PEREGO, 2004; QIN et al., 2006). Bis dato konnte die Beteiligung der *yyc*-Gene und insbesondere des YycFG-TCS selbst an diversen Zellprozessen bei vielen Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt gezeigt werden (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Prozesse bei Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt bei denen eine Beteiligung von *yyc*-Genen und insbesondere des YycFG-TCS selbst gezeigt werden konnte (ohne Nennung von Review-Artikeln).

Bakterium	Prozesse mit <i>yyc</i> -Beteiligung	Referenz
<i>Bacillus subtilis</i>	Zellteilung	(FABRET and HOCH, 1998; FUKUCHI et al., 2000; FUKUSHIMA et al., 2008)
	Zellwand	(FABRET and HOCH, 1998; HOWELL et al., 2003; SZURMANT et al., 2005; BISICCHIA et al., 2007; SALZBERG and HELMANN, 2007; SZURMANT et al., 2007a; FUKUSHIMA et al., 2008)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Virulenz / Stresstoleranz	(KALLIPOLITIS and INGMER, 2001)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Biofilmbildung	(DUBRAC et al., 2007)
	Daptomycin-Empfindlichkeit ↓	(FRIEDMAN et al., 2006; MWANGI et al., 2007; GARDETE et al., 2008b; MISHRA et al., 2009)
	Membran-Zusammensetzung	(MARTIN et al., 1999)
	MLS _B -Empfindlichkeit ↑	(MARTIN et al., 2002)
	Vancomycin-Empfindlichkeit ↓	(TÜRCK, 2004; JANSEN et al., 2007; MWANGI et al., 2007; GARDETE et al., 2008b)
	Zellwand	(MARTIN et al., 1999; DUBRAC and MSADEK, 2004; DUBRAC et al., 2007; SAKATA and MUKAI, 2007; STAPLETON et al., 2007)

Tabelle 1.1 (fortgesetzt)

Bakterium	Prozesse mit <i>yyc</i> -Beteiligung	Referenz
<i>Streptococcus mutans</i>	Antibiotika-Empfindlichkeit ↑*	(I. BISWAS et al., 2008)
	Biofilmbildung	(SENADHEERA et al., 2005; AHN and BURNE, 2007; SENADHEERA et al., 2007)
	Kohlenhydrat-Stoffwechsel	(SENADHEERA et al., 2005; SHEMESH et al., 2006; SENADHEERA et al., 2007)
	Kompetenz	(SENADHEERA et al., 2005; SENADHEERA et al., 2007)
	Oxidative Stresstoleranz	(DENG et al., 2007; SENADHEERA et al., 2007)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Temperaturstress-Toleranz	(I. BISWAS et al., 2008)
	Kompetenz	(ECHENIQUE and TROMBE, 2001; WAGNER et al., 2002)
	Membran-Zusammensetzung / Fettsäurebiosynthese	(MOHEDANO et al., 2005)
	Virulenz	(WAGNER et al., 2002; KADIOGLU et al., 2003)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Zellwand	(NG et al., 2003; NG et al., 2004; NG et al., 2005)
	Osmostress-Toleranz	(M. LIU et al., 2006)
	Zellwand	(M. LIU et al., 2006)

*Empfindlich gegenüber Cefotaxim, Cefuroxim, Ceftazidim, Meropenem, Mezlocillin, Penicillin und Trimethoprim.

Während für *B. subtilis* das YycFG-TCS bisher als einzig essentielles TCS beschrieben wurde, konnte interessanterweise für *S. aureus* mit YhcSR ein neues, zweites essentielles TCS nachgewiesen werden (SUN et al., 2005). Da über die Funktion des YhcSR-TCS in *S. aureus* noch sehr wenig bekannt ist, wurde für dessen weitere Charakterisierung jüngst ein Shuttle-Vektorsystem und Biolumineszenz-Reportersystem (*luxABCDE*) etabliert, um die regulatorischen Effekte des YhcSR-TCS durch die Expression von *yhcS*-antisense-RNA zukünftig näher untersuchen zu können (YAN et al., 2009).

1.5 Strukturelle Organisation der orthologen *yyc*-Operons

1.5.1 Die Einteilung der *yyc*-Operons in zwei Klassen

Um die Funktion der orthologen YycFG-TCS in den diversen Organismen besser verstehen zu können, ist es wichtig zu wissen, dass die *yyc*-Operons in den verschiedenen Organismen auch unterschiedlich strukturiert sind. Innerhalb des Phylums der Firmicutes, bei den Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt, geht man für die strukturelle Organisation des *yyc*-Operons bei *Bacillus*, *Listeria*, *Lactobacillus* und *Oceanobacillus* mindestens von einem

5-Cistron aus, das die Gene *yycFGHIJ* umfasst (WINKLER and HOCH, 2008). Interessant ist, dass die *yyc*-Operons der genannten Gattungen mit dem orthologen *yycK*-Gen (*yyxA/htrA*) aber potentiell noch über ein 6. Cistron verfügen. Diesbezüglich herrscht aber Uneinigkeit in der aktuellen Literatur (DUBRAC et al., 2008; WINKLER and HOCH, 2008). Einigkeit bezüglich des Umfangs des *yyc*-Operons herrscht indes bei den anderen Gattungen mit orthologen *yyc*-Genen. So geht man bei *Staphylococcus*, *Enterococcus*, von einem 5-Cistron aus (*yycFGHIJ*) und bei *Streptococcus* umfasst das *yyc*-Operon lediglich die Gene *yycFG* und *yycJ* (NG and WINKLER, 2004; SZURMANT et al., 2005; DUBRAC et al., 2008; WINKLER and HOCH, 2008).

Aufgrund der Komplexität des jeweiligen *yyc*-Operons und den Eigenschaften der YycG-Histidin-Kinase kann man eine Unterteilung in zwei *yyc*-Operon-Klassen vornehmen. In der häufiger auftretenden und komplexeren Klasse I, ist neben dem Responseregulator YycF auch die YycG-Kinase essentiell (SZURMANT et al., 2005). Ferner zeichnet sich die YycG-Kinase durch den Besitz von zwei Transmembran-Domänen aus, die eine extraplasmatische Schleife flankieren, die bei den unterschiedlichen Organismen 142 – 154 Aminosäurereste umfasst (NG and WINKLER, 2004). In der weniger häufig vorkommenden und weniger komplexen Klasse II, ist nur der Responseregulator YycF essentiell, und die YycG-Kinase besitzt lediglich eine Transmembran-Domäne und keine extraplasmatische Schleife (NG and WINKLER, 2004; SZURMANT et al., 2005). Bei den Klasse I-Operons liegen stromabwärts von *yycFG* noch die Gene *yycHIJ* bzw. *yycK*, während es bei den Klasse II-Operons lediglich das *yycJ*-Gen ist (NG and WINKLER, 2004; SZURMANT et al., 2005). Eine Übersicht über den allgemeinen Aufbau des Klasse I- und des Klasse II-*yyc*-Operons gibt Abbildung 1.3. Eine Ausnahme von der Regel ist das Bakterium *Lactococcus lactis* (auch Abbildung 1.3), dessen orthologes YycG-Protein zwar zwei Transmembran-Domänen besitzt, dessen *yyc*-Operon aber nicht die Gene *yycI* und *yycH* umfasst und deshalb eher der Klasse II zugeordnet werden muss (NG and WINKLER, 2004; SZURMANT et al., 2005). Ferner ist bei dem YycG-Ortholog von *L. lactis* auch untypisch, dass die extraplasmatische Schleife mit vier Aminosäureresten extrem kurz ausfällt (NG and WINKLER, 2004). Interessanterweise gibt es Parallelen zwischen dem YycFG-TCS der grampositiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt und dem konservierten MtrAB-TCS, das innerhalb der Actinobakterien, also bei grampositiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt, bei *Streptomyces*, *Mycobacterium* und *Corynebacterium* vorkommt (WINKLER and HOCH, 2008). Eine Übersicht über den strukturellen Aufbau des MtrAB/LpqB-Operons und den Klasse I- und Klasse II-*yyc*-Operons ist ebenfalls in Abbildung 1.3 gegeben. Interessant ist auch, dass der Responseregulator MtrA nicht in allen

Actinobakterien essentiell ist. So konnte für *Mycobacterium tuberculosis* zwar eine Essentialität festgestellt werden (ZAHRT and DERETIC, 2000), während für *Corynebacterium glutamicum* mit einer *mtrAB*-Doppel-Deletionsmutante gezeigt wurde, dass keines der Gene essentiell ist, auch wenn es zu Defekten in der Zellhülle und bei der Osmoprotektion kam (MÖKER et al., 2004).

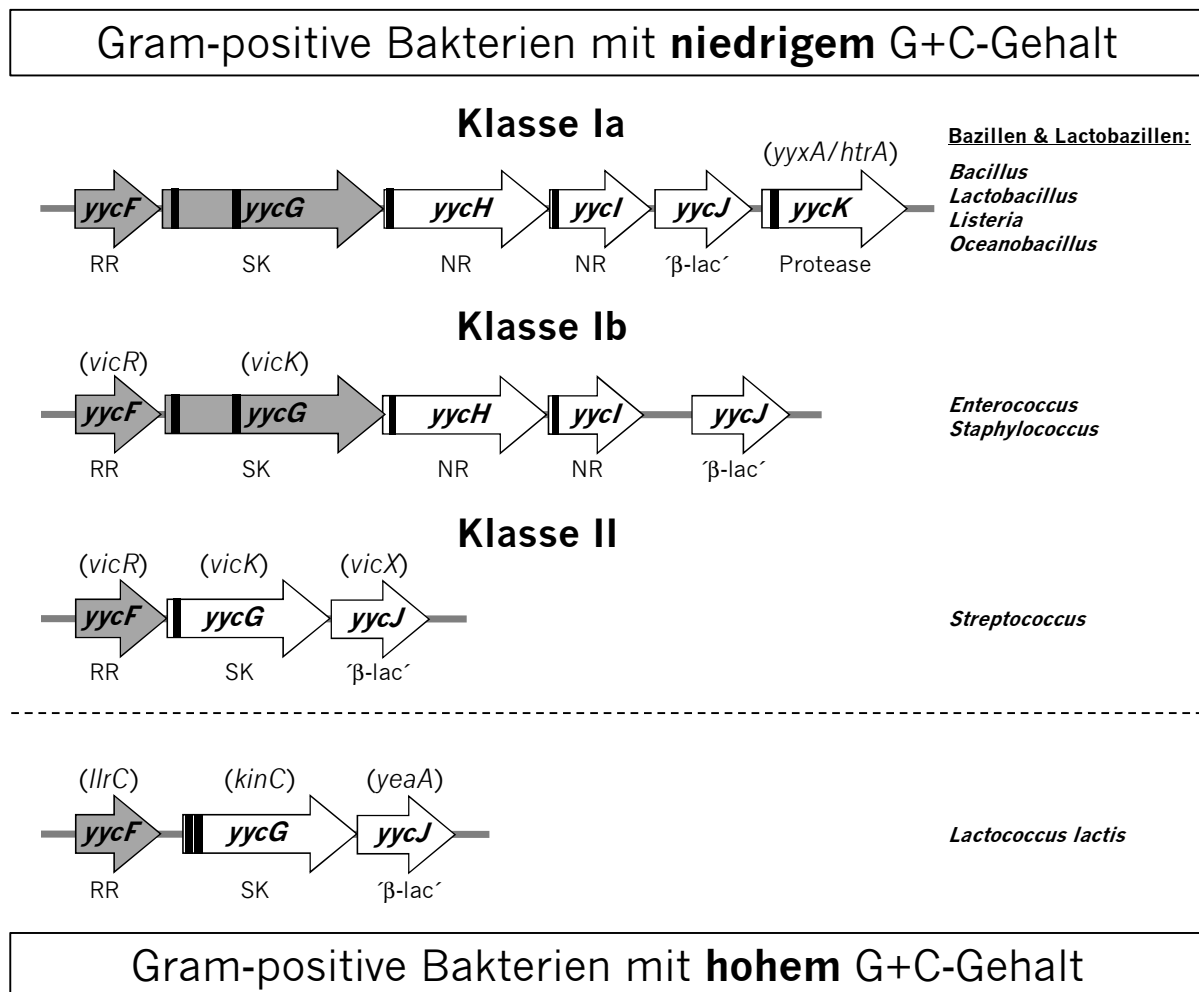


Abbildung 1.3: Strukturelle Organisation der *yyc*-Operons und des *mtrAB/lpqB*-Operons im Phylum Firmicutes. Einteilung in die *yyc*-Operon-Klassen I und II nach SZURMANT et al. (2005). Ferner erfolgte hier die Differenzierung in die Subklassen Ia und Ib, um darauf zu verweisen, ob es sich um ein 5- oder 6-Cistron handelt.

RR = Response-Regulator; SK = Sensor-Histidin-Kinase; NR = putativer Negativ-Regulator; 'β-lac' = Ähnlichkeit zur Enzym-Superfamilie, die auch Metallo-β-Lactamasen beinhaltet; Protease = Serin-Protease; LP = konserviertes Lipoprotein. Bereiche, die für Transmembran-Domänen codieren sind als „schwarze Balken“ dargestellt. Die Darstellung der Operon-Organisation erfolgte anhand der Referenzsequenzen von *Bacillus subtilis* 168 (NC_000962), *Staphylococcus aureus* N315 (NC_002745), *Streptococcus pneumoniae* R6 (NC_003098), *Lactococcus lactis* II1403 (NC_002662), *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (NC_006958); Zugang unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Eine Übersicht und eine Einteilung in die beiden *yyc*-Operon-Klassen ist für die orthologen YycG-Proteine, die in den vollständig sequenzierten Genomen von Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt gefunden wurden, in Tabelle 1.2 gegeben.

Tabelle 1.2: Orthologe YycG-Proteine aus den vollständig sequenzierten Genomen von Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt nach NG und WINKLER (2004); hier modifiziert und ergänzt. Die Einteilung in die *yyc*-Operon-Klassen I und II erfolgte nach SZURMANT et al. (2005). Die Klasse I wurde jedoch in die Subklassen Ia (6-Cistron) und Ib (5-Cistron) unterteilt, um zu berücksichtigen, ob in der jeweiligen Gattung ein zu *yycK* orthologes Gen (*yyxA/htrA*) vorhanden ist – siehe auch Abbildung 1.3.

Accession #	Organismus	Operon-Klasse	Locus-Tag
NC_003997	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	Ia	BA5714
NC_004722	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	Ia	BC5462
NC_002570	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	Ia	BH4026
NC_000964	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	Ia	Bsu40400
NC_004668	<i>Enterococcus faecalis</i> V583	Ib	EF1194
NC_005362	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	Ia	LJ0066
NC_004567	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Ia	Lp_0037
NC_002662	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> II1403	II*	L0124
NC_003212	<i>Listeria innocua</i> Clip11262	Ia	Lin0316
NC_003210	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	Ia	Lmo0288
NC_004193	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	Ia	OB3451
NC_002745	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315	Ib	SA0018
NC_012121	<i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> TM300	Ib	Sca_2455
NC_004461	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Ib	SE0019
NC_007168	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435	Ib	SH0018
NC_007350	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305	Ib	SSP0022
NC_004368	<i>Streptococcus agalactiae</i> NEM316	II	Gbs0742
NC_004350	<i>Streptococcus mutans</i> UA159	II	SMU.1516
NC_003098	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	II	Spr1106
NC_002737	<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS	II	SPy_0529

*Die YycG-Kinase von *Lactococcus lactis* ist eine Ausnahme, da es zwar zu den 3-cistronischen Klasse II-*yyc*-Operons gehört, aber im Gegensatz zu den anderen orthologen YycG-Angehörigen dieser Klasse durch den Besitz von zwei Transmembran-Domänen gekennzeichnet ist und mit vier Aminosäureresten eine ungewöhnlich kurze extraplasmatische Schleife besitzt (NG and WINKLER, 2004; SZURMANT et al., 2005). Siehe hierzu auch Abbildung 1.3.

1.5.2 Die Expression der *yyc*-Gene in *B. subtilis* und *S. aureus*

So viel bei den diversen Organismen über die Struktur des jeweiligen *yyc*-Operons bekannt ist, so wenig weiß man über die Expression der Gene in diesen Organismen. Bei *Bacillus subtilis* konnten bezüglich der Expression der Gene des *yyc*-Operons zwei das Operon

flankierende Terminatoren, zwei Promotoren und drei Transkripte ausgemacht werden (Abbildung 1.4). Zwei unterschiedlich lange Transkripte stammen dabei vom σ^A -abhängigen Promotor, der stromaufwärts von *yycF* gelegen ist. Das kurze Transkript umfasst lediglich *yycFG*, während das lange Transkript mit *yycFGHIJK* das komplette Operon abdeckt. Ein möglicher σ^G -Promotor liegt stromaufwärts von *yycK*, und von dort geht das dritte und kürzeste Transkript aus (DUBRAC et al., 2008).

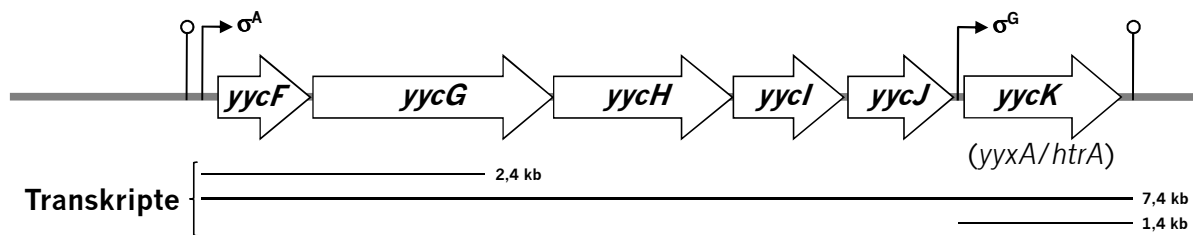


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des *yyc*-Operons von *Bacillus subtilis* nach FUKUCHI et al. (2000) und DUBRAC et al. (2008). Das *yyc*-Operon ist flankiert von zwei potentiellen Terminator-Strukturen. Die beiden vorgeschlagenen, unabhängigen Promotoren des Operons liegen stromaufwärts von *yycF* (σ^A) und stromaufwärts von *yycK* (σ^G). Die Längen der drei Transkripte, die für *B. subtilis* nachgewiesen wurden und die das *yyc*-Operon zu unterschiedlichen Anteilen umfassen, sind unterhalb der Gene eingezeichnet.

Für das *yyc*-Operon von *S. aureus* ist lediglich ein putativer σ^A -Promotor stromaufwärts von *yycF* beschrieben (MARTIN et al., 1999). Eine *in silico*-Operon-Vorhersage für *S. aureus* Mu50 besagt ferner, dass die Gene *yycFGHI* polycistronisch und *yycJ* monocistronisch exprimiert werden (WANG et al., 2004). Für die Expression eines polycistronischen *yycFGHI*-Transkripts sprechen auch eigene Arbeiten. So konnten wir zeigen, dass die Integration der Insertionssequenz IS256 stromaufwärts von *yycF* und stromabwärts des putativen σ^A -Promotors in *S. aureus* SA137/93A zur Bildung eines potenten Hybridpromotors (TÜRCK, 2004) und zur Überexpression von *yycFGHI* führt (JANSEN et al., 2007).

1.5.3 Die mögliche Funktion und Rolle der YycHIJK-Proteine

Bei den auxiliären Proteinen YycH und YycI handelt es sich um extraplasmatische Proteine mit einer N-terminalen Transmembran-Domäne, die nur in den *yyc*-Operons der Klasse I vertreten sind (NG and WINKLER, 2004; SZURMANT et al., 2005). Bei *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *yycH* zu Defekten in der Zellwandbiosynthese führte, die auf eine Überregulation der YycG-Kinase hindeuteten (SZURMANT et al., 2005). Zusammen mit anderen Befunden wurde deshalb geschlossen, dass die auxiliären

Proteine mit der YycG-Kinase interagieren und bezüglich deren Aktivität wahrscheinlich negative Regulatoren darstellen (SZURMANT et al., 2005; SZURMANT et al., 2007a). Ein direkter Einfluss auf die Phosphorylierungsaktivitäten der YycG-Kinase konnte bis dato aber noch nicht gezeigt werden. Bei der Regulation der YycG-Kinase könnten einige interessante Eigenschaften des YycI-Proteins eine Rolle spielen. So besitzt YycI im Bereich der Dimer-Schnittstelle eine 20 Å große Bindetasche, die von einem Chlorid-Ion eingenommen wird und eine mögliche Rolle bei der Ligandenbindung und Regulation besitzen könnte (SZURMANT et al., 2007b). Ferner besitzt YycI eine negativ geladene Oberfläche, ähnlich wie für die PhoQ-Domäne von *Salmonella typhimurium* beschrieben, und könnte so an der Membran über die Assoziation mit Ca^{2+} -Ionen auch über die Ladungsabstoßung insgesamt zu einer Signalwahrnehmung (charge-repulsion sensing mechanism) und Regulation der YycG-Kinase führen (SZURMANT et al., 2007b). Auch wenn es sich bei diesen speziellen Mechanismen um Spekulationen handelt und die Details der Interaktion mit der YycG-Kinase noch aufgeklärt werden müssen, bleibt die Tatsache bestehen, dass von den YycHI-Proteinen ein negativer regulatorischer Effekt auf die YycG-Kinase von *B. subtilis* ausgeht, der wahrscheinlich über die Transmembran-Domänen der YycGHI-Proteine vermittelt wird (SZURMANT et al., 2005; SZURMANT et al., 2007a; SZURMANT et al., 2008). Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *S. aureus* ist es wahrscheinlich, dass die orthologen YycHI-Proteine in *S. aureus* eine ähnliche Funktion auf dessen YycG-Kinase ausüben. In Abbildung 1.5 ist eine Übersicht über die Struktur der YycHI-Proteine von *B. subtilis* und ein mögliches regulatorisches Modell der Interaktion mit der YycG-Kinase dargestellt.

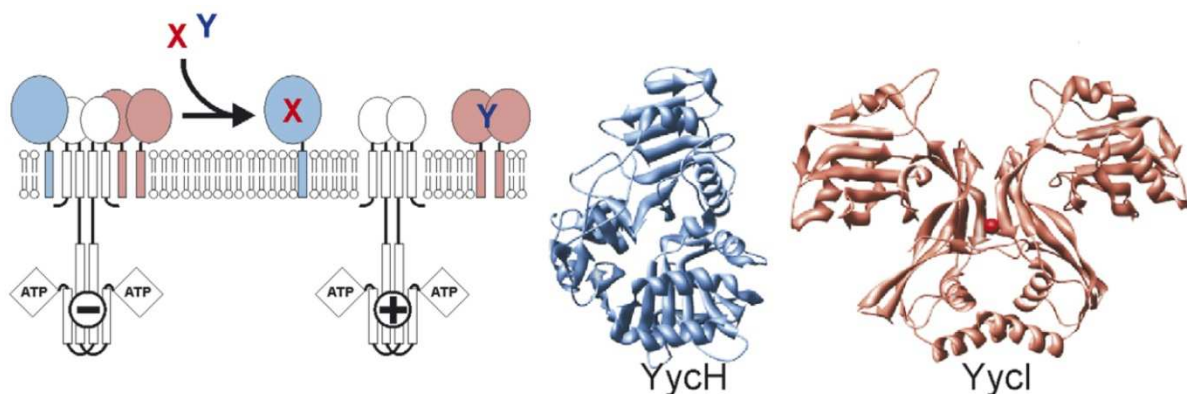


Abbildung 1.5: Struktur und ein Modell der möglichen regulatorischen Funktion der auxiliären Proteine YycH (Monomer) und YycI (Dimer) bei *B. subtilis*. Durch die Interaktion der YycHI-Proteine mit der Sensor-Histidin-Kinase YycG wird deren Aktivität reprimiert. Die Anbindung der putativen Liganden „X“ und „Y“ an die YycHI-Proteine führt zur Auflösung des ternären YycGHI-Komplexes und der Freigabe der Kinaseaktivität von YycG. Abbildung aus SZURMANT et al. (2007b).

Die ausschließliche Anwesenheit der auxiliären Proteine YycH und YycI in den Klasse I-*yyc*-Operons könnte darauf hindeuten, dass in den Klasse II-*yyc*-Operons ein anderes Signal durch die YycG-Kinase wahrgenommen wird, und dass die Regulation der Kinase-Aktivität einem anderen Mechanismus unterliegt.

Die Funktion des YycJ (VicX) Proteins ist bis dato unbekannt. Es ist aber bekannt, dass YycJ ein Mitglied der Metallo- β -Lactamase-Superfamilie ist, die neben β -Lactamasen auch Proteasen und Serin-Proteasen einschließt (DAIYASU et al., 2001; NG and WINKLER, 2004; SZURMANT et al., 2005). In *B. subtilis* (Klasse I-*yyc*-Operon) beeinflusst die Deletion von YycJ die Kolonie-Morphologie, ferner kam es so zur Akkumulation von Mutationen, die die Sporulation verhinderten (SZURMANT et al., 2007a). In *Streptococcus* (Klasse II-*yyc*-Operon) konnte eine Reihe von Effekten beobachtet werden, die dafür sprechen, dass YycJ zumindest eine unspezifische Rolle bei der Signalerkennung zu spielen scheint (WINKLER and HOCH, 2008). In *S. aureus* hingegen führte eine Deletion von YycJ bezüglich der Zellmorphologie und der Resistenz gegenüber oxidativen Stress zu keinem beobachtbaren Phänotyp (DUBRAC et al., 2008).

Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, gibt es in der Literatur keine einheitliche Meinung darüber, ob das *yycK*-Gen (*yyxA/htrA*) bei *Bacillus*, *Listeria*, *Lactobacillus* und *Oceanobacillus* tatsächlich zu den Klasse I-*yyc*-Operons gehört und damit ein 6-Cisron bildet (DUBRAC et al., 2008; WINKLER and HOCH, 2008). Gesichert ist hingegen, dass bei *Staphylococcus*, *Enterococcus* und *Lactobacillus* ein zu *yycK* orthologes Gen (*yyxA/htrA*) fehlt (DUBRAC et al., 2008). Obwohl YycK für *S. aureus* somit keine Rolle spielt, sei nachfolgend kurz auf den Kenntnisstand zu YycK eingegangen. Für das YycK-Protein ist bekannt, dass es sich um eine Serin-Protease handelt (SZURMANT et al., 2005), die zum HtrA-Typ gehört und bei *Listeria monocytogenes* eine Rolle in der Stressantwort auf Hitze, Säure bzw. Penicillin G spielt und in die Pathogenität an sich involviert ist (STACK et al., 2005).

1.6 Die bakterielle Zellwand – Synthese, Abbau, Zellteilung und das YycFG-TCS

Der Peptidoglykan-Sacculus (Murein), oder auch schlicht die Zellwand oder Zellhülle der Gram-positiven Bakterien, ist im Gegensatz zu der Zellwand der Gram-negativen Bakterien, die nur aus wenigen Schichten besteht, ein dreidimensionales Makromolekül, das aus bis zu 40 Schichten besteht, die untereinander quervernetzt sind (SCHLEGEL, 1992; JORDAN et al., 2008). Das Peptidoglykan hat eine Dicke von etwa 50 nm und dient der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Zelle, da es einem Zellinnendruck von bis zu 20 atm entgegenwirkt (JORDAN et al., 2008). Da das YycFG-TCS von *S. aureus* auch eine wichtige Rolle in der Homöostase der Zellwand, also bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes von Biosynthese und dem Abbau des Peptidoglykans (Zellteilung) bei *S. aureus* und *B. subtilis* spielt (BISICCHIA et al., 2007; DUBRAC et al., 2007; FUKUSHIMA et al., 2008; JORDAN et al., 2008) bzw. es auch Spekulationen darüber gibt, ob die Komponente der Zellwandbiosynthese Lipid II (C₅₅-Undecaprenyl-Pyrophosphat-N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid) ein mögliches Signal für die YycG-Sensor-Histidin-Kinase darstellen könnte (DUBRAC et al., 2008), wird nachfolgend auf die Biosynthese, auf die Autolyse des Peptidoglykans und auf die Zellteilung bei *S. aureus* bzw. *B. subtilis* eingegangen.

Da eine detaillierte Beschreibung der Biosynthese und des chemischen Aufbaus der Zellhülle von Gram-positiven Bakterien weit über den einleitenden Teil dieser Arbeit hinausgehen würde, sei an dieser Stelle zu Details dieser Prozesse auf eine Anzahl von aktuellen und sehr guten Reviews zu diesem Thema hingewiesen (VAN HEIJENOORT, 2007; BARRETEAU et al., 2008; BOUHSS et al., 2008; VOLLMER et al., 2008a). Daneben werden in der Literatur auch Einblicke in die Evolution der Peptidoglykan-Biosynthese unter dem selektiven Druck von Antibiotika (MAINARDI et al., 2008) und wie es zu den Abweichungen in den Zellformen bei den Kokken (Staphylo-, Lacto-, Strepto-, Entero-) kommt (ZAPUN et al., 2008) gegeben. Eine Übersicht über die Komplexität der Zellwandbiosynthese und der beteiligten Enzyme und Komponenten vermittelt Abbildung 1.6. Die Peptidoglykansynthese lässt sich allgemein in drei Stadien unterteilen: (I) Die Synthese von löslichen Zellwandvorläufern im Cytoplasma, (II) Membran-assoziierte Synthese-Schritte, die auch den Transport der Peptidoglykan-Bausteine über die Cytoplasmamembran in den extrazellulären Raum beinhalten und (III) die finale Polymerisation der Baueinheiten.

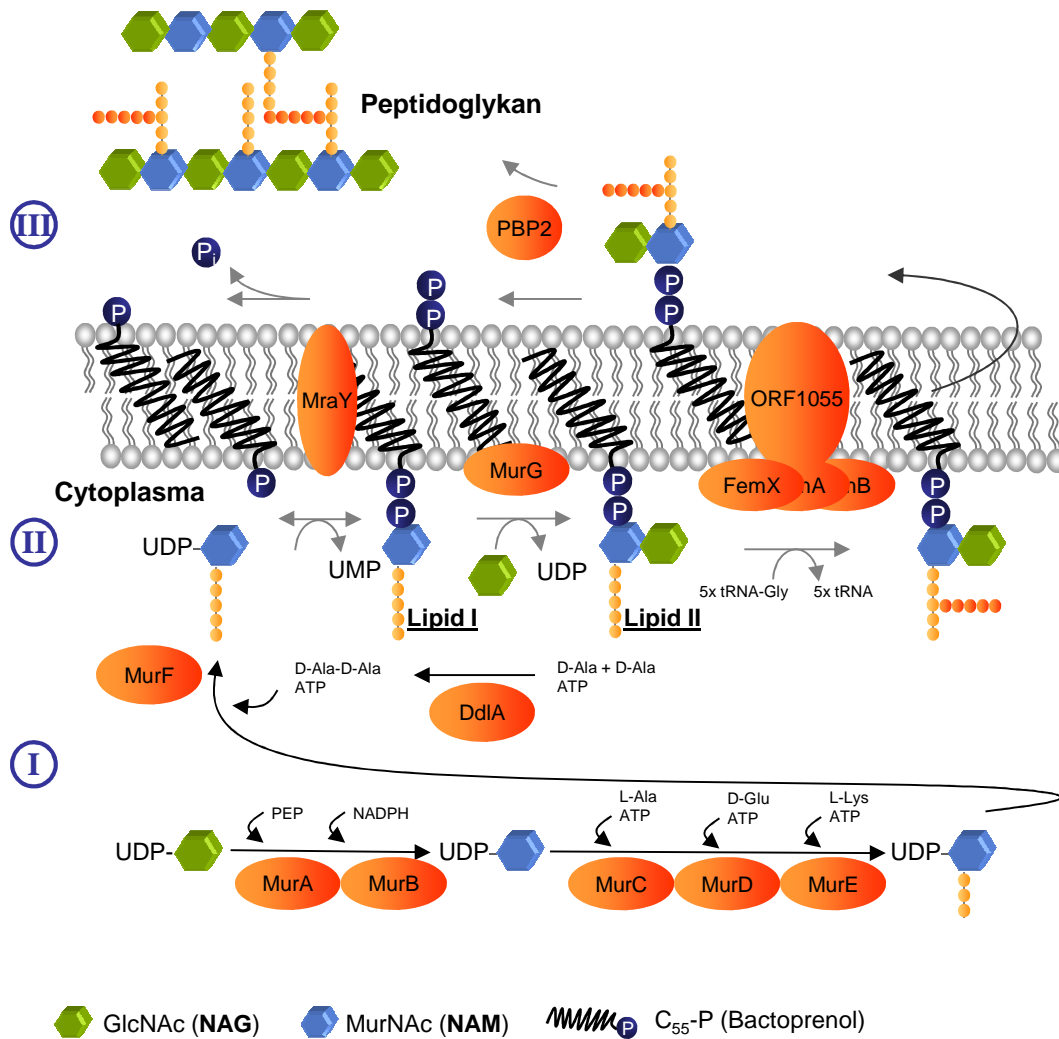


Abbildung 1.6: Peptidoglykan-Biosynthese bei *S. aureus*. Abbildung von DR. TANJA SCHNEIDER modifiziert und ergänzt von DR. IMKE WIEDEMANN.

Die Aktivität des YycFG-TCS bezüglich der Zellwand umfasst nach dem aktuellen Kenntnisstand weniger die biosynthetischen Prozesse, die dem Aufbau dienen, als vielmehr die Regulation der Prozesse, die insbesondere bei der Zellteilung beim Abbau und der Restrukturierung des Peptidoglykan beteiligt sind. Bei *S. pneumoniae* konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, dass die Expression des *pcsB*-Gens, welches für die Zellwand-Hydrolase (das Autolysin) PcsB codiert, vom YycFG-TCS kontrolliert wird und deshalb auch den essentiellen Charakter von YycF begründet (NG et al., 2003; NG et al., 2004; NG et al., 2005). Ferner wurde jüngst für die Rolle des YycFG-TCS bei der Koordinierung der Zellteilung und der Aufrechterhaltung der Homöostase der Zellwand in *B. subtilis* ein Modell vorgeschlagen (FUKUSHIMA et al., 2008), das in Abbildung 1.7 dargestellt ist. Dieses Modell geht mit den Erkenntnissen der gleichen Studie einher, dass die YycG-Histidin-Kinase mit FtsZ, einem Protein, das die Zellteilung initiiert, im Septum der sich teilenden Zellen co-

lokalisiert ist. Interessant ist, dass die Aktivität der YycG-Kinase auch in Abhängigkeit zu ihrer Nähe zum Septum der Zellteilung steht (FUKUSHIMA et al., 2008). Wie genau es dort zu einer Aktivierung der YycG-Kinase kommt, ist aber noch ungeklärt. Möglicherweise könnte im Bereich des Septums, wie spekuliert, tatsächlich Lipid II als bei der Zellwandbiosynthese beteiligter Baustein wahrgenommen werden (DUBRAC et al., 2008). Dafür könnte auch sprechen, dass die Lokalisation von YycG im Septum unabhängig von den beiden negativen Regulatoren YycH und YycI erfolgt, was darauf hindeutet, dass diese beiden Proteine nur unter Bedingungen, bei denen keine Zellteilung stattfindet, zur Inhibierung der YycG-Kinase führen (FUKUSHIMA et al., 2008). Dies wäre dahingehend stimmig, als dass es nur zur Inhibierung der zum YycFG-Regulon gehörenden – bewiesenen und putativen – Zellwand-Hydrolasen (Autolysine) (HOWELL et al., 2003; DUBRAC and MSADEK, 2004; BISICCHIA et al., 2007; DUBRAC et al., 2007; SAKATA and MUKAI, 2007) kommt, wenn keine Zellteilung stattfindet. Ferner wird die Homöostase der Zellwand auch dadurch gewährleistet, dass zusätzlich der Inhibitor der Autolysin-Aktivität YoeB, der durch das YycFG-TCS reprimiert wird, wieder verstärkt exprimiert werden kann wenn sich die Zelle nicht teilt (BISICCHIA et al., 2007; SALZBERG and HELMANN, 2007).

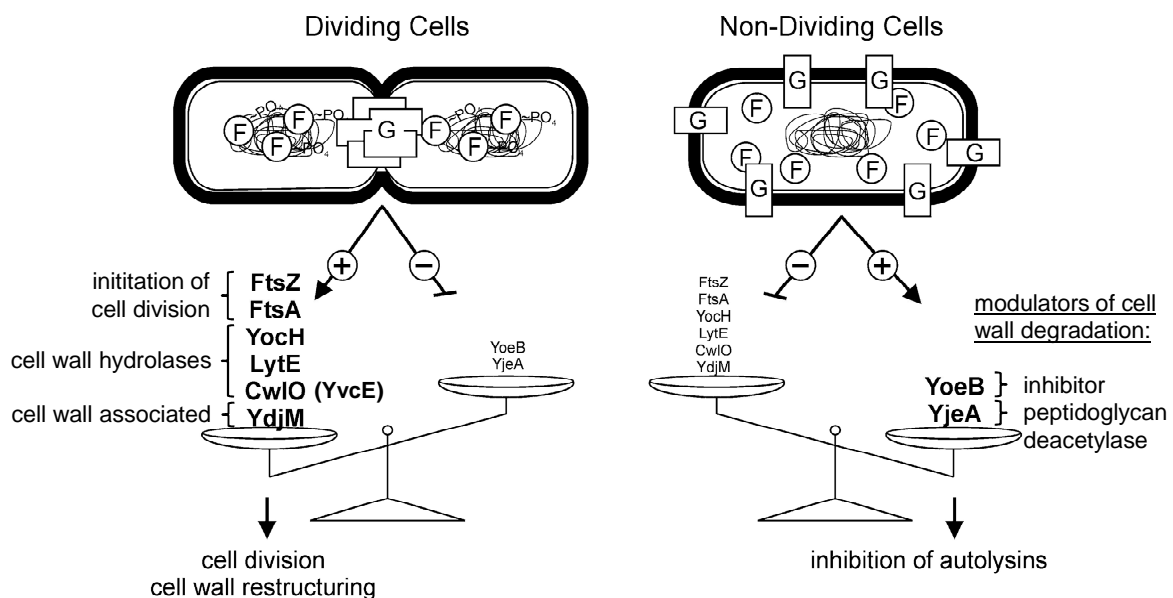


Abbildung 1.7: Modell für die Rolle des YycFG-TCS in der Koordination der Zellteilung und der Homöostase der Zellwand in *Bacillus subtilis*. Abbildung aus FUKUSHIMA et al. (2008). Die Details zu den involvierten Genen des YycFG-Regulons wurden aus BISICCHIA et al. (2007) entnommen.

Für eine detailliertere Übersicht über die Funktion der Zellwand-Hydrolasen (Autolysine), sei auf die Literatur verwiesen (FIRCZUK and BOCHTLER, 2007; VOLLMER et al., 2008b), dort finden sich auch Verweise auf die Funktion des Autolysins AtlA in der Biofilmbildung bei Staphylo- und Streptokokken (R. BISWAS et al., 2006; AHN and BURNE, 2007). Da sich diese Arbeit speziell mit dem YycFG-TCS von *S. aureus* befasst, und da das Peptidoglykan von *S. aureus* mit der Penta-Glycinbrücke zu den Zellwänden von anderen Bakterien eine strukturelle Besonderheit besitzt (MADIGAN et al., 2003), ist in Abbildung 1.8 eine schematische Darstellung der *S. aureus*-Zellhülle mit den bewiesenen und putativen Zellwand-Hydrolasen (Autolysinen) gegeben.

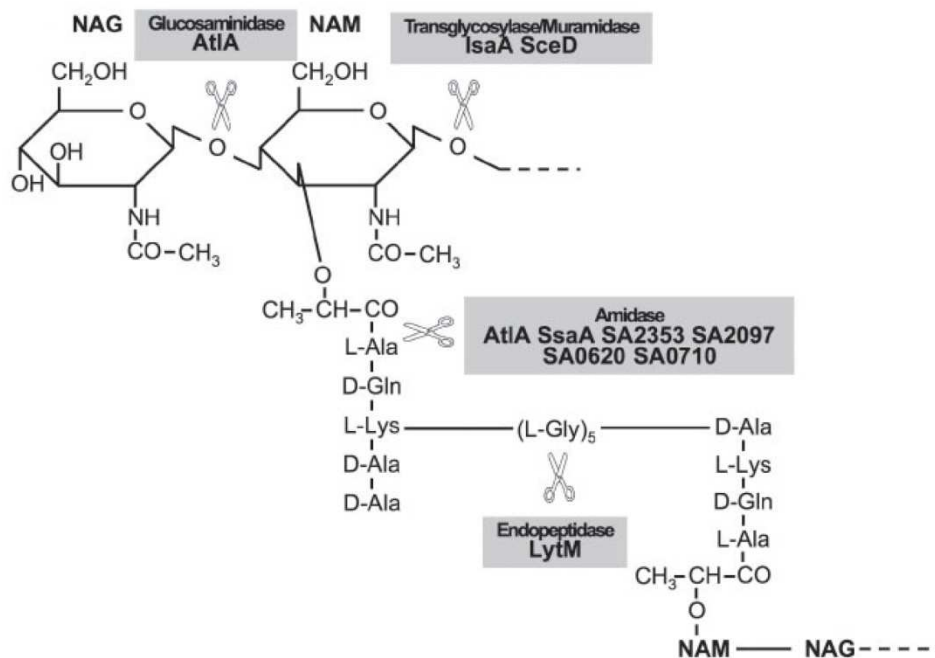


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des Peptidoglykan von *S. aureus*. Eingezeichnet sind Aktivitäten von nachgewiesenen und putativen Zellwand-Hydrolasen, die zum YycFG-Regulon gehören. NAG = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), NAM = N-Acetylmuraminsäure (MurNAc). Abbildung aus DUBRAC et al. (2007).

1.7 Ziel dieser Arbeit

Die zunehmende Resistenzentwicklung von *S. aureus*-Stämmen spielt, wie dargelegt, im klinischen Alltag eine große Rolle und das essentielle YycFG-TCS hat bereits seit seiner Entdeckung im Jahre 1998 durch FABRET und HOCH große Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da es bereits seit diesem Zeitpunkt als Ziel von neuen oder modifizierten Antibiotika angesehen wird. Insbesondere durch die nahezu ubiquitäre Verbreitung des YycFG-TCS im Phylum der Firmicutes, in der Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem

G+C-Gehalt, die einige bedeutende humanen Krankheitserregern wie *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. mutans* und *Listeria monocytogenes* umfasst, sind genaue Kenntnisse über das YycFG-TCS notwendig, um neuen oder modifizierten Antibiotika nicht nur eine breite Angriffsfläche, sondern auch eine größtmögliche Effizienz zu verschaffen. Trotz der hohen Relevanz und der intensiven Erforschung der orthologen YycFG-TCSs in den diversen Bakterien, bleiben noch viele Fragen bezüglich der Funktion unbeantwortet. Insbesondere die Organisation in zwei unterschiedlich strukturierte Operon-Klassen, erschwert z.B. die Übertragbarkeit von Ergebnissen, die für Streptokokken gewonnen wurden, auf Staphylokokken. Die Zielsetzung dieser Arbeit umfasste deshalb zunächst, mit Hilfe von *yycFG*-Überexpression-Mutanten, zu überprüfen, inwieweit sich die Erkenntnisse z.B. in Bezug auf die oxidative Stresstoleranz und die Biofilmbildung (siehe Tabelle 1.1) aus *Streptococcus* mit seinem Klasse II-*yyc*-Operon auch auf das Klasse I-*yyc*-Operon von *Staphylococcus aureus* übertragen lassen. Neben dieser eher phänotypisch geprägten Charakterisierung des YycFG-TCS von *S. aureus* sollten nachfolgend die Proteine des TCS selbst und die auxiliären Proteine YycH und YycI verstärkt in den Fokus der Untersuchungen gerückt werden. Das erklärte Ziel war es, alle Proteine des polycistronischen Teils des *yyc*-Operons, also YycFGHI, erstmalig vollständig rekombinant zu exprimieren, um nachfolgend Versuche zu den Protein-Protein-Interaktionen vornehmen zu können. Diese Experimente sollten neben grundlegenden Versuchen mit den rekombinanten Proteinen selbst auch die Etablierung eines ersten Modells mit geeigneten Bedingungen umfassen, die für die YycG-Kinase die vollen *in vitro*-Phosphorylierungsaktivitäten erlauben. Darauf aufbauend sollte die Etablierung eines zweiten Modellsystems umgesetzt werden, das auch dem Charakter der YycGHI-Proteine als Membranproteine gerecht werden kann. Neben den ersten Beweisen, dass diese beiden Modell-Systeme geeignete Bedingungen für die Untersuchungen der Proteineigenschaften bereitstellen, sollte so letztendlich die Perspektive für ein experimentelles Testsystem geschaffen und aufgezeigt werden, durch das zukünftig die Fragen bezüglich der Protein-Protein-Interaktionen des YycFGHI-Systems untereinander, aber auch die Frage nach dem Signal oder den möglichen Signalen, die zur Aktivierung dieses Systems führen, näher untersucht werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikaliennachweis

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid : Bisacrylamid (37,5:1), 40 % (w/v)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Agar, Bacto™	Becton, Dickinson & Company (BD), Heidelberg
Agarose, Top Vision™, LE GQ	Fermentas, St. Leon-Rot
Ammoniumphosphat, #75568	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampuwa®-Wasser, "PCR-H ₂ O"	Fresenius Kabi, Bad Homburg
ATP, A7699	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
[γ ³³ P]ATP	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
APS	Bio-Rad, München
Bio-Beads SM-2	Bio-Rad, München
BioScript™, Reverse Transkriptase	Bioline, Luckenwalde
Bradford-Reagenz, Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (für Phosphatrest)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
BSA, # 1.12018.0100 Albumin Fraktion V (Rind)	Merck, Darmstadt
C ₅₅ -P (M _G = 881 g/mol)	Dr. Tanja Schneider / AG Sahl, Universität Bonn
Conalbumin, #27695	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Daptomycin, Cubicin®	Cubist, Lexington, MA (USA)
DMPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Amersham Biosciences, Freiburg
DNase I, from bovine pancreas	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
n-Dodecyl- β -D-Maltosid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT (DL-), #43819	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Filtersupports, Drain Disc 10mm PE, #230300	Whatman, Vertrieb über Labomedic, Bonn
Formaldehyd (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega, Mannheim
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hydroxyurea	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG	Fermentas, St. Leon-Rot
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Lactoglobulin B, L8005	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipid II (M _G = 1876 g/mol)	Dr. Tanja Schneider / AG Sahl, Universität Bonn
Lipidextrakt aus <i>E. coli</i> , polarer	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL (USA)
Lysostaphin	Genmedics, Reutlingen
Lysozym, #62971	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methylviologen (Paraquat), #856177	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Chemikalie	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Molekulargewichtsstandards, diverse	Fermentas, St. Leon-Rot
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Nucleopore® PC Track-Etched Membrane, 19 mm (0.4 µm)	Whatman, Vertrieb über Labomedic, Bonn
Nukleotide (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
Ovalbumin, A5253	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Primer, DNA-Oligonukleotid-	Metabion, Martinsried
Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Vertrieb über NEB, Frankfurt am Main
Restriktionsenzyme u. Puffer	Roche, Mannheim / Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A, from bovine pancreas	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNase-Out™, rekombinanter RNase Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Röntgenfilm, Hyperfilm MP (18x24 cm)	GE Healthcare, München
Safranin O	Merck, Darmstadt
T4-DNA-Ligase + 10x Reaktionspuffer	Roche, Mannheim
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED	Bio-Rad, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Fa. Merck (Darmstadt) im Reinheitsgrad per analysis bezogen.

2.2 Gerätenachweis

Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammer (40 ml)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Agarosegelelektrophoresekammer, Model B3 (60 ml)	OWL, Vertrieb: Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Gene Pulser™ (Elektroporation)	Bio-Rad, München
Membran-Vakuumpumpe MZ 2C	Vaccubrand GmbH, Wertheim
Mini Extruder	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL (USA)
Miniloader 2000P (Entwicklungsautomat f. Röntgenfilme)	Kodak GmbH, Stuttgart
Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell	Bio-Rad, München
Multifuge 1 S-R (Rotor #75003348 & FA12.94)	Heraeus / Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (220-750 nm)	NanoDrop Technologies Inc., DE, Wilmington (USA)
Photometer, UV-160	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
Power Pac 200 (Stromversorgung, Gelelektrophorese)	Bio-Rad, München
Pulse Controller (Elektroporation)	Bio-Rad, München
Reinstwasseranlage, MilliQ Biocel System A10	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.
Schüttelwasserbad SW20 und SW22	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Schüttler, Certomat U	B. Braun, Melsungen

Gerät	Hersteller
Schüttler, Titertek	Flow Laboratories, Meckenheim
SensoQuest Thermocycler (labcycler)	SensoQuest Biomed. Elektronik GmbH, Göttingen
Sonifier™ W250, Schallkopf Type "102"	Branson über Heinemann Labortechnik, Schw. Gmünd
Sorvall Evolution (Rotor SLC-4000)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Sorvall Discovery M120SE (Rotor S80 AT-3 & S120 AT-2)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Thermoblock SHT200D	Stuart Scientific, Staffordshire (UK)
Thermocycler, PCR Express	Hybaid / Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
UV-Imager, ImageMaster VDS	Amersham Biosciences, Freiburg
UV-Tisch, Chroma 43 (302 nm)	Vetter GmbH, Wiesloch
Vortexer, MS 2 Minishaker	IKA - Werke GmbH & Co. KG, Staufen
XCell SureLock® Mini-Cell (Elektrophoresekammer)	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifuge RVC 2-18, Typ 100218	Christ, Osterode

2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Staphylococcus aureus</i>		
SA137/93A	Klinisches hVISA Isolat, Norddeutscher Epidemietyp, Met ^R , <i>spa</i> -Typ: t051, MLST: ST247	(BIERBAUM et al., 1999; REIPERT et al., 2003)
SA137/93G	Spontane Mutante von SA137/93A, ΔSSCmec, Met ^S , VISA, Δ <i>tcaA</i> , <i>spa</i> -Typ: t051, MLST: ST247	(BIERBAUM et al., 1999; REIPERT et al., 2003; MAKI et al., 2004)
SA1450/94	Norddeutscher Epidemietyp (EMRSA-5, -7, Iberian), Met ^R , <i>spa</i> -Typ: t051, MLST: ST247	(COOKSON et al., 2007)
8325-4 SH1000	abgeleitet von Stamm 8325-4, <i>rsbU</i> ⁺ , <i>agr</i> -Typ I	(HORSBURGH et al., 2002)

hVISA = heterogenously Vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*, Met^R = Methicillin-resistant, Met^S = Methicillin-susceptible, MLST = Multilocus sequence typing.

Fortsetzung auf der folgenden Seite

Tabelle 2.1 (fortgesetzt)

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
K12 JM109	Zwischenwirt zum Klonieren, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ^- , $\Delta(lac-proAB)$, F', <i>traD36</i> , <i>proA⁺B⁺</i> , <i>lacIqZΔM15</i>	(YANISCH-PERRON et al., 1985)
BL21(DE3)	B834-abgeleiteter Vielzahlstamm zur rekombinanten Genexpression, λ DE3-lysogen, T7-RNA-Polymerase Gen (unter Kontrolle des <i>lacUV</i> - Promotors)	(STUDIER and MOFFATT, 1986)
C41(DE3)	BL21(DE3) abgeleiteter Stamm zur Expression von toxischen Proteinen und Membranproteinen	(MIROUX and WALKER, 1996)
C43(DE3)	BL21(DE3) abgeleiteter Stamm zur Expression von toxischen Proteinen und Membranproteinen	(MIROUX and WALKER, 1996)

2.3.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Die zugehörigen Vektorkarten sind im Anhang (Abschnitt 7.5) aufgeführt.

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pTX15	durch Xylose induzierbarer Staphylokokken-Vektor, Tet ^R , Kontrollvektor	(PESCHEL et al., 1996)
pTvicRK	durch Xylose induzierbare Überexpression von <i>yycFG</i> (<i>vicRK</i>) aus <i>S. aureus</i> SA137/93A	(TÜRCK, 2004)
pTvicRK(Y306N)	durch Xylose induzierbare Überexpression von <i>yycFG</i> (<i>vicRK</i>), nicht-stiller Nukleotid-Austausch (T916A) in <i>yycG</i> führt zum AS-Austausch Y306N in YycG (VicK)	(TÜRCK, 2004)
pREP4	synthetisches Plasmid, Kan ^R	Fa. Qiagen
pREP4groESL(MT)	pREP4 mit den konstitutiv exprimierten den Chaperon-codierenden Genen <i>groES</i> und <i>groEL</i>	diese Arbeit
pET22bΔpelB	pET22b abgeleiteter Expressionsvektor mit C-terminalen 6xHis-Tag, Deletion der <i>pelB</i> -Leadersequenz, T7 <i>lac</i> -Promotor, Amp ^R	(SASS and BIERBAUM, 2007)
pET22 bΔpelBvicR	pET22bΔpelB mit <i>vicR</i> aus <i>S. aureus</i> SA137/93A	diese Arbeit

Amp^R = Ampicillin-resistent, Kana^R = Kanamycin-resistent, Tet^R = Tetracyclin-resistent.

Tabelle 2.2 (fortgesetzt)

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pET22bΔpelBvicK	pET22bΔpelB mit <i>vicK</i> aus <i>S. aureus</i> SA137/93A	diese Arbeit
pET22bΔpelBvicK(Y308N)	pET22bΔpelB mit <i>vicK</i> (T916A) von pTvicRK(Y306N) führt konstruktionsbedingt zum AS-Austausch Y308N in YycG (VicK).	diese Arbeit
pET22bΔpelB <i>yycH</i>	pET22bΔpelB mit <i>yycH</i> aus <i>S. aureus</i> SA137/93A	diese Arbeit
pET22bΔpelB <i>yycI</i>	pET22bΔpelB mit <i>yycI</i> aus <i>S. aureus</i> SA137/93A	diese Arbeit
pUC19gyrB	Kopienstandard in der qRT-PCR	(JANSEN et al., 2007)

2.3.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Oligonukleotid-Primer die in dieser Arbeit verwendet wurden

Primer	Primersequenz (5' → 3')	Annealing Temp.	Referenz
a) Klonierungsprimer für die rekombinante Proteinexpression mit pET22bΔpelB:			
vicR-For	AAACCATGGGTATGCAAATGGCTAG (<i>NcoI</i>)	70,1 °C	diese Arbeit
vicR-Rev	CGACTCGAGCTCATGTTGTTGGAGG (<i>XhoI</i>)	70,1 °C	diese Arbeit
vicK-For	GGTCCATGGGAATGAAGTGGCTAAA (<i>NcoI</i>)	65,5 °C	diese Arbeit
vicK-Rev	TCCCTCGAGTTCATCCAATCACCG (<i>XhoI</i>)	65,5 °C	diese Arbeit
yycH-For	CACCCATGGGTGTGAAGTCATTGAA (<i>NcoI</i>)	70,1 °C	diese Arbeit
yycH-Rev	GTTCTCGAGTTCAAGCCTCCCATCG (<i>XhoI</i>)	70,1 °C	diese Arbeit
yycI-For	GGCCCATGGGAATGAACTGGAACT (<i>NcoI</i>)	53,0 °C	diese Arbeit
yycI-Rev	TTCCTCGAGATGATTAATAATTTTA (<i>XhoI</i>)	53,0 °C	diese Arbeit
b) Sequenzierungsprimer für die pET22bΔpelB-abgeleiteten Plasmide:			
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGG	n. b.	Fa. Novagen
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCG	n. b.	Fa. Novagen
vicK innen	GCTTTAGCATTTAATAACTTGTCTA	n. b.	diese Arbeit
c) Klonierungsprimer für die konstitutive Expression von <i>groESL</i> auf pREP4groESL(MT):			
groESL-For	CTTGCTAGCAGGAGAGTTATCAATGAATATTCG (<i>NheI</i>)	57,3 °C	diese Arbeit
groESL-Rev	GCAGTCGACTTACATCATGCCGCCATG (<i>Sall</i>)	57,3 °C	diese Arbeit

Fortsetzung auf der folgenden Seite

Tabelle 2.3 (fortgesetzt)

Primer	Primersequenz (5' → 3')	Annealing Temp.	Referenz
d) Sequenzierungsprimer für das <i>groESL</i> konstitutiv exprimierende Plasmid pREP4 <i>groESL</i> (MT):			
pREP4_ <i>groESL</i> -For	CACATATTCTGCTGACGCACCGGTG	n. b.	diese Arbeit
pREP4_ <i>groESL</i> -Rev	AATCCGTCGGCATCCAGGAAACCAG	n. b.	diese Arbeit
<i>groESL</i> _innen	AACTGATCGCTGAAGCGATGGACAA	n. b.	diese Arbeit
e) Primer in den quantitativen Real-Time-PCRs (qRT-PCRs):			
<i>gyrB</i> -297	TTAGTGTGGGAAATTGTCGATAAT	51,0 °C	(GOERKE et al., 2006)
<i>gyrB</i> -547	AGTCTTGTGACAATGCGTTTACA	51,0 °C	(GOERKE et al., 2006)
<i>vicK</i> -1-RT	CGGTCGAAATGTCCAGAGGTAAC	51,0 °C	(JANSEN et al., 2007)
<i>vicK</i> -2-RT	CTTCTTTCGCCATACCAAGCATC	51,0 °C	(JANSEN et al., 2007)
lip/pT <i>vic</i> -5'-RT	CGAATGATGGCTTGGTATCTG	51,0 °C	diese Arbeit
lip/pT <i>vic</i> -3'-RT	TGCGTTCTTTGTGCTTTCTG	51,0 °C	diese Arbeit
<i>yycH</i> -5'-RT	CTATAAGCAAAGATCGCCACGA	51,0 °C	diese Arbeit
<i>yycH</i> -3'-RT	ACTACGAACGATGGTTGAATCG	51,0 °C	diese Arbeit

2.4 Stammhaltung und Medien

Von allen verwendeten Bakterienstämmen wurden, soweit nicht bereits vorhanden, Dauerkulturen mit einer Endkonzentration von 50 % (v/v) Glycerin angelegt und bei -70 °C gelagert. Jeweils vor Versuchsbeginn wurden ausgehend von den Dauerkulturen frische Arbeitsplatten oder Flüssigkulturen angelegt. Die Inkubation der Zellen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei 37 °C. Flüssigkulturen wurden zusätzlich mit 150 – 160 rpm geschüttelt (Fa. B.Braun, Certomat U). In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Medien aufgeführt.

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Medien

Medium	Typische Zusammensetzung laut Hersteller
Brain Heart Infusion (Fa. BD; Bacto™ BHI) (BHI)	Calf Brain (Infusion from 200.0 g) 7.7 g/l, Beef Heart (Infusion from 250.0 g) 9.8 g/l, Proteose Peptone 10.0 g/l, Dextrose 2.0 g/l, Sodium Chloride 5.0 g/l, Disodium Phosphate 2.5 g/l; pH 7.4 ± 0.2
Brain Heart Infusion (Fa. Oxoid; CM0225) (BHI)	Calf Brain (Infusion solids) 12.5 g/l, Beef Heart (Infusion solids) 5.0 g, Proteose Peptone 10.0 g/l, Glucose 2.0 g/l, Sodium Chloride 5.0 g/l, Disodium Phosphate 2.5 g/l; pH 7,4 ± 0.2
Luria-Bertani-Medium (LB)	10.0 g/l Bacto™ Tryptone (BD); 5.0 g/l Yeast Extract Powder LP0021 (Oxoid); 10.0 g/l NaCl; pH adjusted to 7.5
Müller-Hinton-Bouillon (Fa. Oxoid; CM0405) (MH)	Beef, dehydrated infusion from 300 g/l, Casein hydrolysate 17.5 g/l, Starch 1.5 g/l; pH 7.3 ± 0.1
Tryptone-Soya-Broth (Soybean-Casein Digest Medium) (Fa. Oxoid; CM0129) (TSB)	Pancreatic digest of casein 17.0 g/l, Enzymatic digest of soybean meal 3.0 g/l, Sodium chloride 5.0 g/l, Dipotassium phosphate 2.5 g/l, Glucose 2.5 g/l; pH 7.3 ± 0.2
Blutagar (Fa. BD; #221165)	BBL™ Columbia Agar with 5% Sheep Blood

Für die Herstellung von Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 14 g/l Agar-Agar (Fa. BD; Bacto™ Agar) zugegeben. Falls notwendig, erfolgte nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur des Agar von 55 °C die Supplementierung mit einem Antibiotikum oder mehreren Antibiotika. Der Agar wurde anschließend zum Erkalten in sterile Petrischalen (Fa. Greiner Bio-One; 94x16 mm, Polystyren) gegossen.

2.5 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.5.1 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit dem Presto Spin D Bug Kit (Fa. Molzym) nach den Angaben des Herstellers. Für die Präparation wurden von einer ÜN-Kultur 1 – 2 ml abgeerntet (Fa. Heraeus, Multifuge 1 S-R; Microliter Rotor #75003348, 15300 rpm, 1 min, RT, Acc. 9, Br. 9) und eingesetzt. Bei Zellen von *S. aureus* erfolgte zur Unterstützung des

Zellaufschlusses vor dem lytischen Schritt des Protokolls die Zugabe von 5 – 10 µl Lysostaphin [5 mg/ml] (Fa. Genmedics) zum resuspendierten Pellet und eine Inkubation bei 37 °C im WB für 30 – 60 min. Die weitere Präparation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Qualität und Ausbeute der präparierten DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese (2.5.3) und durch photometrische Messung mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Fa. NanoDrop Technologies; Vertrieb über Fa. Peqlab) bestimmt (2.5.6).

2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Für die Präparation wurden von einer ÜN-Kultur 2 – 4 ml abgeerntet (Fa. Heraeus, Multifuge 1 S-R; Microliter Rotor #75003348, 15300 rpm, 1 min, RT, Acc. 9, Br. 9) und eingesetzt. Bei Zellen von *S. aureus* erfolgte zur Unterstützung des Zellaufschlusses vor dem lytischen Schritt des Protokolls die Zugabe von 5 µl Lysostaphin [5 mg/ml] (Fa. Genmedics) zum resuspendierten Pellet und eine Inkubation bei 37 °C im Wasserbad für 30 – 60 min. Die weitere Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Qualität und Ausbeute der präparierten DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese (2.5.3) und durch photometrische Messung mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Fa. NanoDrop Technologies; Vertrieb über Fa. Peqlab) bestimmt (2.5.6).

2.5.3 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten und Plasmiden erfolgte in horizontalen Gelsystemen der Fa. Peqlab. In Abhängigkeit von den spezifischen Fragmentgrößen wurden 0,8 – 3,0 %ige Agarosegele verwendet. Für die Herstellung der Gele und zur Elektrophorese selbst wurde TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) (SAMBROOK et al., 1989) ausgehend von einer 50-fach konzentrierten Vorratslösung zu einer Gebrauchslösung in einfacher Konzentration verdünnt. Zur Bestimmung der Bandengrößen wurden diverse, handelsübliche Größenstandards (z.B. der Fa. Fermentas) mit definierten Fragmentgrößen verwendet. Zum Anfärben der DNA-Fragmente wurden die Gele in 0,01 – 0,02 %igen Ethidiumbromid-Lösung inkubiert und unter UV-Licht mit dem ImageMaster VDS System (Fa. Amersham Biosciences) dokumentiert.

2.5.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden unter UV-Licht (Fa. Vetter GmbH; UV-Tisch Chroma 43) aus dem Gel ausgeschnitten und dann in die Aufreinigung eingesetzt. Hierfür wurde das MinElute® Gel Extraction Kit oder das QIAquick® Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.5 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA

Um PCR-Produkte und Plasmid-DNA für nachfolgende Anwendungen von Salzen, Primern, Nukleotiden, Polymerasen, Restriktionsendonukleasen etc. zu befreien und um die DNA aufzukonzentrieren, wurden für DNA-Fragmentgrößen von 70 bp – 4 kb das MinElute® Purification Kit (Fa. Qiagen) und für Fragmentgrößen von 100 bp – 10 kb das QIAquick® Purification Kit (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.6 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von DNA und RNA wurden photometrisch durch Messung der Absorption bei 260, 230 und 280 nm mit dem Photometer (Fa. NanoDrop Technologies; NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Vertrieb durch Fa. Peqlab) bestimmt. Für eine $A_{260} = 1$, die bei einem neutralen pH-Wert in einem salzarmen Milieu gemessen wurde, gelten folgende Konzentrationen: 50 µg/ml bei doppelsträngiger (ds) DNA, 40 µg/ml bei RNA, 33 µg/ml bei einzelsträngiger (ss) DNA und ~ 20 µg/ml bei Oligonukleotiden. Ein Grad für die Reinheit sind die Werte, die sich aus den Quotienten A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} ergeben. Der Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt den Grad der Verunreinigung mit Proteinen an und sollte bei einer qualitativ guten Präparation von RNA oder DNA in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Dabei kann diese Angabe je nach Literatur leicht nach oben oder unten abweichen. Als weiterer Indikator für Verunreinigungen, z.B. mit Polysacchariden, kann der Quotient aus A_{260}/A_{230} herangezogen werden. Dieser sollte bei einer qualitativen Präparation in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

2.5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Durchführung von PCR-Reaktionen wurden der PCRexpress Thermal Cycler (Fa. Hybaid/Thermo Fisher Scientific) oder der SensoQuest Labcycler (Fa. SensoQuest)

verwendet. Für die Amplifizierung wurden als Enzyme, nebst den zugehörigen Puffern, die GoTaq®-Polymerase (Fa. Promega) oder die PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase (Fa. Finnzymes, Vertrieb durch NEB) nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung von Standardprotokollen (SAMBROOK et al., 1989) eingesetzt. Die in dieser Arbeit im Rahmen von PCR-Anwendungen verwendeten Oligonukleotid-Primer (Fa. Metabion) sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

2.5.8 Restriktion und Ligation von DNA

Für Restriktionsverdauung bei den Klonierungen wurden Restriktionsendonukleasen nebst den zugehörigen Reaktionspuffern der Fa. Roche und der Fa. Fermentas nach Angaben des jeweiligen Herstellers verwendet. Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden die T4-DNA-Ligase und der dazugehörige Reaktionspuffer der Fa. Roche verwendet. Alle DNA-Manipulationen erfolgten nach gängigen Standardmethoden (SAMBROOK et al., 1989).

2.5.9 DNA-Sequenzierung

Zur spezifischen Analyse von Genabschnitten wurde genomische DNA, Plasmid-DNA oder mittels PCR amplifizierte DNA aufgereinigt bzw. hergestellt und nach dem Prinzip der Dideoxy-Methode zur Kettenabbruchsynthese (SANGER et al., 1977) von der Fa. Sequiserve (Vaterstetten) sequenziert.

2.5.10 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden 500 ml LB-Medium (im 2 l-Erlenmeyerkolben) ausgehend von einer ÜN-Kultur 1:100 angeimpft und im Wasserbad unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,65 inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellkultur für 20 – 30 min auf Eis inkubiert und nachfolgend mittels Zentrifugation (Fa. Thermo Fisher Scientific, Sorvall Evolution; Rotor SLC-4000, 6000 rpm, 6 min, 4 °C, Acc. 3, Br. 1) geerntet. Das Pellet wurde in 500 ml eiskaltem aq. dest. resuspendiert und erneut zentrifugiert (8000 rpm, 6 min, 4 °C, Acc. 3, Br. 1). Es folgte die Resuspension in 250 ml eiskaltem aq. dest. und die erneute Zentrifugation (10000 rpm, 6 min, 4 °C, Acc. 3, Br. 1). Das Pellet wurde in 20 ml eiskaltem 10 %igen (v/v) Glycerin resuspendiert, in ein steriles 50 ml-Falcontube überführt und abzentrifugiert (Fa. Heraeus, Multifuge 1 S-R; Rotor

FA12.94, 6000 rpm, 15 min, 4 °C, Acc. 9, Br. 1). Das Pellet wurde in 0,8 ml eiskalten 10 %igen (v/v) Glycerin resuspendiert, in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen à 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.5.11 Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Die natürliche Kompetenz von Bakterien, freie DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen und in ihr Erbgut zu integrieren, ist unter normalen Wachstumsbedingungen meist nur sehr gering ausgeprägt. Für Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* stellt die Elektroporation eine effektive und effiziente Methode zur Transformation dar.

Zur Elektroporation von *E. coli*-Zellen wurde ein 50 µl-Aliquot mit elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µl Ligationsansatz oder 1 µl Plasmid-DNA versetzt, in eine Elektroporationsküvette (Fa. Peqlab, #71-2020, 25x2 mm Elektrodenlücke) überführt und mit 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF elektroporiert (Fa. Bio-Rad; GenePulser™ & Pulse Controller™). Bei erfolgreichen Transformationen lag die Zeitkonstante zwischen 4,2 und 4,8 ms. Die Zeitkonstante ist definiert als die Zeitspanne, in der die beim elektrischen Puls angelegte Spannung von ihrem maximalen Ausgangswert auf 37 % abfällt. Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen umgehend in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein steriles Reagenzglas überführt und zur Regeneration für 1 – 2 h bei 37 °C unter Schütteln (Fa. B.Braun, Certomat U, 150-165 rpm) inkubiert. Zur Selektion von erfolgreich transformierten Zellen wurden diese auf LB-Agarplatten (mit dem Plasmid-spezifischen Antibiotikum) ausplattiert. Bei Ligationsansätzen erfolgte dies: unverdünnt, 1:10 verdünnt, 1:100 verdünnt und als Konzentrat. Zum Verdünnen wurde LB-Medium verwendet. Zur Aufkonzentrierung wurde die restliche Zellsuspension zentrifugiert (Fa. Heraeus, Multifuge 1 S-R; Microliter Rotor #75003348, 15300 rpm, 1 min, RT, Acc. 9, Br. 9), der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl LB aufgenommen. Bei Ansätzen unter Verwendung von Plasmid-DNA erfolgte eine serielle Verdünnung (10^{-1} – 10^{-5}) des Transformationsansatzes mit LB-Medium, und jeweils 100 µl der 10^{-3} - bis 10^{-5} -Verdünnungen wurden zur Selektion ausplattiert. Die Selektionsplatten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert.

2.5.12 Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. aureus*

Ausgehend von ÜN-Kulturen wurden 20 ml BHI½ + Tet. [25 µg/ml] (im 100 ml-Erlenmeyerkolben) mit den Stämmen 8325-4 SH1000pTvicRK, 8325-4 SH1000 pTvicRK(Y306N) und 8325-4 SH1000pTX15 angeimpft und bis zum Erreichen der gewünschten OD im Wasserbad (Fa. Julabo, SW20 oder SW22) bei 37 °C unter Schütteln mit 150 rpm inkubiert. Bei *S. aureus*-Zellen entspricht eine OD₆₀₀ von 1 etwa 2x10⁹ Zellen/ml. Für die Präparation von Gesamt-RNA wurden maximal 2x10¹⁰ Zellen abgeerntet. Zur Stabilisierung und zum Schutz der RNA wurde das abzuerntende Volumen der Zellkultur unmittelbar vor der Ernte in Falcontubes überführt, mit dem doppelten Volumen des auf 37 °C vorgewärmten RNAprotect® Bacteria Reagent (Fa. Qiagen) versetzt, für 5 s auf maximaler Stufe gevortext, für 5 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (Fa. Heraeus, Multifuge 1 S-R; Rotor FA12.94, 10300 rpm, 5 min, 37 °C, Acc. 9, Br. 9). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Präparation bei -70 °C gelagert.

Die Präparation der Gesamt-RNA wurde mit dem PrestoSpin R Bug Kit (Fa. Molzym) nach Angaben des Herstellers und mit den nachfolgenden Modifikationen durchgeführt. Auf die Verwendung des RS-Puffers zur Resuspension der Zellen wurde vollständig verzichtet. Stattdessen erfolgt die Resuspension der Zellen in 720 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0). Zur Unterstützung des Zellaufschlusses wurden den *S. aureus*-Zellen 80 µl Lysostaphin [5 mg/ml] (Fa. Genmedics) zugesetzt. Zur Lyse der Zellen folgte für 30 – 60 min die Inkubation im Wasserbad bei 37 °C. Danach wurde die Präparation nach Angaben des Herstellerprotokolls fortgesetzt. Die RNA wurde mit 100 – 150 µl DMPC-behandeltem MilliQ (70 °C) eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Herstellung von DMPC-behandeltem MilliQ:

Die Plastikdeckel von Glasflaschen wurden mit Chloroform benetzt; die Flaschen selbst wurden zunächst mit aq. dest. bzw. mit MilliQ gespült, mit MilliQ gefüllt und ausgehend von einer Dimethylpyrocarbonat- (DMPC; Fa. Sigma) Stammlösung (1 V DMPC mit 10 V reinem Ethanol vorgelöst) mit DMPC in einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) versetzt, verschlossen, gut geschüttelt, ÜN unter dem Abzug inkubiert und am nächsten Tag autoklaviert. DMPC reagiert mit primären und sekundären Aminen, weshalb es während der Einwirkzeit auch zur kovalenten Anbindung des DMPC an die Histidin-Reste, die sich im katalytischen Zentrum von vielen RNasen befinden, und damit zur Inaktivierung kommt. Das überschüssige DMPC zerfällt beim Autoklavieren in flüchtiges CO₂ und Methanol. Die Reaktion mit Aminen ist auch der Grund dafür, dass Puffer, die aus Komponenten bestehen,

die Aminogruppen enthalten (z.B. Tris, MOPS, EDTA, HEPES) nicht direkt mit DMPC versetzt werden können. Diese Puffer müssen mit zuvor DMPC-behandeltem Wasser angesetzt werden.

Generell erfolgten alle präparativen Arbeiten mit RNase-freien Lösungen, Reagenzien und Gefäßen. Glaswaren wurden für 6 h bei 200 °C oder für 3 h bei 250 °C sterilisiert und dadurch auch von RNasen befreit. Hitzeunverträgliche Geräte und Materialien wurden alternativ mit einer 1 %igen (v/v) H₂O₂-Lösung behandelt und mit RNase-freiem Wasser abgespült oder unter dem Abzug mit Chloroform benetzt.

2.5.13 cDNA-Synthese und Aufreinigung für die qRT-PCR

Pro Ansatz wurden 3 µg Gesamt-RNA mit Nuclease-freiem Wasser auf 11 µl aufgefüllt, mit 1 µl [0,3 µg/µl] DNA-Random-Hexamer-Primern (Fa. GE Healthcare; pd(N)₆ Random Hexamer) versetzt, für 5 min bei 65 °C inkubiert und nach dem Abkühlen auf RT mit 7,75 µl des folgenden Mixes versetzt:

Mix für 1 Ansatz:	für 12 Ansätze + 10 %
- 4,00 µl 5x Reaction Buffer (Fa. Biotin)	52,8 µl
- 1,00 µl dNTP-Mix [à 10 mM]	13,2 µl
- 1,00 µl RNaseOUT™ [40 U/µl] (Fa. Invitrogen)	13,2 µl
- 1,75 µl Nuclease-freies Wasser	23,1 µl

Bei RNaseOUT™ (Fa. Invitrogen) handelt es sich um einen rekombinanten Ribonuklease-Inhibitor.

Der Ansatz wurde für 10 min bei 25 °C inkubiert, optional für 2 min auf 42 °C vorgewärmt, mit 0,25 µl [200 U/µl] der RNA- und DNA-abhängigen DNA-Polymerase BioScript™ (Fa. Biotin; Moloney Murine Leukaemia Virus (MMLV) Reverse Transcriptase, with low RNase H activity) versetzt und zur cDNA-Erststrang-Synthese für 60 min bei 42 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 2,5 µl [500 mM, pH 8] EDTA. Zum Abbau der RNA wurden 5 µl NaOH [1 M] zugesetzt und die Ansätze für 15 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend erfolgte zur Neutralisation die Zugabe von 12,5 µl Tris/HCl [1 M, pH 7,5]. Wenn die Aufreinigung der cDNA-Syntheseansätze nicht unmittelbar erfolgte, wurden diese zwischenzeitlich bei -20 °C eingelagert.

Zur Aufreinigung der cDNA wurde das MinElute® Purification Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Jeder Ansatz wurde mit 200 µl PB-Puffer vermischt und über die Säulenmembran

zentrifugiert (Fa. Heraeus, Multifuge 1 S-R; Microliter Rotor #75003348, 15300 rpm, 1 min, RT, Acc. 9, Br. 9). Zum Waschen folgten zwei Zentrifugationsschritte mit je 750 µl PE-Puffer. Die Durchflüsse nach den Binde- und den Waschschritten wurden jeweils verworfen. Um letzte Pufferreste zu entfernen, wurde ein weiteres Mal zentrifugiert. Für die Elution wurden die Säulen auf neue 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße gesetzt, 20 µl PCR-H₂O (Fa. Fresenius Kabi, Ampuwa®-Wasser) auf die Membran pipettiert, für 1 min bei RT inkubiert und über die Membran zentrifugiert. Die eluierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.14 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Das LightCycler®-Instrument (Fa. Roche) wurde dazu verwendet, eine quantitative Bestimmung der Transkriptmengen (Kopienzahl) eines Zielgens während der Amplifizierung mit spezifischen Primern und innerhalb der log-linearen Phase einer PCR durchführen zu können. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) erfolgte unter Verwendung des LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kits (Fa. Roche). Durch den bei der PCR vorhandenen Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I können dabei der Nachweis und die Mengenbestimmung der Amplifikate in Echtzeit erfolgen. SYBR Green I lagert sich an doppelsträngige DNA an, und der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex hat eine maximale Anregungswellenlänge von 494 nm, ein sekundäres Anregungsmaximum nahe 254 nm und eine maximale Fluoreszenz-Emission bei einer Wellenlänge von 521 nm (Fa. Sigma, Product Information S1816 & S9430). Auf diese Weise kann nach jedem Elongationszyklus der PCR, d.h. vor jedem erneuten Denaturierungsschritt zum Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs, die Intensität der Fluoreszenz bestimmt werden. Von Zyklus zu Zyklus erhöht sich deshalb mit der Anzahl der amplifizierten Ziel-DNA auch die Intensität der Fluoreszenz. Ein Nachteil dieser Bestimmung ist die geringe Spezifität des Nachweises, da nicht zwischen verschiedenen PCR-Produkten unterschieden werden kann. Da die Intensität ferner auch abhängig von der Länge des Amplifikates ist, wurde von jedem Zielgen die Fluoreszenz-Intensität in direkte Relation zu definierten Kopienstandards dieses Zielgens gesetzt. Mittels einer Eichgeraden, die anhand der Kopienstandards erzeugt wurden, konnten nachfolgend über die Fluoreszenz-Intensitäten von Proben mit unbekannter Ausgangskopienzahl des spezifisch amplifizierten Zielgens die Transkriptmengen in der qRT-PCR quantifiziert werden.

Bei allen Experimenten wurde neben der absoluten Transkriptmenge des Zielgens parallel (im gleichen Lauf) und unter gleichem Vorgehen auch die absolute Transkriptmenge eines endogenen Gen-Standards bestimmt, um diese nachfolgend zueinander in Relation setzen zu können. Auf diese Weise sollten Fluktuationen bei den für ein Zielgen durchgeführten Mehrfachbestimmungen innerhalb einer und insbesondere zwischen voneinander unabhängigen, aber später zur Bildung des Mittelwertes der Transkriptmenge herangezogenen, Zellkulturen berücksichtigt werden. Als endogener Standard wurde dabei das von *S. aureus* konstitutiv exprimierte Housekeeping-Gen *gyrB* verwendet, und die quantifizierte Transkriptmenge des Zielgens wurde auf 10^6 Kopien des Housekeeping-Gens *gyrB* bezogen, um die Korrelation zueinander zum Ausdruck zu bringen.

Durchführung:

Ausgehend von den Gesamt-RNA-Präparationen (2.5.12) wurden 3 µg Gesamt-RNA mittels reverser Transkription im Rahmen einer Erststrangsynthese in cDNA umgeschrieben und aufgereinigt (2.5.13). Die so synthetisierte cDNA wurde in der qRT-PCR als Probenmaterial für die Quantifizierung der Transkriptmenge in der Ausgangskultur zum Zeitpunkt der Ernte herangezogen. Für die Verwendung der Kopienstandards in der qRT-PCR wurden diese ausgehend von Aliquots mit $2,5 \times 10^{10}$ Kopien mit je 45 µl PCR-H₂O pro Schritt seriell verdünnt ($2,5 \times 10^9 - 2,5 \times 10^3$ Kopien / 5 µl). Um das unspezifische Anbinden der DNA an die Gefäßwände zu vermindern, wurden silikonisierte Reaktionsgefäße (Fa. Sigma; T3406, Microcentrifuge tubes, extended capacity, siliconized polypropylene (1.7 ml)) verwendet. Für den qRT-PCR-Lauf mit dem LightCycler®-Instrument (Fa. Roche) wurden von jeder zu untersuchenden Probe mit unbekannter Kopienzahl des Zielgens und von jeder Verdünnung des dazugehörigen Kopienstandards 2 µl in eine Glaskapillare (Fa. Roche; LightCycler® Capillaries) pipettiert und mit 18 µl des folgenden Mixes versetzt:

<u>Mix für 1 Ansatz:</u>	<u>für 10 Ansätze + 10 %</u>
- 13,0 µl PCR-H ₂ O (Roche Kit)	143,0 µl
- 1,6 µl MgCl ₂ [25 mM] (Roche Kit)	17,6 µl
- 0,4 µl DMSO (Fa. Amersham Biosciences)	4,4 µl
- 0,5 µl Forward Primer [100 pmol/µl]	5,5 µl
- 0,5 µl Reverse Primer [100 pmol/µl]	5,5 µl
- 2,0 µl Mastermix*(Roche Kit)	22,0 µl

Zum Ansetzen des Mixes wurden silikonisierte Reaktionsgefäße verwendet (Fa. Sigma; T3281, Microcentrifuge tubes, extended capacity, siliconized polypropylene (0.65 ml). *10 µl LightCycler® FastStart Enzyme + 64 µl 10x LightCycler® FastStart Reaction Mix SYBR Green I (für 32 Ansätze à 2 µl).

Mit den *gyrB*-Kopienstandards wurde entsprechend verfahren. Die Glaskapillaren mit den Reaktionsansätzen wurden in Zentrifugenadapter überführt und kurz anzentrifugiert (Fa.

Heraeus, Multifuge 1 S-R; Microliter Rotor #75003348, max. 1000 rpm, RT, Acc. 9, Br. 9), um die Ansätze luftblasenfrei in die Kapillare zu transferieren. Zur Kontrolle wurde für die Reproduzierbarkeit der mittels der RT-PCR quantifizierten Transkriptmengen je Zielgen eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Die drei eingesetzten cDNA-Proben wurden dabei jeweils aus RNA synthetisiert, deren Präparation aus einer unabhängigen Zellkultur erfolgt war. Die PCR-Produkte wurden per Software (Fa. Roche; LightCycler® Software 3.5.3) durch die Analyse der Schmelzkurven und durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung verifiziert.

Die Primer, die in der qRT-PCR für die Synthese der Nachweisfragmente der Zielgene bzw. des endogenen Standards *gyrB* verwendet wurden, sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Für die Berechnung der Kopienzahl der Standards bzw. für die Programmparameter, die beim LightCycler®-Instrument eingestellt wurden, sei auf den Anhang verwiesen (Abschnitt 7.1).

2.6 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) gibt die geringste Konzentration eines Antibiotikums an, die unter definierten Bedingungen ausreichend ist, um ein sichtbares Wachstum eines Bakteriums zu verhindern. Die MHK-Bestimmung erfolgte mit Müller-Hinton-Bouillon als Basismedium in 96-Well-Polystyren-Mikrotiterplatten mit rundem Boden (Fa. Greiner). Ausgehend von einer ÜN-Vorkultur des zu untersuchenden Bakterienstammes wurde frisches Medium 1:200 angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Bei *S. aureus*-Zellen entspricht eine OD₆₀₀ von 1 etwa 2×10^9 Zellen/ml. Es folgte eine serielle Verdünnung ($10^{-1} - 10^{-5}$) der Zellen mit frischem Medium. Zur MHK-Bestimmung in der Mikrotiterplatte wurden in jede Vertiefung (Well): 100 µl Medium und einer darin enthaltenen, definierten Konzentration des zu testenden Antibiotikums mit 100 µl der 10^{-5} verdünnten Zellen versetzt, was einer Endkonzentration von 5×10^4 Zellen/ml entsprach. Zur optimalen Mischung der Ansätze wurden die Mikrotiterplatten für 10 min auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Fa. Flow Laboratories, Titertek) bei Stufe 5 durchmischt und für 48 h bei 37 °C bebrütet. Das Ablesen der Platten erfolgte erstmalig nach 18 h und zur abschließenden Bestimmung nach 24 bzw. 48 h.

Für ein detailliertes Protokoll zum Vorgehen bei der Ermittlung von MHKs von antimikrobiellen Substanzen sei auf die Literatur (WIEGAND et al., 2008) verwiesen.

2.7 Untersuchung der Empfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber oxidativem Stress

Zur Untersuchung, ob die Überexpression von *yycFG* einen Einfluss auf die Empfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber oxidativem Stress hat, wurden die Xylose-induzierbaren Stämme 8325-4 SH1000pTvicRK, 8325-4 SH1000pTvicRK(Y306N) und der Vektor-Kontrollstamm 8325-4 SH1000pTX15 auf Festmedien mit oder ohne 0,5 % (w/v) Xylose ausgeimpft, die ferner mit oder ohne Methylviologen (Paraquat) bzw. mit oder ohne Hydroxyurea versetzt waren. Unter aeroben Bedingungen kommt es so in Anwesenheit von Methylviologen bzw. Hydroxyurea zu einer Stressinduktion in den Bakterienzellen, deren Ausprägung phänotypisch beobachtet werden kann.

Die Mechanismen, bei denen es in Anwesenheit von O₂ zum Zellstress kommt, sind dabei grundverschieden. Im Fall von Methylviologen beruhen sie auf einer katalytischen Wirkung, bei der es durch die Reaktion mit O₂ zur Bildung von hochreaktiven Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species; ROS) kommt, wie z.B. Hyperoxid-Anionen (auch: Superoxid-Anionen; •O₂⁻), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Hydroxyl-Radikalen (•OH). ROS entstehen aber auch beim normalen Wachstum unter aerober Atmung im Stoffwechsel der Zellen (VALDERAS and HART, 2001). Der toxische Effekt von ROS beruht auf der hohen Reaktivität, indem es durch Oxidation zur Schädigung der DNA, von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Proteinen und Enzymen kommt (BUS and GIBSON, 1984).

Im Fall von Hydroxyurea (Hydroxycarbamid) hingegen spielt O₂ eine indirekte Rolle bei der Entstehung von zellulärem Stress. Durch Hydroxyurea kommt es zur Hemmung der Klasse Ib-Ribonukleotid-Reduktase (NrDEF), einem Enzym, das unter aeroben Bedingungen für das normale Wachstum von *S. aureus* notwendig ist. Die Ribonukleotid-Reduktasen stellen durch die Reduktion der 2'-Hydroxyl-Gruppe von Ribonukleotiden die für die DNA-Synthese nötigen Desoxyribonukleotide bereit. Die Klasse Ib-Ribonukleotid-Reduktase NrDEF kann nur in Anwesenheit von O₂ funktional sein, weil molekularer Sauerstoff innerhalb des Reaktionsmechanismus für die Radikalbildung im katalytischen Zentrum des Enzyms und damit zum Erhalt der Funktion an sich benötigt wird. *S. aureus* steht mit der Klasse III-Ribonukleotid-Reduktase (NrdDG) zwar ein alternatives Enzym zur Verfügung, welches jedoch nur unter anaeroben Wachstumsbedingungen voll exprimiert wird. So konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von O₂ die Transkription von *nrdDG* um mindestens den Faktor 10 verringert (MASALHA et al., 2001).

Durchführung:

Es wurden Mini-Agarplatten (Durchmesser: 5,25 cm) mit BHI½ + Tet. [25 µg/ml] mit und ohne Xylose in einer Endkonzentration von 0,5 % (w/v) hergestellt, denen Methylviologen

(Fa. Sigma) ausgehend von einer 2,5 M Stammlösung in einer Endkonzentration von 0,2 mM oder Hydroxyurea (Fa. Sigma) ausgehend von einer 0,5 M Stammlösung in einer Endkonzentration von 25 mM zugesetzt war. Ausgehend von ÜN Vorkulturen wurden 5 ml frisches BHI½ + Tet. [25 µg/ml] 1:200 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Erreichen der gewünschten OD wurden die Zellkulturen mit Medium seriell verdünnt ($10^{-1} - 10^{-5}$) und die Mini-Agarplatten mit den unterschiedlichen Verdünnungen mittels steriler Wattetupfer punktförmig angeimpft. Die Inkubation der Platten erfolgte ÜN für 24 h bei 37 °C unter aeroben und als weitere Kontrolle unter anaeroben Bedingungen (Fa. BD; GasPakTM EZ Anaerobe Container System).

2.8 Untersuchung der Biofilmbildung bei *S. aureus*

Zur Untersuchung, ob die Überexpression von *yycFG* einen Einfluss auf die Biofilmbildung von *S. aureus* hat, wurden die Xylose-induzierbaren Stämme 8325-4 SH1000pTvicRK, 8325-4 SH1000pTvicRK(Y306N) und der Vektor-Kontrollstamm 8325-4 SH1000pTX15 in Anwesenheit oder Abwesenheit von 0,5 % (w/v) Xylose in die Versuche eingesetzt. Dazu wurde Flüssigmedium aus einer BHI-Charge hergestellt, die sich durch experimentellen Befund als besonders geeignet für die Bildung von *S. aureus*-Biofilmen erwiesen hat (Fa. Oxoid; BHI, CM225, Lot/Ch.-B.: 283622). Als Trägermaterial für die Biofilmbildung wurden 96-Well-Polystyren-Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, F96 MicroWellTM Plates, Polystyrene Clear, #167008) verwendet. Ausgehend von ÜN-Vorkulturen wurden 5 ml frisches BHI + Tet. [25 µg/ml] mit oder ohne Xylose, z.T. auch mit Glucose supplementiert, 1:200 mit Zellsuspension versetzt, gevortext und je Vertiefung mit 180 µl beschickt. Die Inkubation der Platten erfolgte ÜN für 24 h bei 37 °C unter aeroben, O₂-limitierten (7 % CO₂) und anaeroben Bedingungen (Fa. BD; GasPakTM EZ Anaerobe Container System). Nach der Inkubation wurde das Medium vollständig entfernt und jede Vertiefung der Mikrotiterplatte zweimal mit je 200 µl Puffer WP (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen. Nach Verwerfen des Puffers wurden die Platten bei 37 °C für 45 min getrocknet. Zum Färben der Biofilme wurden die Vertiefungen für 30 s mit je 80 µl 0,1 % (w/v) Safranin O (Fa. Merck) inkubiert und nach Verwerfen der Färbelösung erneut mit 180 µl Puffer WP gewaschen und getrocknet.

2.9 Biochemische Arbeitstechniken

2.9.1 Rekombinante Überexpression der C-His₆-getaggtten Yyc-Proteine

2.9.1.1 Der *groESL* konstitutiv exprimierende Vektor pREP4groESL(MT)

Basierend auf der Methodik einer Literaturstelle (AMREIN et al., 1995) sollten das bakterielle Chaperon GroEL und dessen Cofaktor GroES in den in dieser Arbeit für die rekombinante Expression von *S. aureus*-Proteinen verwendeten *E. coli*-Stämmen exprimiert werden, um die Löslichkeit der exprimierten Proteine zu erhöhen. Konkret sollte so die Bildung von sogenannten „inclusion bodies“, also hochmolekularen, unlöslichen Proteinaggregaten, verhindert oder zumindest vermindert werden, um so die Ausbeuten an verwertbarem, löslichen Protein für die Aufreinigung und die nachfolgenden Versuche zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurde als Ausgangsvektor für die Klonierung ebenfalls das Plasmid pREP4 (Fa. Qiagen) verwendet, das in dem pQE-Expressionssystem (Fa. Qiagen; The QIAexpress System) im Rahmen der Genexpressionskontrolle eingesetzt wird und dort als Träger des *lacI* codierten Inhibitors zur in *trans*-Repression des auf den pQE-Expressionsplasmiden codierten T5-Promotors dient. Im Gegensatz zu AMREIN et al. (1995) wurde das Plasmid allerdings so konstruiert, dass es keine induzierbare Coexpression, sondern eine konstitutive Expression von *groESL* ermöglicht. Um diesen Unterschied kenntlich zu machen, wurde das resultierende Plasmid pREP4groESL(MT) genannt. Die konstitutive Expression von *groESL* hat den Vorteil, dass im Expressionsstamm weniger zelluläre Ressourcen auf die Transkription und Translation des Chaperons und mehr Ressourcen auf die Expression des eigentlichen Zielproduktes verwandt werden. So bleibt der Vorteil der Coexpression von GroESL erhalten, und zusätzliche Chaperone zur korrekten Faltung der rekombinanten Proteine stehen im Expressionsstamm zur Verfügung. Es handelt sich zwar bei dem originären pREP4 um ein „low-copy“ Plasmid, aber trotzdem gewährleisten mehrere Kopien pro Zelle, dass es im pQE-Expressionssystem zu einer starken Regulation der rekombinanten Expression kommt (Fa. Qiagen; The ExpressionistTM Handbook 06/2003). Für die konstitutive Expression von *groESL* anstelle von *lacI* kann also für das pREP4groESL(MT) Plasmid eine gleich hohe Kopienzahl und ein positiver Effekt auf die Löslichkeit der rekombinant exprimierten Proteine vorausgesetzt werden.

Eine Vektorkarte von pREP4 und pREP4groESL(MT) befindet sich im Anhang (7.5.3 und 7.5.4).

2.9.1.2 Der Proteinexpressionsvektor pET22b

Der C-terminal His₆-getaggte Proteinexpressionsvektor pET22b gehört zu einer Familie von kommerziell verfügbaren Vektoren, die für das Klonieren und die Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* verwendet werden. Die Entwicklung des pET-Systems (Merck-Novagen, Darmstadt) geht auf die Forschungen von STUDIER und Kollegen (STUDIER and MOFFATT, 1986; ROSENBERG et al., 1987; STUDIER et al., 1990) zurück. Das Grundprinzip bei all diesen Vektoren beruht darauf, dass ein Zielgen mittels Klonierung in ein pET-Plasmid eingebracht und so unter die Expressionskontrolle des starken Bakteriophagen-Promotors T7 gebracht wird. Die sehr hohe Spezifität des T7-Promotors für die T7-RNA-Polymerase sorgt dafür, dass das Zielgen nur in Anwesenheit von dieser transkribiert wird. Im Vektor pET22b befindet sich die für sechs Histidin-Reste (His₆) codierende Sequenz stromabwärts der Multiple Cloning Sites (MCS), so dass jedes Zielgen mit einem C-terminalen His₆-Tag exprimiert wird. Der C-His₆-Tag erlaubt nach der Proteintranslation die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die Induktion der Transkription erfolgt durch die Bereitstellung der T7-RNA-Polymerase seitens des Expressionstamms und durch die externe Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Der Expressionstamm *E. coli* BL21(DE3) und die abgeleiteten Stämme C41(DE3) und C43(DE3) sind, wie indiziert, Lysogene des Bakteriophagen DE3 und besitzen durch die Insertion des Phagen im Chromosom das *lacI*-Gen und das Gen für die T7-RNA-Polymerase, welches unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht. Der durch *lacI* codierte Repressor verhindert in Abwesenheit von Lactose bzw. dem von *E. coli* nicht metabolisierbaren Substratanalogon IPTG, welches alternativ zur Induktion verwendet wird, sowohl die Transkription der T7-RNA-Polymerase als auch die des Zielgens auf dem pET22b Plasmid. Ferner befindet sich auf dem pET22b Plasmid, unmittelbar stromaufwärts der MCS, die *pelB*-Signalsequenz. Diese wird zusammen mit dem Zielgen transkribiert und sorgt dafür, dass das C-His₆-Protein nach der Translation in das Periplasma des *E. coli*-Expressionstamms transportiert wird.

Eine Vektorkarte von pET22b mit einer Übersicht der Klonierungs- und Überexpressionsregion findet sich im Anhang (7.5.5).

2.9.1.3 Der Proteinexpressionsvektor pET22bΔpelB

Für die rekombinante Proteinexpression in dieser Arbeit wurde das vom Vektor pET22b (s. a. 2.9.1.2) abgeleitete Plasmid pET22bΔpelB (SASS and BIERBAUM, 2007) verwendet, das durch die Deletion der *pelB*-Signalsequenz charakterisiert ist. In der MCS von pET22b liegt unmittelbar stromaufwärts des 5'-Endes der *pelB*-Signalsequenz eine *NdeI*-Schnittstelle und das 3'-Ende der Signalsequenz bildet eine *MscI*-Schnittstelle. Durch den enzymatischen Verdau mit *NdeI* („sticky end“) und dem *MscI*-Isoschizomer *MluNI* („blunt end“) erfolgte die Deletion der *pelB*-Signalsequenz aus der MCS. Die kohäsiven 5'-Enden des geschnittenen Vektors wurden nachfolgend durch die DNA-Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragments aufgefüllt, so dass mittels der T4-DNA-Ligase eine „blunt end“ Religation des 5'- mit dem 3'-Ende, unter Eliminierung der *NdeI*- und *MscI*-Schnittstelle, erfolgen konnte (SASS, 2005). Als Konsequenz ergibt sich bei der Verwendung des pET22bΔpelB-Vektors, dass die rekombinant exprimierten C-His₆-getaggtten Proteine nicht im Periplasma, sondern im Cytoplasma des *E. coli*-Expressionsstammes angereichert werden.

Die zur rekombinanten Proteinexpression für diese Arbeit konstruierten und verwendeten Vektoren pET22bΔpelBvicR, pET22bΔpelBvicK, pET22bΔpelBvicK(Y308N), pET22bΔpelB yycH und pET22bΔpelByycI wurden bei der initialen Klonierung, also der Transformation ausgehend vom Ligationsansatz, zunächst in einen Zwischenwirt elektroporiert. Der dafür verwendete *E. coli*-Stamm K12 JM109 besitzt, bedingt durch seinen *recA*⁻- und *endA*⁻-Phänotyp, eine hohe Transformationseffizienz. In diesem Stamm kann ferner mangels einer T7-RNA-Polymerase keine Proteinexpression stattfinden. Dieser Umstand trägt dazu bei, dass die Problematik der Plasmidinstabilität in diesem Stamm praktisch nicht gegeben ist, da ob der fehlenden Möglichkeit zur Expression von rekombinanten Genen auch keine für den Zwischenwirt toxischen Genprodukte entstehen können. Nach der erfolgreichen Etablierung im Zwischenwirt lassen sich so, aufgrund des normalen Wachstums und den einhergehend guten Raten bei der Plasmidpräparation, die Expressionsplasmide leicht in großer Anzahl aus dem Zwischenwirt gewinnen und zur Transformation des finalen Expressionsstammes einsetzen.

Eine Vektorkarte von pET22bΔpelB und eine Übersicht der Klonierungs- und Überexpressionsregion auf dem Vektor befinden sich im Anhang (7.5.6).

2.9.1.4 Expression der C-His₆-getaggten Proteine YycF & YycH

Ausgehend von ÜN-Kulturen wurden je 500 ml LB-Medium (im 3l-Erlenmeyerkolben) versetzt mit Amp. [40 µg/ml] und Kana. [25 µg/ml] 1:100 mit den Stämmen BL21(DE3)pREP4groESL(MT) pET22bΔpelBvicR bzw. BL21(DE3)pREP4groESL(MT) pET22bΔpelByycH angeimpft und im Wasserbad (Fa. Julabo; SW20 oder SW22) unter Schütteln (120 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 inkubiert. Nach dem Erreichen dieser OD erfolgte die Induktion mit IPTG (Fa. Fermentas) in einer Endkonzentration von 1 mM und die weitere Inkubation für 4 h mit anschließender Zellernte (Fa. Thermo Fisher Scientific, Sorvall Evolution; Rotor SLC-4000, 6000 rpm, 6 min, RT, Acc. 3, Br. 2). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit insgesamt 15 ml (erst 10 ml, dann 5 ml) eiskaltem Lysispuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) resuspendiert, in ein steriles 50 ml-Falcontube überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.9.1.5 Expression der C-His₆-getaggten Proteine YycG, YycG(Y308N) & YycI

Ausgehend von ÜN-Kulturen wurden je 1000 ml LB-Medium (im 5l-Erlenmeyerkolben) versetzt mit Amp. [40 µg/ml] und Kana. [25 µg/ml] 1:200 mit den Stämmen C43(DE3)pREP4groESL(MT) pET22bΔpelBvicK, C43(DE3)pREP4groESL(MT) pET22bΔpelBvicK(Y308N) bzw. C43(DE3)pREP4groESL(MT) pET22bΔpelByycI angeimpft und im Wasserbad (Fa. Julabo; SW20 oder SW22) unter Schütteln (120 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 inkubiert. Nach dem Erreichen dieser OD erfolgte die Induktion mit IPTG (Fa. Fermentas) in einer Endkonzentration von 1 mM und die weitere Inkubation ÜN für 16 h. Am nächsten Tag erfolgte die Zellernte (Fa. Thermo Fisher Scientific, Sorvall Evolution; Rotor SLC-4000, 6000 rpm, 6 min, RT, Acc. 3, Br. 2). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit insgesamt 20 ml (erst 15 ml, dann 5 ml) eiskaltem Lysispuffer M1 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 2 mM β-Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, pH 8) resuspendiert, in ein steriles 50 ml-Falcontube überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.9.2 Ni-NTA-Affinitätschromatographie zur Proteinaufreinigung

2.9.2.1 Die C-His₆-getaggten Proteine YycF & YycH

Die in Lysispuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) bei -20 °C gelagerten Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut, mit jeweils 15 µl [10 mg/ml] Lysozym (Fa.

Sigma; #62971) versetzt, gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels eines Ultraschall-Desintegrators (Fa. Branson; SonifierTM W250, Schallkopf Typ „102“, Duty Cycle 100 %, Output Control (Micro Tip Limit) 5, Timer on hold) mit 8 Impulsen für 10 s mit Unterbrechung und einer zwischenzeitlichen Kühlung für 15 s auf Eis. Das Zelllysat wurde auf Eis jeweils mit 15 µl [10 mg/ml] RNase A (Fa. Sigma-Aldrich, from bovine pancreas) und 15 µl [5 mg/ml] DNase I (Fa. Sigma, from bovine pancreas) versetzt, gevortext und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Sedimentation von Zelltrümmern, nicht lysierten Zellen etc. erfolgte mittels Zentrifugation (Fa. Heraeus, Multifuge 1 S-R; Rotor FA12.94, 10300 rpm, 10 min, 4 °C, Acc. 9, Br. 9). Der Überstand wurde jeweils in ein neues, steriles 50 ml-Falcontube überführt, zum Entfernen von letzten festen Bestandteilen erneut zentrifugiert und in ein steriles Falcontube dekantiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C Umgebungstemperatur im Kühlraum. Das Lysat (~ 12,5 ml) wurde mit 1 ml 50 %iger Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) (Fa. Qiagen) versetzt und zum Anbinden der C-His₆-getaggtten Proteine im Batch-Verfahren für 2 h unter Rühren inkubiert. Eine zuvor mit 3 ml Lysispuffer äquilibrierte Polypropylen-Säule (Fa. Qiagen) wurde mit dem Lysat beladen. Nach dem Absetzen der Ni-NTA-Agarose wurde diese mit 4 ml Puffer W1 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8) bzw. mit 4 ml Puffer W2 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol, pH 8) gewaschen. Es folgten 5 Elutionsschritte mit je 300 µl Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol, pH 8). Die Eluate wurden in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen, zur Stabilisierung der Proteine mit Glycerin in einer Endkonzentration von 50 % (v/v) versetzt, bis zum Erhalt einer homogenen Suspension wiederholt vorsichtig invertiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Alle zwischenzeitlichen Säulendurchflüsse wurden in einem 15 ml-Falcontube aufgefangen und bis zur SDS-PAGE-Analyse bei 4 °C gelagert.

2.9.2.2 Die C-His₆-getaggtten Proteine YycG, YycG(Y308N) & YycI

Die in Lysispuffer M1 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 2 mM β-Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, pH 8) bei -20 °C gelagerten Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut, mit jeweils 20 µl [10 mg/ml] Lysozym (Fa. Sigma; #62971) versetzt, gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels eines Ultraschall-Desintegrators (Fa. Branson; SonifierTM W250, Schallkopf Typ „102“, Duty Cycle 100 %, Output Control (Micro Tip Limit) 5, Timer on hold) mit 8 Impulsen für 10 s mit

Unterbrechung und einer zwischenzeitlichen Kühlung für 15 s auf Eis. Das Zelllysat wurde auf Eis jeweils mit 20 µl [10 mg/ml] RNase A (Fa. Sigma, from bovine pancreas) und 20 µl [5 mg/ml] DNase I (Fa. Sigma, from bovine pancreas) versetzt, gevortext und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Sedimentation von Zelltrümmern, nicht lysierten Zellen etc. erfolgte mittels Zentrifugation (Fa. Heraeus, Multifuge 1 S-R; Rotor FA12.94, 10300 rpm, 10 min, 4 °C, Acc. 9, Br. 9). Der Überstand wurde jeweils in ein neues, steriles 50 ml-Falcontube überführt, zum Entfernen von festen Bestandteilen erneut zentrifugiert und in ein steriles Falcontube dekantiert. Zum Sedimentieren der Zellmembranen und Membranproteine wurde jedes Lysat (~ 20 ml) ultrazentrifugiert (Fa. Thermo Fisher Scientific, Sorvall Discovery M120SE; Rotor S80-AT3, 58000 rpm, 60 min, 4 °C, Acc. 9, Br. 9). Der Überstand wurde für die weitere SDS-PAGE-Analyse in ein steriles Falcontube dekantiert. Pro Proteinaufschluss wurden die Membranpellets auf Eis mit insgesamt 4 ml Lysispuffer M2 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 2 mM β-Mercaptoethanol, 39 mM n-Dodecyl-β-D-Maltosid, 30 % (v/v) Glycerin, pH 8) mit einem Glasstab in den Zentrifugenbechern zu groben Flocken resuspendiert und in einem sterilen 15 ml-Falcontube vereint. Die vollständige Resuspension erfolgte auf Eis unter Rühren für 30 – 45 min bei 4 °C Umgebungstemperatur im Kühlraum. Es erfolgte eine erneute Ultrazentrifugation zur Sedimentation aller nicht gelösten Bestandteile (Fa. Thermo Fisher Scientific, Sorvall Discovery M120SE; Rotor S80-AT3, 42000 rpm, 30 min, 4 °C, Acc. 9, Br. 9). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C Umgebungstemperatur im Kühlraum. Der Überstand wurde in ein steriles 15 ml-Falcontube überführt, mit 1 ml 50 %iger Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) (Fa. Qiagen) versetzt und zum Anbinden der C-His₆-getaggten Proteine im Batch-Verfahren für 2 h unter Rühren inkubiert. Eine zuvor mit 3 ml Lysispuffer M1 äquilibrierte Polypropylen-Säule (Fa. Qiagen) wurde mit dem Membranprotein-haltigen Überstand beladen. Nach dem Absetzen der Ni-NTA-Agarose wurde diese mit 4 ml Puffer WM1 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 2 mM β-Mercaptoethanol, 3,9 mM n-Dodecyl-β-D-Maltosid, 30 % (v/v) Glycerin, pH 8) bzw. mit 4 ml Puffer WM2 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol, 2 mM β-Mercaptoethanol, 3,9 mM n-Dodecyl-β-D-Maltosid, 30 % (v/v) Glycerin, pH 8) gewaschen. Es folgten 6 Elutionsschritte mit je 200 µl Elutionspuffer M (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 2 mM β-Mercaptoethanol, 3,9 mM n-Dodecyl-β-D-Maltosid, 30 % (v/v) Glycerin, pH 8). Die Eluate wurden in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen, zur Stabilisierung der Proteine mit Glycerin in einer Endkonzentration von 50 % (v/v) versetzt, bis zum Erhalt einer homogenen Suspension wiederholt vorsichtig invertiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Alle zwischenzeitlichen Säulendurchflüsse wurden in einem 15 ml-Falcontube aufgefangen und bis zur SDS-PAGE-Analyse bei 4 °C gelagert.

2.9.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Test

Die Methode zur Proteinbestimmung nach Bradford (BRADFORD, 1976) beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 in saurer Lösung unter Proteinanbindung von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Im Vergleich zu anderen Methoden der Proteinbestimmung zeichnet sich der Bradford-Test durch seine hohe Kompatibilität zu den oft, neben den Proteinen, noch in den Proben enthaltenen Substanzen aus. Insbesondere sei hier auf die Unempfindlichkeit gegenüber hohen Konzentrationen von Salzen und Glycerin verwiesen, wie sie zur Proteinstabilisierung oft in Lagerpuffern vorkommen. Zur Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (bovine serum albumin) als Standard verwendet.

Durchführung:

Zunächst wurde durch eine 1:5-Verdünnung mit MilliQ aus dem Protein-Assay-Konzentrat (Fa. Bio-Rad; Protein Assay Dye Reagent Concentrate) eine Gebrauchslösung hergestellt. Zur Proteinbestimmung wurden ausgehend von einer BSA-Stammlösung [2 mg/ml] Eichgeraden für drei Messbereiche erstellt: I) 2 – 20 µg (2 µg Schritte), II) 20 – 60 µg (10 µg Schritte) und III) 70 – 140 µg (10 µg Schritte). Die Standards wurden mit MilliQ auf ein fixes Volumen von 100 µl aufgefüllt. Von den Eluaten mit unbekannter Konzentration wurden 5 µl oder 10 µl, entsprechend der Auswertung der SDS-PAGE-Analyse, ebenfalls mit MilliQ auf 100 µl aufgefüllt. Die Standards und Proben wurden in Polystyren-Küvetten (Fa. Sarstedt, 10x10 mm, Lichtweg 10 mm) jeweils mit 3 ml Gebrauchslösung vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Bestimmung der Absorption bei 595 nm erfolgte gegen einen Leerwert im Photometer (Fa. Shimadzu, UV-160). Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte innerhalb des passenden Messbereichs über die entsprechende Eichgerade.

2.9.4 Dialyse und Lagerung der rekombinant exprimierten Yyc-C-His₆-Proteine

Zur Entfernung des bei der Ni-NTA-Affinitätschromatographie zur Elution der Proteine verwendeten Imidazols und des in einigen Fällen zur Aufreinigung notwendigen n-Dodecyl-β-D-Maltosids oder generell zum Pufferaustausch erfolgte die Dialyse der Protein-Eluate über eine semipermeable Membran. Es wurde das Slide-A-Lyzer® System (Fa. Thermo Fisher

Scientific; Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassettes (Extra Strength), 10.000 MWCO; 0.1 – 0.5 ml) verwendet. Nach der Proteinbestimmung mittels Bradford-Test wurden einzelne Eluate zu einem Endvolumen mit 510 µl vereinigt. Die Dialyse erfolgte in drei Schritten mit einem Verhältnis von Dialysepuffer zu Probenvolumen von jeweils 600:1. Die Inkubation der Dialysekassetten im vorgekühlten (4 °C) Dialysepuffer erfolgte bei den ersten beiden Schritten für je 2 h unter Rühren bei 4 °C Umgebungstemperatur im Kühlraum. Der letzte Inkubationsschritt wurde unter gleichen Bedingungen für ~ 16 h ÜN durchgeführt. Nach der Dialyse wurde mit allen Proteinen für die anstehenden weiteren Anwendungen eine finale Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Test durchgeführt, und es folgte, bis zur weiteren Verwendung, die Lagerung bei -20 °C.

Dialysepuffer I (Lagerpuffer I):

(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 % (v/v) Glycerin, pH 8)

Dialysepuffer II (Lagerpuffer II):

(50 mM HEPES, 200 mM KCl, 50 % (v/v) Glycerin, pH 8)

2.9.5 SDS-Page zur Analyse von Proteinen

Die SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis/ Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) wird zur diskontinuierlichen Auftrennung von Proteinen verwendet. Nach der Einführung (LAEMMLI, 1970) entstanden zahlreiche Protokolle und Anwendungen, die aber alle auf den gleichen chemischen und physikalischen Grundprinzipien beruhen. Durch die Anwesenheit von SDS (sodium dodecylsulfate/ Natriumdodecylsulfat) im Proben- und Laufpuffer kommt es neben der Denaturierung der in der Probe enthaltenen Proteine während der Elektrophorese auch zu einer negativen Ladungsmaskierung, so dass die Proteine in einer vernetzten Gelmatrix aus Acryl- und Bisacrylamid bei einem alkalischen pH-Wert nur nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden. Durch die angelegte Spannung kommt es so zu einer gerichteten, fast ausschließlich von der Masse abhängigen, unterschiedlich schnellen Wanderung im angelegten elektrischen Feld.

Soweit es in den einzelnen Abschnitten dieser Arbeit nicht abweichend aufgeführt ist, wurden die SDS-PAGES wie folgt durchgeführt: die Proben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer (nach Fa. Qiagen: 0,225 M Tris/HCl, 50 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 M DTT) versetzt und für 5 min bei 95 °C im Wasserbad inkubiert. Die

Proben wurden nachfolgend in diskontinuierliche Gele mit einem 4 %igen Sammel- und einem 10 %igen Trenngel (Tabelle 2.5) eingesetzt. Der Lauf erfolgte in einer Elektrophoresekammer (Fa. Bio-Rad; Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell) mit Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,5) als Anoden- und Kathodenpuffer. Die angelegte Spannung betrug zu Beginn des Laufes konstant 100 V und wurde auf konstant 120 V erhöht, nach dem die Lauffront ca. 0,5 cm ins Trenngel gewandert war.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-Page (für 2 Gele).

Lösungen	Trenngel (10 %ig)	Sammelgel (4 %ig)
40 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	3,75 ml	0,50 ml
3 M Tris, pH 8,5	2,50 ml	-
1 M Tris + 0,8 % (w/v) SDS	-	0,60 ml
aq. dest.	8,44 ml	3,73 ml
20 % SDS	0,10 ml	-
APS [21 mg/ml]	0,20 ml	0,16 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml

Zur Detektion der Proteinbanden wurden die SDS-PAGE Gele für 5 – 30 min in Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) gefärbt, und überschüssiger, unspezifisch gebundener Farbstoff wurde anschließend durch die Inkubation ÜN in Entfärbelösung (45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) entfernt.

2.9.6 Crosslinking von Proteinen mit Formaldehyd

Mit Ausnahme von sogenannten „zero-length Crosslinkern“ hat Formaldehyd von allen Crosslinking-Reagenzien die kürzeste Cross-Linking-Spanne ($\sim 2 - 3 \text{ \AA}$), was mit hoher Zuverlässigkeit den Nachweis von spezifischen Protein-Protein-Interaktionen erlaubt. Die einzelne Carbonyl-Gruppe des Formaldehyds fungiert dabei als homobifunktionale Gruppe, die über zwei chemische Mechanismen mittels Konjugation mit anderen reaktiven Gruppen eine Verbindung eingehen kann. Bei der Mannich-Reaktion, welche typischerweise bei einer Temperatur von 37 °C oder höher über einen Zeitraum von 2 – 24 h für akzeptable Ausbeuten erfolgt, kondensiert das Formaldehyd mit primären oder sekundären Aminen oder Ammonium-Salzen in einer Aminoalkylierungsreaktion. Desweiteren kann Formaldehyd mit Aminen unter Bildung von hochreaktiven Immonium-Kationen reagieren, welche ihrerseits mit den in Proteinen enthaltenen Nukleophilen-Gruppen von Aminosäuren, wie Sulfhydrylen, Aminen, Phenolen und Imidazolen, unter Kondensation reagieren. Die letztgenannte Reaktion

verläuft schneller und ist bei Crosslinking-Reaktionen von Proteinen unter Raumtemperatur-Bedingungen die vorherrschende Reaktion (NADEAU and CARLSON, 2005).

Durchführung nach NADEAU und CARLSON (2005); modifiziert durch M. TÜRCK:

Da Formaldehyd in hohen Konzentrationen als kurzkettiges Polymer (Paraformaldehyd) vorliegt, wurde zunächst eine niedriger konzentrierte Stammlösung hergestellt, in der Formaldehyd als Monomer vorliegt. Für eine 500 mM-Stammlösung wurden in einem 15 ml-Falcontube 75 mg Paraformaldehyd (Fa. Sigma) in MilliQ gelöst und auf 5 ml aufgefüllt. Unter Verschluss wurde die Lösung für 24 h bei 100 °C im Heizblock (Fa. Biometra; TB1 Thermoblock) inkubiert. Die so hergestellte Lösung ist bei 4 °C für mehrere Monate haltbar. Um das Protein-Crosslinking in Abhängigkeit von der Zeit zu verfolgen, wurde für Zeitreihenexperimente folgender Standardansatz mit 110 µl Endvolumen gewählt: in Anwesenheit von 25 mM Formaldehyd und Crosslinking-Puffer wurden von jedem Protein 5 µg/20 µl Ansatzvolumen eingesetzt und der restliche Ansatz mit MilliQ aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte bei 30 °C im Heizblock (Fa. Biometra; TB1 Thermoblock). Nach Präinkubation des Ansatzes für 5 min im Heizblock erfolgte die Initiation durch Zugabe des Formaldehyds. Nach 5, 10, 15, 30 und 60 min wurden jeweils 20 µl Probe entnommen und durch die Zugabe von 6,75 µl 4x LDS-Puffer (Fa. Invitrogen; NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x): 106 mM Tris/HCl, 141 mM Tris, 2 % (w/v) LDS, 10 % (v/v) Glycerin, 0,51 mM EDTA, 0,22 mM SERVA® Blue G250, 0,175 mM Phenolrot, pH 8,5) abgestoppt. Da das Crosslinking durch Hitzeeinwirkung reversibel ist (NIRANJANAKUMARI et al., 2002), wurde das Probenmaterial direkt in die SDS-PAGE eingesetzt. Es wurden Tris-HEPES-SDS Pre-cast Mini Gels (Fa. Thermo Fisher Scientific; 4 – 20 % Precise Protein Gels, 10 wells, 1.0 mm) und Tris-HEPES-SDS Laufpuffer (Fa. Thermo Fisher Scientific; BupH Tris-HEPES-SDS Running Buffer) verwendet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte wie unter Punkt 2.9.5 beschrieben mit Coomassie.

5x Crosslinking-Puffer, pH 8:

250 mM HEPES (pH 8), 1 M KCl, 0,5 mM EDTA (pH 8), 17,5 % (v/v) Glycerin

2.9.7 Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)

Zur Analyse von nativen Proteinkomplexen, insbesondere zur Untersuchung der molekularen Masse und oligomeren Organisation von rekombinant exprimierten C-His₆-getaggtten (Membran-)Proteinen, wurde die Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) nach SCHÄGGER et al. (1994) in modifizierter Form (M. TÜRCK) verwendet. Die Methode beruht auf einer Ladungsverschiebung, bei der die elektrophoretische Mobilität der Proteine bei einem fixen pH-Wert im Wesentlichen durch die Anlagerung des negativ geladenen Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 (hier: R250) an positiv geladene bzw. hydrophobe Bereiche bestimmt ist. Durch die Anlagerung an hydrophobe Bereiche dient der Farbstoff auch als Detergenz-Ersatz bei der elektrophoretischen Auftrennung von Membranproteinen, da er deren Löslichkeit erhöht und damit deren Aggregation verhindert (SCHÄGGER et al., 1994).

Durchführung nach SCHÄGGER et al. (1994); modifiziert durch M. TÜRCK:

Zur Analyse der oligomeren Konformation der rekombinant exprimierten Yyc-Proteine wurden von den C-His₆-getaggtten Proteinen YycF, YycH und YycI je 5 µg und von den C-His₆-getaggtten Proteinen YycG bzw. YycG(Y308N) je 10 µg mit Lagerpuffer I (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 % (v/v) Glycerin, pH 8) auf 10 µl aufgefüllt, mit 5 µl Coomassie Brilliant Blue R250 (0,5 %ig) versetzt und in ein Native-PAGE Gel (Fa. Bio-Rad; Tris-HCl Ready Gel® Precast Gel, 4 – 20 % linear gradient, 10-well, 30 µl) aufgetragen. Der Lauf erfolgte in einer Elektrophoresekammer (Fa. Bio-Rad; Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell) mit BN-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, pH 8,5) als Kathoden- und Anodenpuffer. Der Lauf wurde unter Kühlung der Elektrophoresekammer bei 4 – 7 °C, mit einer angelegten Spannung von konstant 80 V für 3,5 – 4 h durchgeführt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Inkubation des Gels in Entfärbelösung (45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure). Zur molekularen Größenbestimmung der Proteinkomplexe wurden die Migrationsstrecken der elektrophoretisch aufgetrennten Mono- bzw. Oligomere in Relation zu den Migrationstrecken der Proteine eines BN-Standards gesetzt. Dieser Standard setzt sich aus kommerziell erwerblichen, wasserlöslichen Nichtmembran-Proteinen zusammen, deren molekulare Gewichte und deren Fähigkeit zur Bildung von oligomeren Komplexen bekannt sind. Da es zum Zeitpunkt der Arbeiten an kommerziell verfügbaren Fertig-Standards mangelte, erfolgte, unter den oben aufgeführten Elektrophorese-Bedingungen, die experimentelle Etablierung eines eigenen Protein-Standards. Die Proteine für den Standard wurden als Lyophilisate bezogen (Fa. Sigma und Fa. Merck) und wurden in einer Konzentration von 2 mg/ml in Lagerpuffer I (50 mM

NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 % (v/v) Glycerin, pH 8) gelöst und bei -20 °C gelagert. Ausgehend von den Stammlösungen wurde wie in Tabelle 2.6 aufgeführt ein Mix für den Einsatz in der BN-PAGE hergestellt.

Tabelle 2.6: Protein-Standard für die BN-PAGE, 165 µl Mix für 10 Ansätze à 15 µl.

Stammlösung	µl / 165 µl Mix	µg / 15 µl
BSA [2 mg/ml]*	20,63	3,75
Ovalbumin [2 mg/ml]*	41,25	7,50
Conalbumin [2 mg/ml]*	41,25	7,50
β-Lactoglobulin [2 mg/ml]*	20,63	3,75
Coomassie Brilliant Blue R250 (0,5 %ig)	41,25	18,75

* Proteine gelöst in Lagerpuffer I (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 % (v/v) Glycerin, pH 8)

2.9.8 Herstellung von multilamellaren Vesikeln (MLVs)

Zur Konstruktion von multilamellaren Vesikeln (MLVs) wurde zunächst eine definierte Charge von Lipidfilmen hergestellt, so dass vergleichbare Aliquots mit Lipidfilmen in ausreichender Zahl für die weiteren Anwendungen zur Verfügung standen. Dazu wurden 100 mg lyophilisierter, polarer Lipidextrakt von *E. coli* (Fa. Avanti Polar Lipids) in 5 ml Chloroform/Methanol (1:1) und unter einer N₂-Schutzatmosphäre für 60 min bei RT gelöst. Die Suspension wurde unter Rühren à 70 µl (entspricht 1,5 mg Lipid) in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert. Zur Evaporation des Lösungsmittels wurden die Aliquots für 75 min bei 30 °C unter Vakuum (Fa. Vaccubrand, Membran-Vakuumpumpe MZ 2C) zentrifugiert (Fa. Christ, RVC 2-18, Typ 100218). Die Reaktionsgefäße mit den Lipidfilmen wurden unter einer Stickstoff-Schutzatmosphäre verschlossen, in Plastikfolie eingeschweißt, vakuumiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Herstellung von MLVs erfolgte die vollständige Suspension der Lipidfilme in einem wässrigen Lösungsmittel, so dass sich die Phospholipide aufgrund ihres amphiphilen Charakters selbst zu Liposomen undefinierter Größe und unterschiedlicher Anzahl an Membranschichten zusammenlagern („self-assembly“). Nachfolgend wurden aus den MLVs unilamellare Vesikeln (ULVs) hergestellt, die im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich für die Phosphorylierungsexperimente verwendet wurden.

2.9.8.1 Herstellung von Lipid II- und C₅₅-P-dotierten Vesikeln

Zur Herstellung von Lipid II-dotierten Liposomen wurden zunächst dotierte Lipidfilme hergestellt. Dazu wurde ein Aliquot mit 1,5 mg *E. coli*-Lipidfilm (Abschnitt 2.9.8) mit 50 µg Lipid II (M_G = 1876 g/mol), gelöst in Chloroform/Methanol (1:1), versetzt und durch

gründliches Pipettieren vollständig darin resuspendiert. Dies entspricht einem Verhältnis von Phospholipid zu Lipid II von 31:1. Für das Dotieren von Liposomen mit C₅₅-P (M_G = 881 g/mol) wurde entsprechend verfahren. Zur Evaporation des Lösungsmittels und die nachfolgende Zwischenlagerung bei -20 °C wurden die Aliquots wie unter Punkt 2.9.8 beschrieben unter Vakuum zentrifugiert bzw. aufbereitet.

2.9.9 Herstellung von unilamellaren Vesikeln (ULVs)

1,5 mg dotierter oder undotierter Lipidfilm wurden erst in 100 µl Kalium-Phosphat [100 mM] pH 7,5 vollständig resuspendiert, mit weiteren 900 µl Kalium-Phosphatpuffer versetzt und zu einer homogenen Suspension aus multilamellaren Vesikeln (MLVs) vermischt. Zur Herstellung von unilamellaren Vesikeln (ULVs) mit definierter Größe wurde die Suspension mit den MLVs 19-mal durch eine Polycarbonat-Membran (Fa. Whatman; Nucleopore PC Track-Etched Membran) mit einer Porengröße von 400 nm extrudiert. Es wurde der Mini-Extruder der Fa. Avanti Polar Lipids nach Angaben des Herstellers und unter Benutzung von vier Filtersupports (Fa. Whatman Drain Disc 10mm PE, #230300) pro Membran verwendet.

2.9.10 Rekonstitution von rekombinanten C-His₆-getaggtten Proteinen in ULVs

Die Rekonstitution von rekombinanten C-His₆-getaggtten Proteinen in Liposomen (Konstruktion von Proteoliposomen) erfolgte in Anwesenheit von Triton X-100 als Detergenz, welches nachfolgend durch die Zugabe von Bio-Beads SM-2 (Fa. Bio-Rad) dem Ansatz sukzessive wieder entzogen wurde. Bei diesem Vorgehen kommt es durch die Titration mit Triton X-100, nach der Überschreitung des Sättigungspunktes, zu einer partiellen Solubilisierung der Liposomen und der Entstehung von gemischten Mizellen aus Phospholipiden und Detergenz-Molekülen. Das zu rekonstituierende C-His₆-getaggte Protein wird dabei zu den im Überschuss vorhanden gemischten Mizellen aus Detergenz und Lipiden zugesetzt, was auch zu der Bildung von Lipid-Detergenz-Protein-Mizellen führt. Durch verschiedene Methoden, wie Dialyse, Gelfiltration, Verdünnung oder wie in diesem Fall durch die Zugabe von Bio-Beads, wird dann das Detergenz wieder aus dem Ansatz entfernt, so dass am Ende nur noch Liposomen aus Phospholipid verbleiben, in deren Membran die Proteine eingebettet sind (RIGAUD and LEVY, 2003).

Durchführung:

Je Ansatz wurden, ausgehend von einem 1,5 mg Lipidfilm, durch 19-malige Extrusion zunächst ULVs in einem Volumen von 1 ml Kalium-Phosphatpuffer [100 mM] pH 7,5 frisch präpariert. Es folgte die Titration der Liposomen in 1,25 µl-Schritten mit 20 %igem Triton X-100 (Verdünnung mit Kalium-Phosphatpuffer). Das Fortschreiten der Titration wurde nach jedem Schritt sowie vor und nach jeder Inkubation durch Messung der OD bei 540 nm verfolgt. Nach Überschreitung des Punktes der Detergenzsättigung wurden die Ansätze für 20 min unter leichtem Rühren bei RT inkubiert. Es wurden 50 µg C-His₆-getagtes Protein zugegeben, was einem Verhältnis von Protein zu Phospholipid von 1:31 entspricht. Es folgte die Inkubation für 35 min unter leichtem Rühren bei RT. Die dreimal in MilliQ vorgewaschenen Bio-Beads SM-2 (Fa. Bio-Rad) wurden feucht und in einfacher Menge in einem Verhältnis von Detergenz zu Bio-Beads von 1:5 dem Ansatz zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h unter leichtem Rühren bei RT wurden erneut Bio-Beads in einfacher Menge dem Ansatz zugesetzt. Es folgten die Zugabe der doppelten Menge Bio-Beads und die Inkubation für 16 h ÜN unter leichtem Rühren bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde erneut die einfache Menge Bio-Beads zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 4 °C unter leichtem Rühren inkubiert. Zur Ernte der Proteoliposomen und zum Pufferaustausch wurde, nach dem Sedimentieren der Bio-Beads, der Überstand abgenommen, in Zentrifugenbecher aus Polycarbonat überführt und ultrazentrifugiert (Fa. Thermo Fisher Scientific, Sorvall Discovery M120SE; Rotor S80-AT3, 80 krpm, 25 min, 25 °C, Acc. 9, Br. 9). Der Überstand wurde verworfen oder für spätere Analysen bei 4 °C zwischengelagert. Das Pellet mit den Proteoliposomen wurde in 1 ml 1x CL10-Puffer (50 mM HEPES, 500 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, pH 8) resuspendiert und 19-mal durch eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 400 nm (Fa. Whatman; Nucleopore PC Track-Etched Membran) extrudiert (Fa. Avanti Polar Lipids; Mini-Extruder). Die Proteoliposomen wurden erneut durch Ultrazentrifugation geerntet (Fa. Thermo Fisher Scientific, Sorvall Discovery M120SE; Rotor S120-AT2, 120 krpm, 25 min, 25 °C, Acc. 9, Br. 9). Der Überstand wurde verworfen oder für spätere Analysen bei 4 °C zwischengelagert. Die Pellets wurden in 155 µl 1x CL10-Puffer resuspendiert und in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen à 50 µl aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.9.11 Phosphat-Test zur Bestimmung des P_i-Gehalts von Proteoliposomen

Um in den Phosphorylierungsassays gleiche Mengen von Proteoliposomen in den direkten Vergleich zueinander einsetzen zu können, erfolgte nach dem finalen Präparationsschritt der jeweiligen Proteoliposomenansätze, unmittelbar vor dem Einsatz in den Phosphorylierungsassays, eine Konzentrationsbestimmung der in den Proteoliposomen enthaltenen Phospholipide mittels Phosphat-Test (ROUSER et al., 1970). Als Standard wurde ausgehend von einer 2,5 M Ammonium-Phosphat-Stammlösung, gelöst in Wasser, (Fa. Fluka; Sigma) durch Verdünnung mit MilliQ eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 1 mM hergestellt. Zur Kalibrierung der Proben mit unbekannter Phosphatkonzentration wurde mit der 1 mM Phosphat-Gebrauchslösung eine Eichgerade von 0 – 90 nmol P_i erstellt. Die Proben bzw. Standardkonzentrationen wurden jeweils in ein phosphatfreies Reagenzglas (Fa. VWR, #212-0016, test tubes, soda glas, 100 x 16.00 x 0.8 – 1 mm, round bottom) pipettiert und durch Inkubation für 20 min bei 140 °C eingetrocknet. Die Proben und Standards wurden nachfolgend jeweilig mit 0,3 ml 70 – 72 %iger Perchlorsäure versetzt und die Reagenzgläser mit Glaskugeln verschlossen. Durch Inkubation für 1 h bei 180 °C in einem Heizblock (Fa. Stuart Scientific, block heater SHT200D) erfolgte die saure Hydrolyse der Ansätze. Nach dem Abkühlen der Ansätze auf Raumtemperatur wurden diese in folgender Reihenfolge mit: 1 ml MilliQ, 0,4 ml 1,25 %iger (w/v) Ammoniumheptamolybdat und 0,4 ml 5 %iger (w/v) Ascorbinsäure versetzt. Die Ansätze wurden gevortext und unter Verschluss zur vollen Ausprägung der Farbreaktion für 5 min im Wasserbad bei 95 – 100 °C inkubiert. Die Ansätze wurden in kaltem Wasser abgekühlt und die Absorptionen bei 797 nm gegen den Leerwert bestimmt.

Zur Herstellung aller Lösungen wurde ausschließlich phosphatfreies Wasser (MilliQ) verwendet. Ferner wurden sämtliche Glaswaren vor Gebrauch mit Chloroform gespült.

2.9.12 Phosphorylierungsassays / Etablierung zweier Modell-Systeme

Um nach der rekombinanten Protein-Expression der C-His₆-getaggtten Kinasen YycG und YycG(Y308N) zu überprüfen, ob diese nach der Aufreinigung noch enzymatisch aktiv waren, wurden *in vitro*-Phosphorylierungsassays durchgeführt. So sollte zum einen überprüft werden, ob die Kinasen in Anwesenheit von ATP Autophosphorylierungsaktivität zeigen und ferner, inwieweit die Kinasen in der Lage waren, in einem nachgeschalteten Schritt den Phosphatrest auf den zugehörigen Response-Regulator YycF zu übertragen. Um dies zeigen zu können, wurde mit den rekombinant exprimierten C-His₆-getaggtten Proteinen ein *in vitro*-Detergenz-

Mizellen-Modellsystem etabliert, mit dem zunächst die Autophosphorylierung der Kinasen und die subsequente Übertragung eines Phosphatrestes auf den Responseregulator in Anwesenheit von radioaktivem [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP und Detergenz gezeigt werden sollte.

Ausgehend von dem Detergenz-Mizellen-Modellsystem wurde in einem weiteren Schritt ein Modellsystem entwickelt, das es erlaubt, die Kinase-Proteine unter Bedingungen zu testen, die wesentlich näher an der tatsächlichen *in vivo*-Situation sind. Dabei ist es wichtig sich zu vergegenwärtigen, dass es sich bei den YycG- und YycG(Y308N)-Kinasen um Membran-Proteine handelt, die durch zwei Transmembran-Domänen charakterisiert sind. Bei der *in vivo*-Situation kommt es durch die Einbettung des Proteins in die Cytoplasma-Membran nicht nur zu einer räumlichen Ordnung der einzelnen funktionalen Protein-Domänen, sondern die Membran bildet durch ihren amphiphilen Charakter auch eine entscheidende Größe bei der Ausbildung der nativen strukturellen Konformation. Dies stellt für die korrekte biologische Funktion eine absolute Notwendigkeit dar und kann deshalb auch für Untersuchungen *in vitro* nicht außer Acht gelassen werden. Um diesen Aspekt zu berücksichtigen, wurde ein zweites, Detergenz-freies Phospholipid-Liposomen-Modellsystem etabliert, bei dem die rekombinanten Kinasen in eine biologische Membran bestehend aus einem polaren Extrakt aus *E.coli*-Phospholipiden rekonstituiert wurden.

2.9.12.1 Die C-His₆-getaggtten Proteine im Detergenz-Mizellen-Modell

Für Phosphorylierungsassays in Detergenz-Mizellen wurden von den rekombinanten Proteinen 1,5 μg je Ansatz eingesetzt. Die Phosphorylierungsreaktion fand jeweils in einem Gesamt-Volumen von 10 μl mit 1x CL3.5-Phosphorylierungspuffer (50 mM HEPES, 500 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 0,5 mM DTT, 3,5 % (v/v) Glycerin, pH 8) statt. Ferner wurde strikt darauf geachtet, dass keine Konzentrationsungleichheiten, insbesondere Unterschiede in den Ionen-Konzentrationen, bei miteinander zu vergleichenden Ansätzen auftraten, wenn beispielsweise zu einem Ansatz weitere rekombinante Proteine in Lagerpuffer II (50 mM HEPES, 200 mM KCl, 50 % (v/v) Glycerin, pH 8) zugesetzt wurden und zu anderen Ansätzen der Versuchsreihe nicht. Um dem vorzubeugen, wurde in solchen Fällen das äquivalente Volumen von proteinfreiem Lagerpuffer II zu dem zu vergleichenden Ansatz zugesetzt. Zur Initiation der Reaktion wurde zu jedem Ansatz ein Mix aus „kaltem“ und „heißem“ ATP in folgender Endkonzentration / mit folgender Aktivität gegeben: 25 μM ATP (Fa. Sigma) und 4 μCi [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP (Fa. Hartmann Analytic GmbH). Nach der Zugabe wurden die Ansätze, soweit nicht anders angegeben, bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde jeder Ansatz mit 5 μl 5x SDS-Probenpuffer (nach Fa. Qiagen:

0,225 M Tris/HCl, 50 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 M DTT) versetzt. Die Proben wurden nicht aufgekocht, weil dieses zur Dephosphorylierung der phosphorylierten Proteine führen kann (POLLACK and SINGER, 2001) bzw. führt (Abschnitt 3.12.1.3). Stattdessen wurden das Probenmaterial zusammen mit dem Probenpuffer direkt in SDS-PAGE Gele (Fa. Invitrogen; NuPAGE® Novex 10 % Bis-Tris Gel 1.0 mm, 12 well) aufgetragen und mit SDS-Laufpuffer (Fa. Invitrogen; NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer) bei konstant 200 V für 50 min per Elektrophorese (Fa. Invitrogen; XCell SureLock® Mini-Cell) aufgetrennt. Da weder die Verwendung des NuPAGE®-Antioxidants (Fa. Invitrogen) im Laufpuffer der inneren Kammer noch die Zugabe des NuPAGE® Reducing Agents (Fa. Invitrogen) zu den Proben zu einer sichtbaren Verbesserung des Gellaufs führte, wurde – obwohl für den Einsatz unter reduzierenden Bedingungen vom Hersteller empfohlen – nach anfänglicher Nutzung, auch aufgrund der Toxizität der Agenzien, von einer weiteren Verwendung in der SDS-PAGE abgesehen. Die Detektion der phosphorylierten, radioaktiven Proteinbanden erfolgte autoradiographisch durch Belichtung eines Röntgenfilms (Fa. GE Healthcare; Hyperfilm MP 18x24 cm) und dessen konventioneller Entwicklung (Fa. Kodak; Miniloader 2000P).

2.9.12.2 Rekonstitution von YycG und YycG(Y308N) in ULVs

Für das Phospholipid-Liposomen-Modell wurden zunächst definierte unilamellare Vesikel (ULVs) mittels eines Extruders und einer PC-Membran (Porengröße von 400 nm) aus einem polaren Lipidextrakt von *E. coli* in Kalium-Phosphat-Puffer [100 mM] pH 7,5 hergestellt. In die ULVs erfolgte dann die Rekonstitution der C-His₆-getaggtten Histidin-Kinasen YycG oder YycG(Y308N). Für die Protein-Rekonstitution wurde dabei ein Vorgehen gewählt, bei dem die ULVs mit dem Detergenz Triton X-100 zunächst über den ersten Punkt der Detergenzsättigung hinaus teilsolubilisiert wurden. Die Titration der Liposomen erfolgte in 1,25 µl-Schritten mit 20 %-igem Triton X-100 (verdünnt mit Kalium-Phosphat-Puffer), und der Verlauf wurde nach jedem Schritt durch Messung der Abs. bei 540 nm verfolgt. Zu den im Überschuss vorhandenen gemischten Mizellen aus Detergenz und Phospholipiden erfolgte die Zugabe der zu rekonstituierenden Proteine in einem Verhältnis von Phospholipiden zu Protein von 1:31 (1500 µg Lipid + 50 µg Protein). Neben der Bildung von Mizellen aus Lipiden und Detergenz führt dies auch zur Bildung von Mizellen aus Lipiden, Detergenz und Proteinen. Durch die nachfolgende Zugabe von Bio-Beads (Fa. Bio-Rad), einem Adsorbens aus Polystyren-Divenyl-Benzen, wurde nachfolgend das Detergenz wieder sukzessive entfernt, so dass Proteoliposomen entstanden, bei denen man prinzipiell von einer reinen

unidirektionalen Orientierung („inside-out“) der in die Phospholipidmembran der Liposomen eingebetteten Proteine ausgehen kann. Durch erneutes Extrudieren fand nachfolgend neben einem für die Phosphorylierungsassays und für die zwischenzeitliche Lagerung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ notwendigen Pufferaustausch (Kalium-Phosphat-Puffer substituiert durch 1x CL10-Phosphorylierungspuffer) auch wieder die Formation von definierten ULVs statt. Dieser Extrusionsschritt geht allerdings auf Kosten der unidirektionalen Orientierung der rekonstituierten Proteine, so dass nachfolgend von einer gleichmäßig bidirektionalen Verteilung der Proteine in der Membran der Liposomen ausgegangen werden muss. Neben dem äquilibrierenden Effekt des 1x CL10-Phosphorylierungspufferes für die nachfolgenden Phosphorylierungsassays erlaubte es dieser Puffer ferner nach dem Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff, eine stabile Lagerung der in die Membranen eingebetteten Proteine bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für einen Zeitraum von mehreren Wochen oder Monaten. Die Stabilität ist dabei einerseits auf die erhöhte Konzentration von Glycerin als Kryoprotektor im Puffer und andererseits auch auf die Einbettung der Proteine in einer Membran selbst rückführbar. Da davon auszugehen ist, dass die strukturelle Integrität der Proteoliposomen durch das Schockgefrieren und die nachfolgende Lagerung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ zerstört wird, erfolgte vor dem Einsatz der Proteoliposomen in den Phosphorylierungsassays ein erneuter Extrusionsschritt, um definierte ULVs mit einem Durchmesser von $\sim 400\text{ nm}$ herzustellen. Der Extrusionsschritt erfolgte zum Pufferaustausch in 1x CL3.5-Phosphorylierungspuffer.

Der vollständige Titrationsverlauf einer Dreifach-Bestimmung von ULVs (1,5 mg/ml Phospholipid in Kalium-Phosphat Puffer [100 mM] pH 7,5), bei einer Abs. von 540 nm, durch die schrittweise Zugabe von Triton X-100 ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

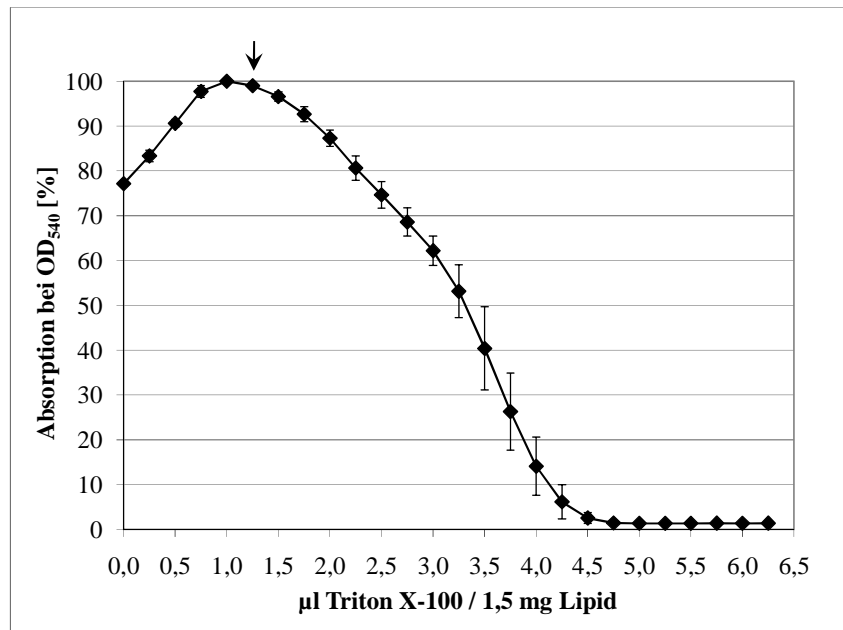


Abbildung 2.1: Vollständige Titration von ULVs (1,5 mg/ml Phospholipid in Kalium-Phosphat Puffer [100 mM] pH 7,5) durch die schrittweise Zugabe von Triton X-100. Bei der Protein-Rekonstitution wurde die Titration nach dem ersten Punkt nach dem Erreichen der Detergenzsättigung (↓) nicht fortgesetzt, sondern es erfolgte die Proteinzugabe zu den teilsolubilisierten Liposomen und nachfolgend die für die Rekonstitution notwendige, sukzessive Entfernung des bis dahin zugesetzten Detergenz.

2.9.12.3 Die C-His₆-getaggtten Proteine im Phospholipid-Liposomen-Modell

Für Phosphorylierungsassays mit in Liposomen rekonstituierten Proteinen wurden 50 µl eines zuvor hergestellten und bei -70 °C gelagerten Proteoliposomen-Aliquots auf Eis aufgetaut und zur Äquilibration an den finalen Phosphorylierungs-Puffer mit 950 µl 1x CL3.5-Puffer (50 mM HEPES, 500 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 3,5 % (v/v) Glycerin, pH 8) versetzt, zu einer homogenen Suspension vermischt und zur Wiederherstellung von unilamellaren Vesikeln 19-mal durch eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 400 nm (Fa. Whatman; Nucleopore PC Track-Etched Membran) extrudiert (Fa. Avanti Polar Lipids; Mini-Extruder). Zur Ernte der Proteoliposomen wurden diese ultrazentrifugiert (Fa. Thermo Fisher Scientific, Sorvall Discovery M120SE; Rotor S120-AT2, 120 krpm, 25 min, 25 °C, Acc. 9, Br. 9). Der Überstand wurde verworfen oder zur späteren Analyse bei 4 °C zwischengelagert. Das Pellet wurde je nach Größe in 30 – 50 µl 1x CL3.5-Puffer resuspendiert. Um gleiche Mengen an Proteoliposomen und damit indirekt auch gleiche Mengen der reaktionsbestimmenden C-His₆-getaggtten Histidin-Kinasen YycG bzw. YycG(Y308N) in den Phosphorylierungsassays miteinander vergleichen zu können, wurde von jedem Proteoliposomen-Ansatz eine Dreifach-Bestimmung des totalen

anorganischen Phosphatgehaltes (P_i -Gehalt) mittels Phosphat-Test durchgeführt (2.9.11). Entsprechend den Ergebnissen des Phosphat-Testes wurden die Volumina der zu vergleichenden Proteoliposomen-Ansätze so gewählt, dass gleiche Mengen im direkten, qualitativen Vergleich zueinander standen. Jeder Phosphorylierungsansatz umfasste ein finales Volumen von 10 μ l und als Phosphorylierungspuffer wurde unter Berücksichtigung der bereits in den Proteoliposomen-Präparationen enthaltenen Reagenzien 5x CL3.5-Puffer (250 mM HEPES, 2,5 M KCl, 0,5 mM EDTA, 25 mM $MgCl_2$, 2,5 mM DTT, 17,5 % (v/v) Glycerin, pH 8) so zugesetzt, dass die Reaktion, bezogen auf das Gesamtvolumen, in Anwesenheit von einfach konzentrierten CL3.5-Puffer stattfand. Ferner wurde darauf geachtet, dass keine Konzentrationsungleichheiten, insbesondere Unterschiede in den Ionenkonzentrationen, auftraten, wenn beispielsweise zu einem Ansatz extern der C-His₆-getaggte Responseregulator YycF in Lagerpuffer II (50 mM HEPES, 200 mM KCl, 50 % (v/v) Glycerin, pH 8) zugesetzt wurde und zu anderen Ansätzen der Versuchsreihe nicht. Um dem vorzubeugen, wurde in solchen Fällen das äquivalente Volumen von proteinfreiem Lagerpuffer II zu dem zu vergleichenden Ansatz zugesetzt. Zur Initiierung der Phosphorylierungsreaktion wurde jeder Ansatz mit 4 μ Ci [$\gamma^{33}P$]ATP (Fa. Hartmann Analytic GmbH) versetzt und im Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde jeder Ansatz mit 5 μ l 5x SDS-Probenpuffer (nach Fa. Qiagen: 0,225 M Tris/HCl, 50 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 M DTT) versetzt. Die Proben wurden nicht aufgeköcht, weil dies zur Dephosphorylierung der phosphorylierten Proteine führen kann (POLLACK and SINGER, 2001) bzw. führt (3.12.1.3). Stattdessen wurde das Probenmaterial zusammen mit dem Probenpuffer direkt in SDS-PAGE Gele (Fa. Invitrogen; NuPAGE® Novex 10 % Bis-Tris Gel 1.0 mm, 12 well) aufgetragen und mit SDS-Laufpuffer (Fa. Invitrogen; NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer) bei konstant 200 V für 50 min per Elektrophorese (Fa. Invitrogen; XCell SureLock® Mini-Cell) aufgetrennt. Auf die Verwendung des NuPAGE®-Antioxidants (Fa. Invitrogen) im Laufpuffer der inneren Kammer und auf die Zugabe des NuPAGE® Reducing Agents (Fa. Invitrogen) zu den Proben wurde verzichtet (für die Gründe siehe Abschnitt 2.9.12.1). Die Detektion der phosphorylierten, radioaktiven Proteinbanden erfolgte autoradiographisch durch Belichtung eines Röntgenfilms (Fa. GE Healthcare; Hyperfilm MP 18x24 cm) und dessen konventioneller Entwicklung (Fa. Kodak; Miniloader 2000P).

3. Ergebnisse

3.1 Strukturelle Organisation des *yyc*-Operons in *S. aureus*

Anhand der frei zugänglichen Daten des vollständig sequenzierten Genoms von *S. aureus*-Stamm N315 (NC_002745 unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurde mit den für die ORFs SA0017 – SA0021 hinterlegten Sequenzen ein Schema des Sequenzbereiches für diese ORFs erstellt, das um weitere bekannte und relevante Details ergänzt wurde (Abbildung 3.1).

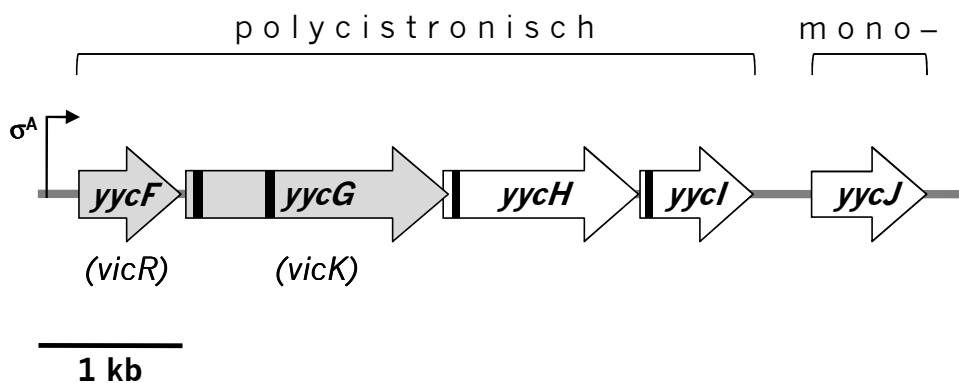


Abbildung 3.1: Maßstabgetreue, schematische Abbildung des Sequenzabschnittes, der die ORFs SA0017 – SA0021 von *S. aureus* N315 umfasst. Eingezeichnet sind die bekannten Details zur Operonstruktur. Die Bereiche, die für Transmembran-Domänen codieren (siehe auch Tabelle 3.1), sind als „schwarze Balken“ eingezeichnet.

Die Erkenntnisse zur mono- und polycistronischen Expression der einzelnen Gene des *yyc*-Operons basieren auf der *in silico*-Untersuchung des *S. aureus* Mu50 Genoms (WANG et al., 2004). Die polycistronische Expression der *yycFGHI*-Gene konnte ferner in *S. aureus* SA137/93A durch eigene Arbeiten bestätigt werden (JANSEN et al., 2007). Die stromabwärts vom putativen σ^A -Promotor gelegenen Gene *yycFG*, die für die Sensor-Histidin-Kinase YycG und den dazugehörigen Responseregulator YycF codieren, sind in *S. aureus* essentiell (MARTIN et al., 1999). Anhand der Aminosäuresequenzen von *S. aureus* N315 wurden mit dem Online-Tool TMHMM Server 2.0 (unter <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>; (KROGH et al., 2001)) die Sequenzabschnitte, die innerhalb der Proteine Transmembran-Domänen (TM-Domänen) umfassen, ermittelt (Tabelle 3.1) und in Abbildung 3.1 eingezeichnet.

Tabelle 3.1: Anzahl und Position der TM-Domänen, die mit dem Online-Tool TMHMM Server 2.0 anhand der Sequenzen von *S. aureus* N315 für die Proteine YycFGHIJ ermittelt werden konnten.

Protein	Anzahl TM-Domänen	Position in der AS-Sequenz
YycF (VicR)	0	–
YycG (VicK)	2	15 – 37 und 183 – 205
YycH	1	19 – 36
YycI	1	9 – 26
YycJ	0	–

3.2 Analyse der konservierten Domänen der Sensor-Histidin-Kinase YycG

Da der Sensor-Histidin-Kinase YycG (VicK) in dieser Arbeit eine zentrale Bedeutung zukommt, wurde die Sequenz von YycG des *S. aureus*-Stammes SA137/93A, der auch als Template-Quelle für die Klonierungen bzw. rekombinante Proteinexpression verwendet wurde, zur detaillierten Analyse der konservierten Domänen in das Online-Tool CD-Search (Conserved Domain Search; Zugang über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; (MARCHLER-BAUER and BRYANT, 2004)) als Query-Anfrage eingesetzt, um eine interaktive Analyse mittels Softwarezugriff auf die CDD (Conserved Domain Database; (MARCHLER-BAUER et al., 2009)) durchführen zu können. Die ermittelten Ergebnisse zu den so bestimmten konservierten Domänen in YycG sind in Abbildung 3.2 zusammengefasst.

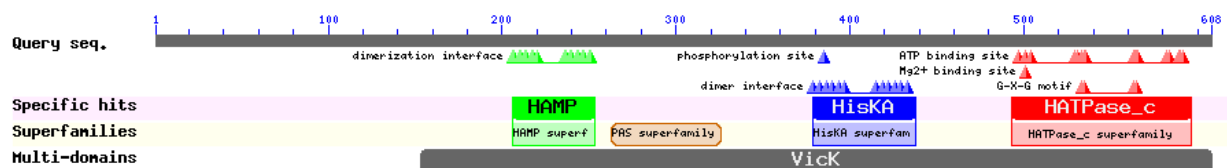


Abbildung 3.2: Grafische Zusammenfassung des CD-Search Ergebnisses. Schematisch eingezeichnet ist die Sequenz (Query) von YycG (*S. aureus* SA137/93A). Die konservierten Domänen, die anhand des CDD-Abgleichs ermittelt wurden, sind je nachdem, ob die E-Werte (E-values) den Schwellenwert von 0,01 unterschritten (s. Tabelle 3.2) als spezifische Treffer und Angehörige einer Superfamilie (HAMP, HisKA oder HATPase_c) bzw. im Fall von unspezifischen Treffern nur als Angehörige einer Superfamilie (PAS) eingezeichnet. Motive und Bindestellen, die innerhalb der konservierten Domänen liegen, sind in der Sequenz als Dreiecke (▲) eingezeichnet, und jedes ▲ repräsentiert die Position eines Aminosäurerestes, die dieser in dem konservierten Motiv oder in der Bindestelle einnimmt. Für eine detailliertere Übersicht dieser Reste in der Sequenz siehe Abbildung 3.3.

Neben der grafischen Übersicht des CD-Search-Ergebnisses werden eine Kurzübersicht zu den mittels CD-Search ermittelten Domänen und einige wesentlichen Informationen in Tabelle 3.2 gegeben.

Tabelle 3.2: Kurzübersicht des CD-Search Outputs mit den ermittelten Domänen.

ID	Short description	Multi-domain	E-value	Hit
cd00075	HATPase_c, Histidine kinase-like ATPases	no	1e ⁻²⁰	specific
cd00082	HisKA, Histidine Kinase A	no	1e ⁻¹³	specific
cd06225	HAMP	no	6e ⁻⁰⁸	specific
cl02459	PAS, PAS domain	N/A*	2e ⁻⁰⁵	unspecific
COG5002	VicK, Signal transduction histidine kinase	yes	8e ⁻¹⁷⁹	specific

*N/A = not available, nicht verfügbar.

Aufgeführt ist die „ID“, unter der die genannte Domäne in der Datenbank gefunden werden kann, und eine namentliche Kurzbeschreibung („short description“). Die aufgeführten E-Werte (E-values) definieren die statistische Signifikanz mittels eines Schwellenwertes (default setting: 0,01), d.h. ob es sich bei den ermittelten Domänen um einen spezifischen oder unspezifischen Treffer („hit“) handelt. Ein spezifischer Treffer („specific hit“) ist dadurch definiert, dass der ermittelte E-Wert den Schwellenwert unterschreitet. Das besagt, dass zwischen der eingesetzten Sequenz und der konservierten Domäne eine hohe Konfidenz besteht (aus der bezüglich der Funktion ein hohes Konfidenzlevel von der ermittelten konservierten Domäne zu der eingesetzten Sequenz des Proteins resultiert). Ein unspezifischer Treffer („unspecific hit“) ist durch einen E-Wert definiert, der größer oder gleich mit dem Schwellenwert ist. Das bringt zum Ausdruck, dass der unspezifische Treffer zwar weniger signifikant ist, aber trotzdem können – über die Zuordnung zu einer Domänen-Superfamilie – für den betreffenden Sequenzabschnitt noch wertvolle Hinweise zur Funktion abgeleitet werden. Ein „multi-domain hit“ besagt, dass in der Datenbank ein Protein gefunden wurde, in dem mehrere oder alle der für die eingesetzte Sequenz ermittelten konservierten Domänen vorkommen (in diesem Fall wurde natürlich VicK – YycG – gefunden).

Eine detaillierte Übersicht der Aminosäuresequenz der YycG-Sensor-Histidin-Kinase von *S. aureus* SA137/93A, in der die durch die CD-Search und TMHMM-Analyse ermittelten Domänen, Motive und Bindestellen farblich kenntlich gemacht wurden, gibt Abbildung 3.3.

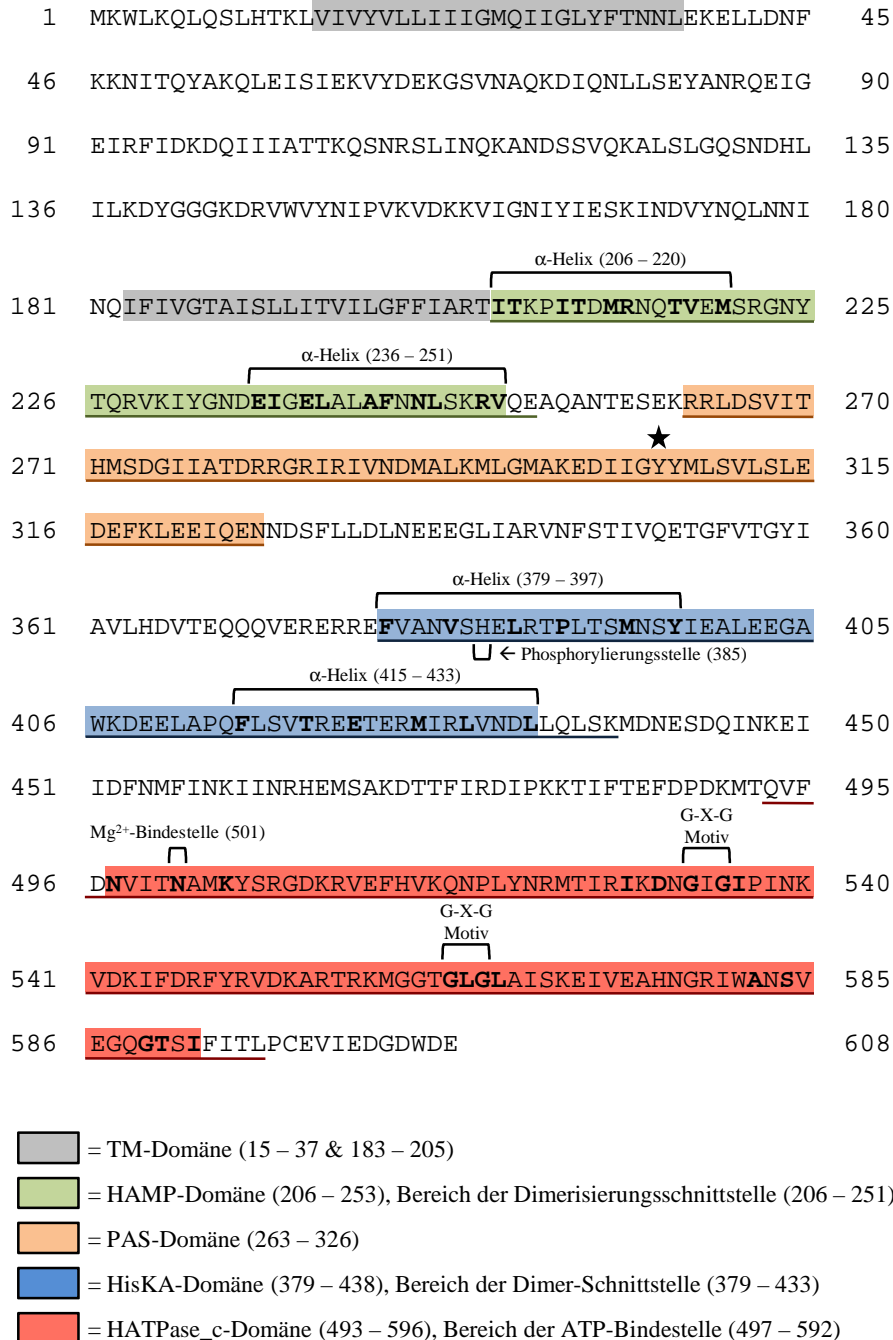


Abbildung 3.3: Aminosäuresequenz der Sensor-Histidin-Kinase YycG von *S. aureus*-Stamm SA137/93A. Eingezeichnet sind die TM-Domänen, die mit dem Online-Tool TMHMM Server 2.0 ermittelt wurden und die Bereiche der konservierten Domänen, die mit dem Online-Tool CD-Search ermittelt wurden. Motive und Bindestellen innerhalb der Domänenbereiche sind in der Sequenz zusätzlich beschrieben. Der Aminosäureaustausch (Y→N) in Position 306 der YycG-Kinase, die auf dem Plasmid pTvicRK(Y306N) codiert ist, wird durch einen „★“ gekennzeichnet. Aminosäurereste, die innerhalb der gekennzeichneten Bereiche Positionen des konservierten Motivs einnehmen, sind „fett“ gedruckt.

Die TM-Domänen wurden mit dem Online-Tool TMHMM Server 2.0 ermittelt (Tabelle 3.1) und eingezeichnet, um die Informationen zu den mittels CD-Search ermittelten konservierten Domänen zu vervollständigen. Nachfolgend seien einige bekannten Details aus der CDD zu

den einzelnen Domänen wiedergegeben. Bei HAMP handelt es sich um eine Domäne, die in Histidin-Kinasen, Adenyl-Cyclasen, Methyl-Bindeproteinen und Phosphatasen vorkommt und in der Signal-Transduktion von Signal-Proteinen eine Rolle spielt. Die HAMP-Domäne besteht aus zwei α -Helices, die durch einen ausgedehnten Aminosäurelinker miteinander verbunden sind und die Dimerisierungsschnittstelle („dimerization interface“) bilden, über das sich zwei HAMP-Domänen durch Bildung eines parallelen Bündels aus vier α -Helices zusammenlagern können. Die HisKA-Domäne oder genauer die Histidin-Kinase A-Dimerisierungs-/Phosphoakzeptordomäne besitzt innerhalb der Dimer-Schnittstelle („dimer interface“) zwei α -Helices. Zur Bildung eines Histidin Kinase A Dimers kommt es, wenn sich zwei HisKA-Domänen über die Bildung eines parallelen Bündels aus vier α -Helices zusammenlagern. Die Dimer-Schnittstelle umfasst gewöhnlich einen konservierten Histidin-Rest, der über *trans*-Autophosphorylierung durch die katalytische Domäne der Histidin-Kinase aktiviert wird. In einem nachgeschalteten Schritt wird dann der Phosphatrest von dem konservierten Histidin-Rest auf einen konservierten Aspartat-Rest des Responseregulators (hier: YycF) übertragen. Die HATPase_c-Domäne ist in der Proteinfamilie der „histidine kinase-like ATPases“ in einer ganzen Reihe von ATP-bindenden Proteinen zu finden, z.B. in Histidin-Kinasen selbst, aber auch in der DNA-Gyrase B, in Topoisomerasen, dem Heat-Shock-Protein HSP90, in Phytochrome-like ATPasen und in DNA-Mismatch-Reparaturproteinen. Das ATP-Bindemotiv der HATPase_c-Domäne umfasst eine ATP-Bindestelle mit ATP-Bindetasche und einem konservierten Asparagin-Rest, an dem Mg^{2+} als Cofaktor anbindet. Die Ober- und Unterseite der ATP-Bindetasche ist dabei durch zwei G-X-G-Motive innerhalb der Sequenz definiert.

Nicht in die Abbildungen 3.2 und 3.3 eingezeichnet bzw. in Tabelle 3.2 aufgeführt ist eine PAS-ähnliche Domänenstruktur, die sich innerhalb der extraplasmatischen Schleife befindet, welche von den beiden TM-Domänen in Position 15 – 37 und Position 183 – 205 flankiert wird und durch einen bioinformatischen Profil-Profil-Sequenzabgleich verschiedener Datenbanken mittels des FFAS (Fold and Function Assignment System) Servers (JAROSZEWSKI et al., 2005) für das YycG-Ortholog in *Bacillus subtilis* ermittelt wurde (SANTELLI et al., 2007).

3.3 Der Aminosäure-Austausch in der PAS-Domäne der mutierten YycG-Kinase

Um den Einfluss der nicht-stillen Mutation (T916A) in *yycG* (*vicK*), die zum Aminosäureaustausch (Y→N) in der putativen PAS-Domäne von YycG führt, besser einordnen zu können, wurde zunächst ein Sequenzalignment mit bekannten Aminosäuresequenzen von YycG aus verschiedenen *S. aureus*-Stämmen durchgeführt. Zur Durchführung des Multiple-Sequence-Alignment wurde das Online-Tool Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>; (LARKIN et al., 2007)) verwendet. Es wurden die Sequenzen von 12 *S. aureus*-Stämmen verwendet, deren vollständiges Genom in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hinterlegt ist, und zusätzlich die YycG-Sequenzen der *S. aureus*-Stämme SA137/93A und 8325-4. Ein Ausschnitt der relevanten Ergebnisse der Gegenüberstellung der *S. aureus*-Sequenzen ist in Abbildung 3.4 gezeigt, und nachfolgend findet sich der Sequenznachweis für das Multiple-Sequence-Alignment.

Sequenznachweis (Accession, Organismus, Locus-Tag):

NC_007622, *Staphylococcus aureus* RF122, SAB0019.
 NC_002758, *Staphylococcus aureus* Mu50, SAV0019.
 NC_002953, *Staphylococcus aureus* MSSA476, SAS0019.
 NC_002952, *Staphylococcus aureus* MRSA252, SAR0019.
 NC_002745, *Staphylococcus aureus* N315, N315_SA0018.
 NC_003923, *Staphylococcus aureus* MW2, MW0019.
 NC_007795, *Staphylococcus aureus* NCTC 8325, SAOUHSC_00021.
 NC_002951, *Staphylococcus aureus* COL, SACOL0020.
 NC_009641, *Staphylococcus aureus* Newman, NWMN_0018.
 NC_009782, *Staphylococcus aureus* Mu3, SAHV_0019.
 NC_009632, *Staphylococcus aureus* JH1, SaurJH1_0019.
 NC_009487, *Staphylococcus aureus* JH9, SaurJH9_0019.
 AF136709, *Staphylococcus aureus* 8325-4, YycG
 (TÜRCK, 2004), *Staphylococcus aureus* SA137/93A, YycG

Bezüglich des Aminosäureaustausches ist zu beachten, dass beim Vektor pTvicRK(Y306N), der zur Überexpression von *yycFG*(T916A) in *S. aureus* verwendet wurde, der Aminosäureaustausch in dem translatierten YycG-Protein in Position 306 liegt. Bei dem Vektor pET22bΔpelBvicK(Y308N) hingegen, der zur rekombinanten Expression und Aufreinigung des *S. aureus*-Proteins in *E. coli* verwendet wurde, liegt der Aminosäureaustausch in der mutierten YycG-Kinase in Position 308, weil bei der Vektorkonstruktion, zur Verhinderung eines Frame-Shifts, der ursprünglichen Aminosäuresequenz N-terminal ein Methion- und ein Glycin-Rest vorangestellt wurden (siehe Abschnitt 3.8). Der Aminosäureaustausch bleibt dadurch trotzdem an der gleichen Stelle der putativen PAS-Domäne wie in der Original-Sequenz erhalten. Die mutierte YycG-Kinase, die so rekombinant exprimiert und aufgereinigt wurde, trägt aber folgerichtig die Bezeichnung YycG(Y308N).

```

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment

JH1_SaurJH1_0019      251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
JH9_SaurJH9_0019     251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
Mu3_SAHV_0019        251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
Newman_NWMN_0018     251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
COL_SACOL0020        251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
8325-4_YycG          251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
NCTC8325_SAOUHSC_00021 251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
137/93A_YycG         251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
RF122_SAB0019       251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
Mu50_SAV0019        251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
MSSA476_SAS0019     251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
MRSA252_SAR0019     251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
N315_SA0018         251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
MW2_MW0019          251 VQEAQANTESEKRRLLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGMAK 300
*****:****
      ↓
JH1_SaurJH1_0019      301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
JH9_SaurJH9_0019     301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
Mu3_SAHV_0019        301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
Newman_NWMN_0018     301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
COL_SACOL0020        301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
8325-4_YycG          301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
NCTC8325_SAOUHSC_00021 301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
137/93A_YycG         301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
RF122_SAB0019       301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
Mu50_SAV0019        301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
MSSA476_SAS0019     301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
MRSA252_SAR0019     301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
N315_SA0018         301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
MW2_MW0019          301 EDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIV 350
*****:****

JH1_SaurJH1_0019      351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
JH9_SaurJH9_0019     351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
Mu3_SAHV_0019        351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
Newman_NWMN_0018     351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
COL_SACOL0020        351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
8325-4_YycG          351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
NCTC8325_SAOUHSC_00021 351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
137/93A_YycG         351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
RF122_SAB0019       351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
Mu50_SAV0019        351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
MSSA476_SAS0019     351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
MRSA252_SAR0019     351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
N315_SA0018         351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
MW2_MW0019          351 IDFNMFINKI INRHESAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVIT 500
*****:*****

```

Abbildung 3.4: Ausschnitt aus dem Clustal W2 Multiple-Sequence-Alignment für die Aminosäuresequenz von YycG von 14 *S. aureus*-Stämmen. Aufgeführt ist neben dem Sequenzabschnitt jeweils der *S. aureus* Stamm und das für YycG stammspezifische Locus-Tag, unter dem für alle Stämme (außer SA137/93A) die Aminosäuresequenz in der NCBI-Datenbank hinterlegt ist. Die beiden einzigen Aminosäureaustausche, die für die *S. aureus*-Stämme Newman in Position 296 (L→F) und MRSA252 in Position 368 (A→T) auffindig gemacht wurden, sind schwarz hinterlegt. Die Position, bei der es in der mutierten YycG-Kinase zum Aminosäureaustausch kommt, ist durch einen „↓“ gekennzeichnet.

Da anhand des Multiple-Sequenz-Alignment deutlich wurde, dass innerhalb von diversen *S. aureus*-Stämmen die Aminosäuresequenz von YycG relativ konserviert und damit der Aminosäureaustausch (Y→N) der mutierten YycG-Kinase zumindest auf Stamm-Ebene ungewöhnlich ist, wurde mit den Aminosäuresequenzen von 14 orthologen Klasse I-YycG-Proteinen aus Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt, die mit *S. aureus* entfernter verwandt sind, zunächst ein Multiple-Sequence-Alignment mit dem Online-Tool Clustal W (Version 1.81; Zugriff über <http://align.genome.jp/>; (THOMPSON et al., 1994)) gegen die Sequenz von YycG von *S. aureus* N315 durchgeführt. Dabei ist zu bemerken, dass die Aminosäuresequenz von YycG von *S. aureus* N315 vollkommen identisch zu der Sequenz von YycG aus *S. aureus* SA137/93A ist. Mit dem so erstellten Ergebnis des Multiple-Sequence-Alignments, wurde mit dem Online-Tool BOXSHADE 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html; written by K. HOFMANN and M. D. BARON) eine Grafik erstellt, die die hochkonservierten Aminosäurereste in den gegenübergestellten Sequenzen hervorhebt und so auf einen Blick eine deutlich fundiertere Aussage zum Grad der Konservierung einzelner Aminosäurereste zulässt. Diese Gegenüberstellung der Sequenzen zeigt Abbildung 3.5 und nachfolgend findet sich der Sequenznachweis für das Multiple-Sequence-Alignment.

Sequenznachweis (Accession, Organismus, Locus-Tag):

NC_004461, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, SE0019.
NC_002745, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* N315, SA0018.
NC_007168, *Staphylococcus haemolyticus* JCSC1435, SH0018.
NC_007350, *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305, SSP0022.
NC_012121, *Staphylococcus carnosus* subsp. *carnosus* TM300, Sca_2455.
NC_003212, *Listeria innocua* Clip11262, Lin0316.
NC_003210, *Listeria monocytogenes* EGD-e, Lmo0288.
NC_004722, *Bacillus cereus* ATCC 14579, BC5462.
NC_003997, *Bacillus anthracis* str. Ames, BA5714.
NC_000964, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168, Bsu40400.
NC_002570, *Bacillus halodurans* C-125, BH4026.
NC_004193, *Oceanobacillus iheyensis* HTE831, OB3451.
NC_004567, *Lactobacillus plantarum* WCFS1, Lp_0037.
NC_005362, *Lactobacillus johnsonii* NCC 533, LJ0066.
NC_004668, *Enterococcus faecalis* V583, EF1194.

Der Zugang zu den vollständig sequenzierten Genomen erfolgte über die NCBI-Datenbank unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

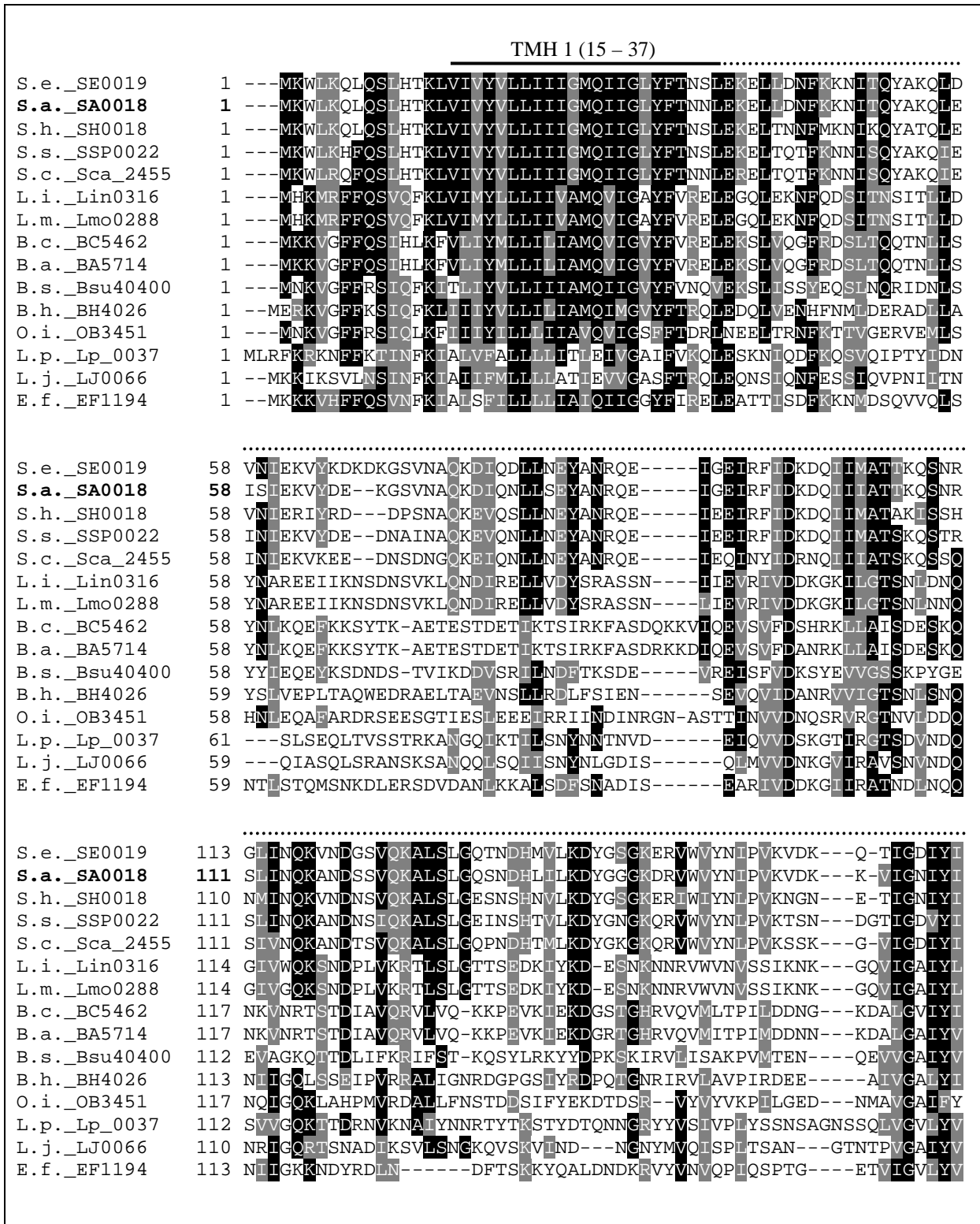


Abbildung 3.5: BOXSHADE 3.21-Abbildung. Sich gegenübergestellt wurden die Aminosäuresequenzen von orthologen Klasse I-YycG-Proteinen aus 15 vollständig sequenzierten Genomen von Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt. Die Position, in der es in der mutierten YycG-Kinase zum Aminosäureaustausch kommt, ist durch einen „↓“ kenntlich gemacht. Die Bereiche der beiden Transmembran-Helices in *S. aureus* sind oberhalb der Sequenz mit „TMH 1“ und „TMH 2“ eingezeichnet. Desweiteren wurden ebenfalls die Bereiche der konservierten Domänen und der Bereich der extraplasmatischen Schleife eingezeichnet.

Fortsetzung auf der folgenden Seite

		TMH 2 (183 – 205)	HAMP (206 – ...)
S.e._SE0019	169	ESKINDVYNQLNNINQIFIVGTAISLFFITVILGFFIARTITKPIIDMRNQTVEMSKGNYS	
S.a._SA0018	167	ESKINDVYNQLNNINQIFIVGTAISLLITVILGFFIARTITKPIIDMRNQTVEMSRGNYS	
S.h._SH0018	166	ESNINDVYNQLNNINQIFIICTAISLFFITVILGFFIARTITKPIIDMRNQTVEMSKGNYS	
S.s._SSP0022	168	EADINDVYNQLSNINQIFIVGTGISLLITVILGFFIARTITKPIIDMRNQTVEMSKGNYS	
S.c._Sca_2455	167	ESDIDNVYDQLNNINQIFIVGTAISLFFITGLLGFFIARTITKPIIDMRNQTVEMSKGNYS	
L.i._Lin0316	170	VADIESVYKQVDDITNIFITGTLIAMIITAVLGILLSTRTITKPIIEMKROAYAMARGNYS	
L.m._Lmo0288	170	VADIESVYKQVDDITNIFITGTLIAMIITAVLGILLSTRTITKPIIEMKROAYAMARGNYS	
B.c._BC5462	173	VASMEDVYKQMKDINQIFATGTVIALLVAVLGILLAQITTRPISDMRRQAIEMAKGNYS	
B.a._BA5714	173	VASMEDVYKQMKDINQIFATGTVIALLVAVLGILLAQITTRPISDMRRQAIEMAKGNYS	
B.s._Bsu40400	167	VASMEDVFNQMKTINTILASCTGLALVLTALLGIFLARTITTHPLSDMRKQAMELAKGNFS	
B.h._BH4026	168	EASIEDTYDQMDINSILASGTLIAASITALLMILLSTRTITGPILDMRKQALRMGYGDFS	
O.i._OB3451	172	KSSLEEVYQIEDIENNIFLQGSILAITISAIIGILVARTITKPIEMEMREQALIMANGDFT	
L.p._Lp_0037	172	RANMKSVMYSTINNIMGLFVIAASLAAMVILGLGIAIIARAITTRPIIEMKQQTQRIARGDYA	
L.j._LJ0066	164	RASLQGVFNLRQVSIYFLIASLIAAVLGAVALVTSRAITTRPIIEMKQALRVANGDYS	
E.f._EF1194	163	KSNLENKYQETINTASIEFTASIIAAASIIIVTLLIARSITKPIIEMREQAIRIARGDYA	
		HAMP (... – 253)	PAS (263 – ...)
S.e._SE0019	229	QRVKIYGNDEIGELALAFNNLSKRVQEAQANTESEKRRLDSVI THMSDGI IATDRRGRVR	
S.a._SA0018	227	QRVKIYGNDEIGELALAFNNLSKRVQEAQANTESEKRRLDSVI THMSDGI IATDRRGRIR	
S.h._SH0018	226	QRVKIYGNDEIGELALAFNNLSKRVQEAQANTESEKRRLDSVI THMSDGI IATDRRGRVR	
S.s._SSP0022	228	QRVKIYGNDEIGELALAFNNLSKRVQEAQANTESEKRRLDSVI THMSDGI IATDRRGRVR	
S.c._Sca_2455	227	QRVKIYGNDEIGELALAFNNLSKRVQEAQANTESEKRRLDSVI THMSDGI IATDRRGRIR	
L.i._Lin0316	230	RKVKVYGVDEIGELADSFNLTIKRVQEAQAMTEGERRKLS SSVLAYMTDGV IATDRRGKVI	
L.m._Lmo0288	230	RKVKVYGVDEIGELADSFNLTIKRVQEAQAMTEGERRKLS SSVLAYMTDGV IATDRRGKVI	
B.c._BC5462	233	RKVKVHSHDEIGQLALSFNNLSKKLQQAARSSSESERRKLS SSVLSHMTDGV IATDRKGDII	
B.a._BA5714	233	RKVKVHSHDEIGQLALSFNNLSKKLQQAARSSSESERRKLS SSVLSHMTDGV IATDRKGDII	
B.s._Bsu40400	227	RKVKKYGHDEIGQLATIFNHLTRELEDAQAMTEGERRKLSV LAYMTDGV IATNRNGAII	
B.h._BH4026	228	RKVNVTSTDEIGQLAMSFNDLIMKLDALSTRDQEQKRLRSV LTHMTDGV IASDKYKMI	
O.i._OB3451	232	QKVNVIYGRDEIGQLAETIFNDLNSRLKHSYATIEEERRKLS SII LANMSDGV IATDNDGSVT	
L.p._Lp_0037	232	GQVRVYSDDELGQLAKAINNLSIRVEESQESTEAEERRR LDSVLSHMSDGV IATDRRGNIT	
L.j._LJ0066	224	GHVRVYAQDELGQLAEAFNTLSVRIERTQEISDSERRRLD NVLTHMTDGV IATDRHGNIT	
E.f._EF1194	223	GKVEVHGKDELGQLAETIFNQLSERIEEAQETMEAEERN RLDVSLVTHMTDGV IATDRRGKVI	
		↓	PAS (... – 326)
S.e._SE0019	289	IANDMALKMLGLAKEDVIGYYMLGVLNLENEFSLEETIQENS DSDSFLLDIN-EEEG---IIA	
S.a._SA0018	287	IVNDMALKMLGMAKEDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEQENND SFLLDLN-EEEG---IIA	
S.h._SH0018	286	IVNDMAIKMLGMSKEDLIIGYYMLSVLSLEDEFSLDEIQEN ND SFLLDIN-EDEG---IIA	
S.s._SSP0022	288	IVNDMALIMGTMKEDIIGDHMLKVLKLEEDFSLDEIQENND SFLLDIN-ENEG---IIA	
S.c._Sca_2455	287	IVNDMALKMLGMAKEDVMGYNMLSVLDLEDEFALDEM QENNSFLLDIN-EEEG---IIA	
L.i._Lin0316	290	LINTPAEKMLRVKHE SANGRSIIDVLDIGDTYQFEDLMEVDG S L TMDRSTLDKP---YVL	
L.m._Lmo0288	290	LINTPAEKMLRVKHE SANGRSIIDVLDIGDTYQFEDLMEVDG S L TMDRSTLDKP---YVL	
B.c._BC5462	293	LLNDPAEKMLNVSRETALDQSVLEVLGIQEEFTLDHLYE EPD SVLLDFSTRNEP---YIL	
B.a._BA5714	293	LLNDPAEKMLNVSRETALDQSVLEVLGIQEEFTLDHLYE EPD SVLLDFSTRNEP---YIL	
B.s._Bsu40400	287	LLNSPALELLNVSRETAL EMPITSLGLQENYTFEDLVEQO DSMLLEIERDDEL---TVL	
B.h._BH4026	288	LMNKRAEEMLGVS YEEVQGTLLPELLNISETFAVDELYD YNDSVLLDFS-TEED---YLI	
O.i._OB3451	292	LMNDAAAKLIGENPEDLIGDSVIDVLHLEGEIDLSELHNSG SMIDFSNEDTP---FLI	
L.p._Lp_0037	292	IINETASDFMDVTAEKALGNSILDILKIRDDYSIRDLIENODE LMLDFSSNERD---LIL	
L.j._LJ0066	284	IINETALDFLCKTEKDVIGKPIITNLLGLKDVTIQDL LSTQOQLVVRVNDNTRDE---MIL	
E.f._EF1194	283	TINEMALSLLNVKNENVIGTSLLELLLDIEEDYTLRKLLE EPDELLIDRSTSDREEDQMI	

Organismen-Schlüssel:

B.a.	=	<i>Bacillus anthracis</i>	L.p.	=	<i>Lactobacillus plantarum</i>
B.c.	=	<i>Bacillus cereus</i>	O.i.	=	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>
B.h.	=	<i>Bacillus halodurans</i>	S.a.	=	<i>Staphylococcus aureus</i>
B.s.	=	<i>Bacillus subtilis</i>	S.c.	=	<i>Staphylococcus carnosus</i>
E.f.	=	<i>Enterococcus faecalis</i>	S.e.	=	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
L.i.	=	<i>Listeria innocua</i>	S.h.	=	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
L.j.	=	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	S.s.	=	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
L.m.	=	<i>Listeria monocytogenes</i>			

Abbildung 3.5 (fortgesetzt)

		HisKA (379 – ...)			
S.e._SE0019	345	RVNFSTIVQETGFVTG	YI AVLH DVT EQQVERERREFVANVSHELRTPLTSMNSYIEALE		
S.a._SA0018	343	RVNFSTIVQETGFVTG	YI AVLH DVT EQQVERERREFVANVSHELRTPLTSMNSYIEALE		
S.h._SH0018	342	RVNFSTIVQETGFVTG	YI AVLH DVT EQQVERERREFVANVSHELRTPLTSMNSYIEALE		
S.s._SSP0022	344	RVNFSTIVQETGFVTG	YI AVLH DVT EQQVERERREFVANVSHELRTPLTSMNSYIEALE		
S.c._Sca_2455	343	RVSFSTIVQDTGFVTG	YI AVLH DVT EQQNERDRREFVANVSHELRTPLTSMNSYLEALE		
L.i._Lin0316	347	RANFSVIQRETGFNNG	VI AVLH DITDQEKVDQERRDFVSNVSHELRTPLTSMHSYLEALS		
L.m._Lmo0288	347	RANFSVIQRETGFNNG	VI AVLH DITDQEKVDQERRDFVSNVSHELRTPLTSMHSYLEALS		
B.c._BC5462	350	RASFVSIQKETGKANG	LIAVLYDVTEQERIERERREFVANVSHELRTPLTTMRSYLEALT		
B.a._BA5714	350	RASFVSIQKETGKANG	LIAVLYDVTEQERIERERREFVANVSHELRTPLTTMRSYLEALT		
B.s._Bsu40400	344	RVNFSVIQREHCK	LDGLIAVLYDVTEQEKMDQERREFVANVSHELRTPLTTMRSYLEALA		
B.h._BH4026	344	QASFVSIQEDGCPV	NGLITVLH DVT EREKIEQERREFVANVSHELRTPLTTMKSYLEALD		
O.i._OB3451	349	RANFSTVVDDEEEV	TGFTITVLS DVTEQQKMEQERRDFVSNVSHELRTPLTTMKSYLEALS		
L.p._Lp_0037	349	NAYFSLIQRESGFL	SGLVLCV LHDVT EQQKIDNDRKQFVSNVSHELRTPLTSLRSYIEALS		
L.j._LJ0066	341	HANFSLIQRV	TGFVSGLVLCV LHDITDQKNEREQQDFVSNVSHELRTPLTSLRAYVEALN		
E.f._EF1194	343	RVDFTMIRRESG	FITGLVLCV LHDVT EQEKNERERREFVSNVSHELRTPLTSMRSYIEALS		
		HisKA (... – 438)			
S.e._SE0019	405	EGAWQDKELAP	SFLSVTREETERMIRLVNDLLQLSKMD-----NESDQITKEIIDFNMFII		
S.a._SA0018	403	EGAWKDEELAP	QFLSVTREETERMIRLVNDLLQLSKMD-----NESDQINKEIIDFNMFII		
S.h._SH0018	402	EGVWKDDNLAP	SFLSVTREETERMIRLVNDLLQLSKMD-----NESEQITKEIVDFNMFII		
S.s._SSP0022	404	SGAWKDGELAP	QFLSVTREETERMIRLVNDLLQLSKMD-----NESEQITKEIVDFNMFII		
S.c._Sca_2455	403	EGAWKDEEIAPO	FLLSVTREETV RMIRLVNDLLQLSKMDNANEENASNQVTKEIVDFNMFII		
L.i._Lin0316	407	DGAWEDKEIAP	RFLVTONETERMIRLVNDLLKLSRMD-----GGREQLEKSFVNFDTDF		
L.m._Lmo0288	407	DGAWEDKEIAP	RFLVTONETERMIRLVNDLLKLSRMD-----GGREQLEKSFVNFDTDF		
B.c._BC5462	410	DGAWQDPNIAPO	FLVTVQEEETERMIRLVNALLQLSKLD-----STEHRIMKEWVDFDTDF		
B.a._BA5714	410	DGAWQDPNIAPO	FLVTVQEEETERMIRLVNALLQLSKLD-----STEHRIMKEWVDFDTDF		
B.s._Bsu40400	404	EGAWENKDIAP	RFLVTONETERMIRLVNDLLQLSKFD-----SKDYQFNREWIQIVRFM		
B.h._BH4026	404	DGAMNDPNIA	PRFLVTVQEEETERMIRLVNDLLQLSKLD-----THDYKLNLSWVLDLGPYL		
O.i._OB3451	409	DGAWENKEIAP	RFLDVTQKETNRMIRMVNDLLQLSKMD-----SDELPMHKQREFTSYL		
L.p._Lp_0037	409	DGAWKDPEVAP	GFVLPVTVQEEETERMIRMINELLSLSRMD-----SGTTRVDMELVNINEMF		
L.j._LJ0066	401	DGAWKDPNIAPO	FLVTVQEEETERMIRMINDLLSLSRMD-----RGVAKMDLEWVNLNDFV		
E.f._EF1194	403	EGAWENPEIAP	NFLKVTLEETDRMIRMINDLLNLSRMD-----SGNTHLQLEYVNFNELI		
		HATPase_c (493 – ...)			
S.e._SE0019	460	NKIIINRHEMAA	-----KDTTFVREIPQQTIFA EIDPDKMTQVFDNVITNAMKYSRG		
S.a._SA0018	458	NKIIINRHEMSA	-----KDTTFIRDIPKKTIFTEIDPDKMTQVFDNVITNAMKYSRG		
S.h._SH0018	457	NKIIINRHEMAA	-----KDTTFVREIPSETIFTEIDPDKMTQVFDNVITNAMKYSRG		
S.s._SSP0022	459	NKIIINRHEMSA	-----KDTTFVREVPPTETIFTEIDPDKMTQVFDNVITNAMKYSRG		
S.c._Sca_2455	463	NKIIINRHEMAA	-----KDVTFVRDIP EETIFTEIDPDKMTQVFDNVITNATKYSRG		
L.i._Lin0316	462	NHIIDRFEMMK	-----KETIMFKRHIKPEPVIIEIDEDKVMQVLDNII SNANKYSPD		
L.m._Lmo0288	462	NHIIDRFEMMK	-----KETIMFKRHIPREPVIIEIDEDKVMQVLDNII SNANKYSPD		
B.c._BC5462	465	NNIIDRFEMSK	-----EQNVSFKRSFSKKS RFDMDTDKITQVLYNII SNALKYSPE		
B.a._BA5714	465	NNIIDRFEMSK	-----EQNVSFKRSFSKKS RFDMDTDKITQVLYNII SNALKYSPE		
B.s._Bsu40400	459	SLIIDRFEMTK	-----EQHVEFIRNLPDRDLYVEIDQDKITQVLDNII SNALKYSPE		
B.h._BH4026	459	HDMIDRHEIIAK	-----EKDIHFIRKITKHATFVEIDQDKITQVLDNII SNALKYSPE		
O.i._OB3451	464	YQVLDREYEMNK	-----PESIHMEKNIPNTKAYVWDRDKITQVLDNVITNAIKYSPD		
L.p._Lp_0037	464	NYVLDREFDMILK	--KDDNPAKYTTIKREFTKRDLWVEIDTDKFTQVLDNIMNNAIKYSPD		
L.j._LJ0066	456	NHVLNRFDMMLK	SDTDKTHKKKYSIKREFPHQALWVEIDTDKMMQVLDNIMNNAIKYSPD		
E.f._EF1194	458	NFVLDREFDMIE	----NEQKNYKICREFTKRDLWVEIDTDKVIQVLDNII LNNAIKYSPD		
Organismen-Schlüssel:					
B.a.	=	<i>Bacillus anthracis</i>	L.p.	=	<i>Lactobacillus plantarum</i>
B.c.	=	<i>Bacillus cereus</i>	O.i.	=	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>
B.h.	=	<i>Bacillus halodurans</i>	S.a.	=	<i>Staphylococcus aureus</i>
B.s.	=	<i>Bacillus subtilis</i>	S.c.	=	<i>Staphylococcus carnosus</i>
E.f.	=	<i>Enterococcus faecalis</i>	S.e.	=	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
L.i.	=	<i>Listeria innocua</i>	S.h.	=	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
L.j.	=	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	S.s.	=	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
L.m.	=	<i>Listeria monocytogenes</i>			

Abbildung 3.5 (fortgesetzt)

Fortsetzung auf der folgenden Seite

		HATPase_c (...)	
S.e._SE0019	511	EKRVEFHVKQNALYNRM	TIIRIKDNGIGIPINKVDKIFDRFYRVDKARTRKMGGTGLGLAI
S.a._SA0018	509	DKRVEFHVKQNP	LYNRMTIIRIKDNGIGIPINKVDKIFDRFYRVDKARTRKMGGTGLGLAI
S.h._SH0018	508	EKRVEFHVKQNALYNRM	TIIRIKDNGIGIPINKVDKIFDRFYRVDKARTRKMGGTGLGLAI
S.s._SSP0022	510	DKRVEFHVKQNALYNRM	TIIRIKDNGIGIPINKVDKIFDRFYRVDKARTRKMGGTGLGLAI
S.c._Sca_2455	514	DKRVEFHVKPNPLYNRMT	TIIRIKDNGIGIPITKVDKIFDRFFRVDKARARKMGGTGLGLAI
L.i._Lin0316	514	GGRISFYLLKFFED--E	IEVSIADDEGLGVPDEDLANVDFRFFRVDKARSREMGGTGLGLAI
L.m._Lmo0288	514	GGRISFYLLKFFED--E	IEVSIADDEGLGVPDEDLANVDFRFFRVDKARSREMGGTGLGLAI
B.c._BC5462	517	GGTVTYRLRDRGD--L	LEISVSDQGMGIPKENVDKIFERFYRVDKARSRQMGGTGLGLAI
B.a._BA5714	517	GGTVTYRLRDRGE--L	LEISVSDQGMGIPKENVDKIFERFYRVDKARSRQMGGTGLGLAI
B.s._Bsu40400	511	GGHVTFSDVNEEEELLY	ISVKDEGIGIPKDVKVFDRFYRVDKARTRKLGGTGLGLAI
B.h._BH4026	512	GGDVITILLHQHNN--V	RVSISDQGMGIPKESQTKIFDRFYRVDKARSVGGTGLGLAI
O.i._OB3451	516	GGKIRVKLDIRRHY--L	LVSIQDQGMGIAYDKLDKIFERFYRVDKARNRKLGGTGLGLAI
L.p._Lp_0037	522	GGVVTICRLLETHNQ--V	ILSISDQGLGIPRADLGHVDFRFFRVDKARSRAQGGTGLGLAI
L.j._LJ0066	516	GGVITVRLQLQAQKH--V	ILSISDQGLGIPRKDLNKIFDRFYRVDKARSRKQGGTGLGLAI
E.f._EF1194	513	GGVITICRLVETHNN--V	VFSISDQGLGIPKDDLKGVFERFYRVDKARARAQGGTGLGLAI
		HATPase_c (... - 596)	
S.e._SE0019	571	SKEIVEAHNGRIWANS	VEGQGTSTIFITLPCETIEDGDWDE-----
S.a._SA0018	569	SKEIVEAHNGRIWANS	VEGQGTSTIFITLPCETIEDGDWDE-----
S.h._SH0018	568	SKEIVEAHNGRIWANS	VEGQGTSTIFITLPCETIEDGDWDEE-----
S.s._SSP0022	570	SKEIVEAHNGRIWANS	VEGQGTSTIFITLPCETILEDGDWDAE-----
S.c._Sca_2455	574	SKEIVEAHNGRIWANS	VEGQGTSTIFITLPCETIEDGDWDEA-----
L.i._Lin0316	572	AREVIEAHGGRIWAERNK	SKCTIIKFTLTPYSDLPEDDWE-----
L.m._Lmo0288	572	AREVIEAHGGRIWAERNK	NKCTIIKFTLTPYSDLPEDDWE-----
B.c._BC5462	575	AKEMIEAHGGSIWAKSE	EGKGTIIYFTLPMADDEDDWE-----
B.a._BA5714	575	AKEMIEAHGGSIWAKSE	EGKGTIIYFTLPMADDEDEWE-----
B.s._Bsu40400	571	AKEMVQAHGGDIWADSI	EGKGTITFTLTPYKEEQEDDWEA-----
B.h._BH4026	570	AKELVHAHGGEIWVBSKY	KVGTIIYFTLTPYSTFKGEA-----
O.i._OB3451	574	TKELVEAHHGQIWAQS	SEKGTIILFTLPLMSSKRGDVR-----
L.p._Lp_0037	580	SKEVVQMLGGRIWVDS	VEGKGTSTFYISLPYEPYEEEDLWDDDSQA
L.j._LJ0066	574	SKEIVEAHHGRIWADSA	EGSGSTFYISLPYEAISEEGENWDEV--
E.f._EF1194	571	SKEVIRAHNGSIWVST	EGETSTFYISLPYEPYEEEDWWE-----

Organismen-Schlüssel:					
B.a.	=	<i>Bacillus anthracis</i>	L.p.	=	<i>Lactobacillus plantarum</i>
B.c.	=	<i>Bacillus cereus</i>	O.i.	=	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>
B.h.	=	<i>Bacillus halodurans</i>	S.a.	=	<i>Staphylococcus aureus</i>
B.s.	=	<i>Bacillus subtilis</i>	S.c.	=	<i>Staphylococcus carnosus</i>
E.f.	=	<i>Enterococcus faecalis</i>	S.e.	=	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
L.i.	=	<i>Listeria innocua</i>	S.h.	=	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
L.j.	=	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	S.s.	=	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
L.m.	=	<i>Listeria monocytogenes</i>			

Abbildung 3.5 (fortgesetzt)

Aus Abbildung 3.5 wurde deutlich, dass es sich bei dem Aminosäureaustausch (Y→N) in der mutierten YycG-Kinase nicht um einen hochkonservierten Rest handelt. Vergleicht man innerhalb der Gattung *Staphylococcus*, so erkennt man, dass neben *S. aureus* noch drei weitere (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. carnosus*) der insgesamt fünf hier betrachteten Vertreter dieser Gattung einen Tyrosin-Rest in dieser Position der Sequenz besitzen. *S. saprophyticus* hingegen besitzt in dieser Position einen Aspartat-Rest. Unter Betrachtung aller Sequenzen folgt in abschließender Bewertung und unter Berücksichtigung, dass dieser Austausch bei *S. aureus* auf Stamm-Ebene ungewöhnlich ist (Abbildung 3.4), dass dieser

Austausch höchstwahrscheinlich keinen drastischen Effekt auf die Funktionalität der mutierten YycG-Kinase hat, und dass damit auch ein rein phänotypischer und *in vitro* geführter Nachweis eines Effektes nicht einfach zu beobachten sein würde. Das Multiple-Sequence-Alignment zeigte aber ein anderes interessantes Ergebnis – so ist es auffällig, dass es sich bei den Aminosäuren im Bereich der beiden Transmembran-Domänen der YycG-Kinase von *S. aureus* und bei allen anderen orthologen YycG-Proteinen in vielen Positionen um sehr konservierte Aminosäurereste handelt. Dagegen ist der Bereich der extraplasmatischen Schleife mit der putativen PAS-ähnlichen Domäne (Abschnitt 3.2), der von den beiden Transmembran-Domänen flankiert wird, deutlich schwächer konserviert als man es für einen Proteinabschnitt, der eine mögliche Rolle bei der Signalerkennung spielen könnte, eigentlich erwarten würde. Beides könnten wichtige Indizien dafür sein, dass bei den orthologen Klasse I-Yyc-Kinasen den Transmembran-Domänen eine tragende Rolle bei der Signal-Transduktion zukommen könnte.

3.4 *S. aureus*-Klone mit Xylose-induzierter Überexpression von *yycFG*

Da das Zweikomponentenregulationssystem YycFG in *S. aureus* essentiell ist, kann weder das für die Sensor-Histidin-Kinase codierende Gen *yycG* noch das für den dazugehörigen Responseregulator codierende Gen *yycF* ausgeschaltet werden, um anhand von Knock-Out-Mutanten eine funktionale Charakterisierung dieses Systems durchzuführen. Eine Alternative zur Deletion oder Disruption dieser Gene ist die gezielte Überexpression. Aus den daraus resultierenden, phänotypischen Effekten können Rückschlüsse auf die eigentliche Funktion gezogen werden. Zu diesem Zweck wurde der durch Xylose-induzierbare Vektor pTX15 (PESCHEL et al., 1996) verwendet, welcher die induzierbare Expression von promotorlosen Genen erlaubt, die unter die Kontrolle des XylR-Repressors gebracht werden. Das *xylR*-Gen, die XylR-Zielsequenz und die *xylA*-Promotor/Operator-Sequenz stammen aus *Staphylococcus xylosus*. In Abwesenheit von Xylose kommt es zur Repression des *xylA*-Promotors durch XylR. Ferner stellt die glucosebedingte Katabolit-Repression ein weiteres regulatorisches Moment dar (K. P. WIELAND et al., 1995). Da die im Medium vorhandene Glucose durch das bakterielle Wachstum allerdings relativ schnell verbraucht wird und die Verstoffwechslung von Xylose auf wenige Staphylokokken-Spezies beschränkt ist, zu denen *S. aureus* nicht gehört (GÖTZ et al., 2006), können durch die Anwesenheit von 0,5 % (w/v) Xylose hohe Expressionsraten der in pTX15 heterolog inserierten Gene erzielt werden (PESCHEL et al., 1996).

Zur Untersuchung der phänotypischen Effekte, die sich durch die Überexpression von *yycFG* ergeben, wurde der *S. aureus* Stamm 8325-4 SH1000 mit den auf pTX15 basierenden Xylose-induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) verwendet (TÜRCK, 2004; JANSEN et al., 2007). In aller Kürze sei hier nur das Wesentliche beschrieben: Ein für *yycFG* codierendes Fragment wurde mittels der Template-DNA von *S. aureus*-Stamm SA137/93A und den spezifischen Primern 5'-TAAAGATCTAAGAAAAGAGGTTTATGCAAA-3' und 5'-CATGGCGCCGAGTAGCGCTAAAATGACAGA-3' amplifiziert. Mit den Restriktasen *Bgl*II und *Nar*I (die Schnittstellen sind in den Primern unterstrichen) wurde das Fragment geschnitten und zwischen die *Bam*HI- und *Nar*I-Schnittstellen des zuvor verdauten Vektors pTX15 ligiert. Die resultierenden Plasmide pTvicRK und pTvicRK(Y306N) wurden zur Etablierung in *S. carnosus* TM300 Protoplasten transformiert und nach der Sequenzierung (Fa. Sequiserve) zur Überprüfung der Plasmidintegrität in *S. aureus* RN4220 elektroporiert. In einem weiteren Schritt erfolgte mit dem Bakteriophagen 80 α die Transduktion der Plasmide in *S. aureus* 8325-4 SH1000. Alle Selektionsschritte zwischen den Transformationsschritten erfolgten auf agarhaltigen Festmedien mit Tet. [25 μ g/ml] als selektives Agens.

Das Plasmid pTvicRK(Y306N) ist im Vergleich zur Sequenz von SA137/93A und pTvicRK durch einen nicht-stillen Nukleotidaustausch (T \rightarrow A) in Position 916 von *yycG* (*vicK*) gekennzeichnet, der in der Sensor-Histidin-Kinase YycG zu einem Aminosäureaustausch (Y \rightarrow N) in Position 306 führt und damit innerhalb der PAS-Domäne der Kinase liegt (Abbildung 3.3)

3.5 Quantitative Real-Time-PCRs (qRT-PCRs)

3.5.1 Quantifizierung der in *S. aureus* induzierten Überexpression von *yycFG*

Um die Transkriptmengen von *yycFG* in den *S. aureus* 8325-4 SH1000-Stämmen mit den durch Xylose-induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) bestimmen zu können, wurden diese in BHI $\frac{1}{2}$ + Tet. [25 μ g/ml] ohne bzw. mit 0,5 % (w/v) Xylose unter Schütteln inkubiert. Aus den Zellen erfolgte die Präparation von Gesamt-RNA zu Beginn oder in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD $_{600}$ von \sim 1 bzw. 3 – 3,5. Die präparierte Gesamt-RNA wurde nachfolgend mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, welche ihrerseits als Probenmaterial in die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) mit dem LightCycler $^{\circledR}$ -Instrument (Fa. Roche) eingesetzt wurde. Ausgehend von unabhängigen Zellkulturen erfolgten jeweils Dreifach-Bestimmungen der Kopienzahl des *yycG*-Gens. Da es sich aufgrund seiner polycistronischen Natur bei *yycFGHI* um ein einzelnes

Transkript handelt (Abschnitt 3.1), steht die für das *yycG*-Gen ermittelte Kopienzahl auch stellvertretend für das *yycF*-Gen. Mit der qRT-PCR erfolgte die Quantifizierung der Gesamtkopienzahl des *yycG*-Gens, d.h. es wurde dabei nicht zwischen den Transkripten differenziert, die vom Überexpressionsplasmid bzw. dem chromosomalen Locus stammen. Die ermittelten Kopienzahlen von *yycG* wurden in Korrelation zu 10^6 Kopien des konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gens *gyrB* gesetzt, für das als endogener Standard die Kopienzahl parallel in jeder Probe ermittelt wurde (Abbildung 3.6).

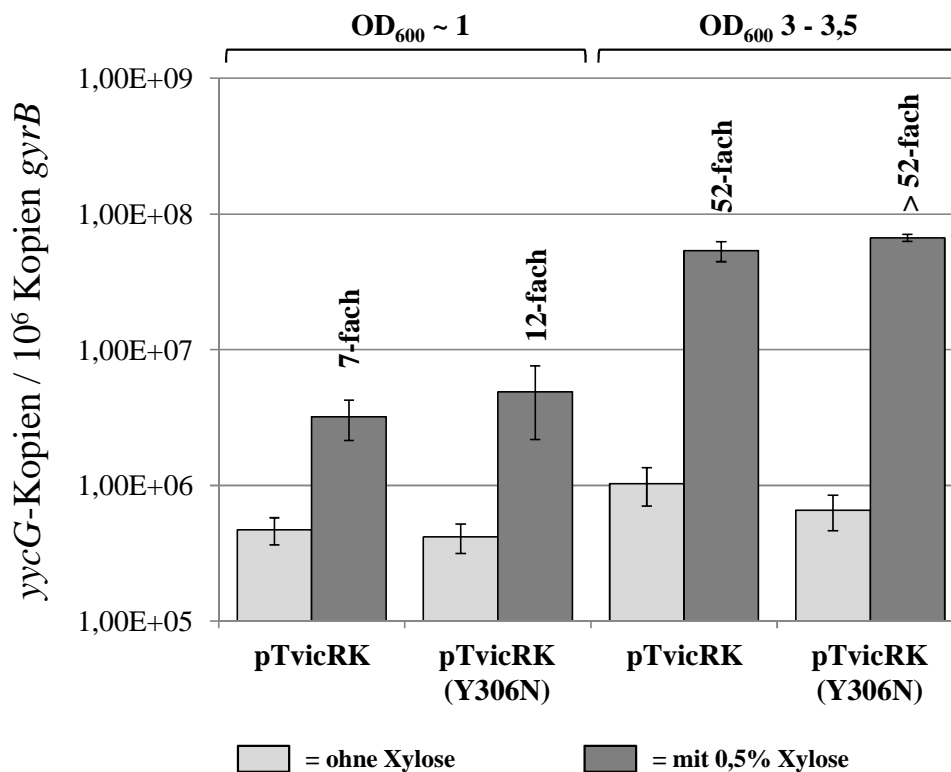


Abbildung 3.6: Ergebnisse der qRT-PCR zur Quantifizierung der Kopienzahl von *yycG* (und *yycF*) in An- und Abwesenheit von Xylose als Induktor der Überexpression von *yycFG* in den *S. aureus*-Stämmen 8325-4 SH1000 mit den induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N).

Deutlich zu erkennen ist, dass es in Anwesenheit von Xylose, zu einem deutlichen Anstieg der exprimierten *yycFG*-Transkripte bei den *S. aureus*-Stämmen 8325-4 SH1000pTvicRK und 8325-4 SH1000pTvicRK(Y306N) kommt, was sich anhand der stark gestiegenen Kopienzahl von *yycG* quantifizieren ließ. Dabei ist bei einer OD₆₀₀ von ~ 1 die Kopienzahl bei den induzierten Zellen um das 7- bis 12-fache höher als bei den nicht-induzierten Zellen. In einem OD₆₀₀-Bereich von 3 – 3,5 fällt dieser Effekt noch wesentlich massiver aus, und die Überexpression beträgt mindestens das 52-fache. Die höhere Überexpression bei der höheren

OD ist dabei aller Wahrscheinlichkeit nach auf die zu diesem Zeitpunkt abnehmende Glucose-Konzentration im Medium und die damit abnehmende Katabolit-Repression (Abschnitt 3.4) zurückführbar.

3.5.2 Untersuchung der Autoregulation der *yycFG*-Expression durch YycFG

Da erfolgreich gezeigt werden konnte, dass es in Anwesenheit von Xylose zu einer starken Überexpression von *yycFG* kommt (Abbildung 3.6), sollte nachfolgend überprüft werden, ob die Expression von *yycFG* einer Autoregulation durch die Sensor-Histidin-Kinase YycG bzw. den Response-Regulator YycF unterliegt. Zu diesem Zweck wurde ein Ansatz entwickelt, der es bei den induzierbaren Stämmen *S. aureus* 8325-4 SH1000pTvicRK und 8325-4 SH1000pTvicRK(Y306N), in Ab- und Anwesenheit von Xylose als Induktor der Überexpression von *yycFG*, nicht nur erlaubt mittels der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) die Gesamt-Transkriptmengen von *yycG* zu quantifizieren, sondern es vielmehr auch gestattet zu diskriminieren, in welchem Umfang die Kopien von den Überexpressionsplasmiden bzw. vom Chromosom stammen. Es wurde folgende Hypothese zu Grunde gelegt: Da es in Anwesenheit von Xylose und der damit einhergehenden Überexpression von *yycFG* auf den Expressionsplasmiden zu einem Anstieg der *yycFG*-Transkripte kommt, sollte im Falle der Autoregulation nicht nur die Menge der Transkripte, die von den Plasmiden stammt, steigen, sondern es sollte auch zu einem signifikanten Anstieg in der Menge der Transkripte kommen, die vom Chromosom stammen.

Nachweisstrategie:

Mit dem Online-Tool Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) wurde zunächst ein Multiple-Sequence-Alignment der chromosomalen Sequenz von *yycFG* des Elternstammes *S. aureus* 8325-4 (AF136709 unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) des für die Plasmid-vermittelte Überexpression von *yycFG* verwendeten Wirtstammes 8325-4 SH1000 und der Sequenz von *yycFG* aus *S. aureus* SA137/93A durchgeführt. Das Resultat dieser Gegenüberstellung war, dass es keinerlei Unterschiede in der Sequenz von *yycFG* in den beiden Stämmen gibt (ohne Abbildung). Das wiederum bedeutet, dass mit spezifischen Primern für *yycG* in der qRT-PCR bei einer direkten Quantifizierung der Transkripte in den Überexpressionsstämmen 8325-4 SH1000pTvicRK bzw. 8325-4 SH1000pTvicRK(Y306N) auch keine Diskriminierung zwischen dem chromosomalen oder vektoriellen Ursprung möglich ist. Andernfalls hätten Sequenzunterschiede, die bei der Schmelzkurvenanalyse in

der qRT-PCR mindestens einen Temperaturshift von 1 °C verursachen, innerhalb der Amplifikate genutzt werden können, um zwischen diesen Produkten und ihrem ursprünglichen Gen-Locus differenzieren zu können. Da die direkte Quantifizierung der Transkripte somit als Methode zur Differenzierung des Ursprungslocus ausschied, wurden die folgenden Möglichkeiten einer indirekten Quantifizierung in Betracht gezogen:

Semi-indirekte Quantifizierung:

Bei diesem Vorgehen wird für jede Probe mittels der qRT-PCR in zwei parallel zueinander durchgeführten Ansätzen zum einen durch die direkte Quantifizierung der *yycG*-Transkripte die Gesamt-Transkriptmenge bestimmt und zum anderen indirekt auch die Menge der *yycG*-Transkripte die a) einzig vom Vektor **oder** b) einzig vom Chromosom stammt, so dass über die Differenz der Anteil der Kopien bestimmt werden kann, die in Fall a) vom Chromosom oder in Fall b) vom Vektor stammen.

Vollständig-indirekte Quantifizierung:

Bei diesem Vorgehen wird für jede Probe mittels der qRT-PCR in zwei parallel zueinander durchgeführten Ansätzen sowohl die Menge der Transkripte die vom Vektor, als auch die Menge der Transkripte die vom Chromosom stammen, jeweils indirekt bestimmt.

Zur Überprüfung, ob bei *S. aureus* eine Autoregulation der *yycFG*-Expression stattfindet, wurde die letztgenannte Möglichkeit, also eine vollständig-indirekte Quantifizierung der *yycG*-Kopien mit chromosomalen oder vektorialen Ursprung, angewendet. Dabei erfolgte die Quantifizierung der jeweiligen *yycG*-Kopien, wie der Name schon sagt, über ein indirektes Nachweisfragment, das in möglichst geringer Distanz zu *yycG* und auf dem gleichen Transkript wie dieses liegt und deshalb repräsentativ für die Anzahl der *yycG*-Transkripte des jeweiligen Gen-Locus ist. Auf den Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) befindet sich stromabwärts, auf dem gleichen Transkript wie *yycFG*, ein Fragment des *lip*-Gens, das nach der Insertion des für *yycFG* codierenden Fragments in die *Bam*HI- und *Nar*I-Schnittstelle des Vektors pTX15 auf den neu entstandenen Plasmiden verblieben ist. Dieses Fragment wurde zur indirekten Quantifizierung der vektorialen *yycG*-Kopien verwendet. Die Spezifität der Nachweisprimer für das *lip*-Fragment auf den Plasmiden wird dabei durch die Tatsache gewährleistet, dass das *lip*-Gen ursprünglich aus *Staphylococcus hyicus* stammt und die Sequenz von *lip* bzw. die des Nachweisfragments nur eine sehr geringe Homologie zu den chromosomal-codierten Lipasen von *S. aureus* hat. Die polycistronische Natur des chromosomalen *yycFGHI*-Transkriptes (Abschnitt 3.1) erlaubt es, für das *yycH*-Gen mit

spezifischen Primern ein Nachweisfragment zu amplifizieren, das repräsentativ zur indirekten Quantifizierung der chromosomalen *yycG*-Kopien verwendet wurde. Einen Überblick über die Nachweisstrategie, mit der in der qRT-PCR eine vollständig-indirekte Quantifizierung der chromosomalen und vektoriiellen *yycG*-Kopien erfolgte, gibt Abbildung 3.7.

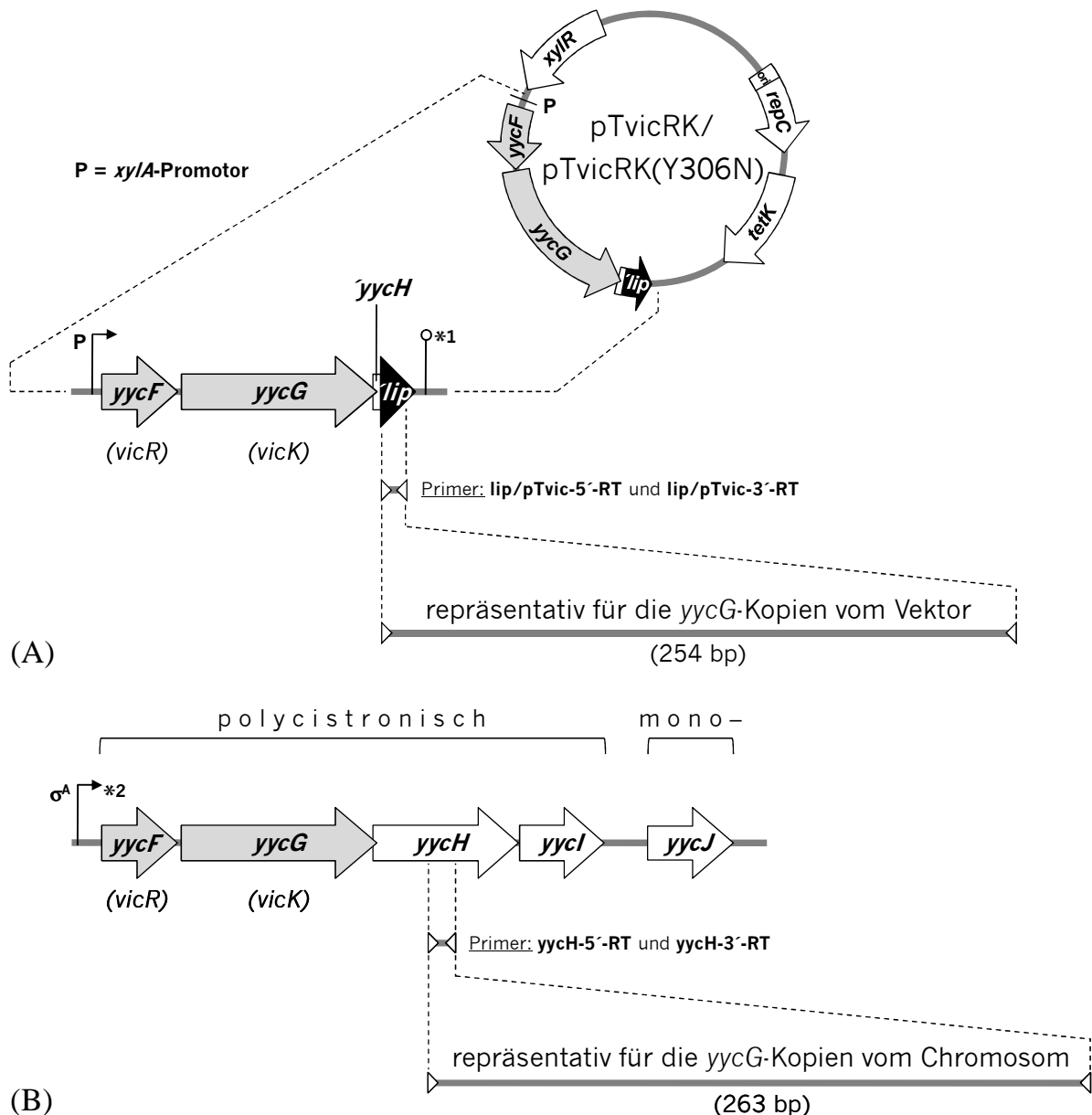
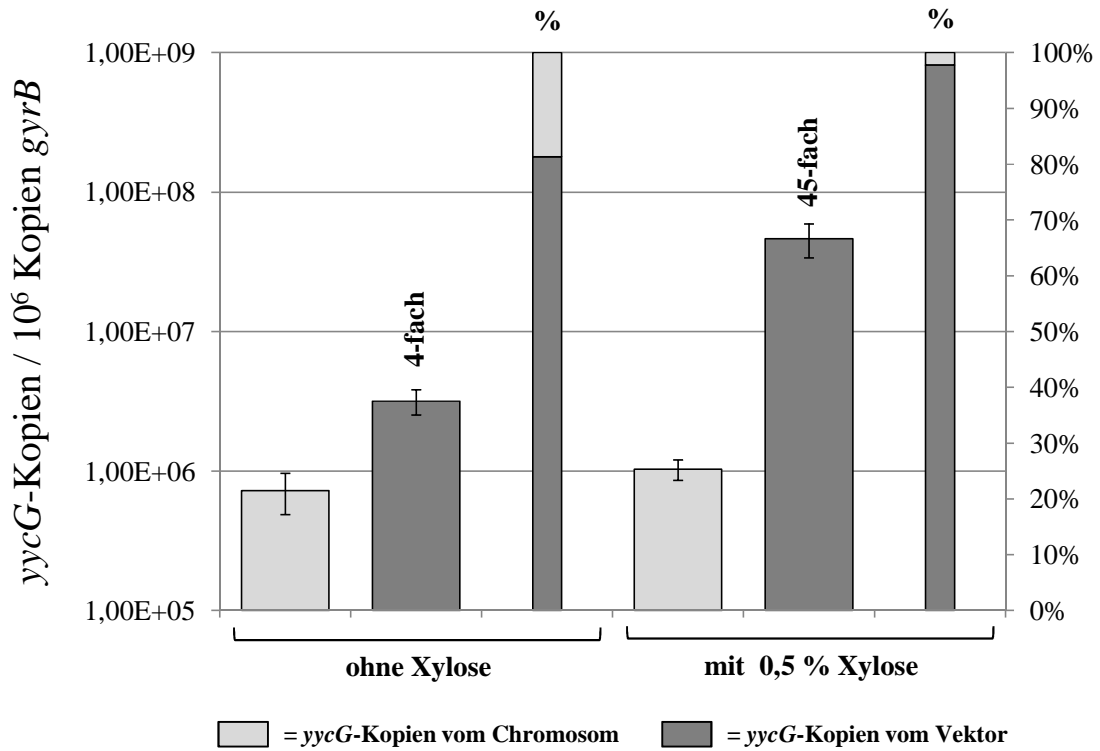
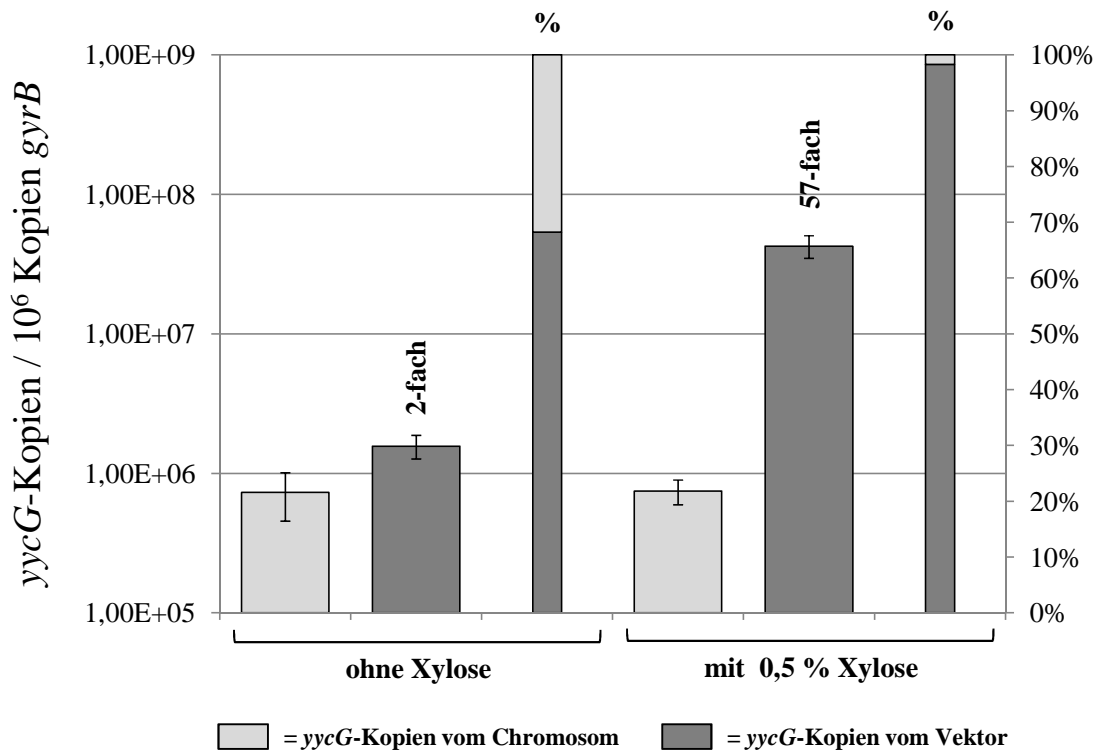


Abbildung 3.7: Nachweisstrategie mit der in der qRT-PCR eine vollständig-indirekte Quantifizierung der chromosomalen und vektoriiellen *yycG*-Kopien erfolgte. Zur indirekten Quantifizierung der vom Vektor stammenden *yycG*-Kopien wurde mit den Primern *lip/pTvic-5'-RT* und *lip/pTvic-3'-RT* ein repräsentatives Nachweisfragment des trunktierten *lip*-Genes amplifiziert, das auf den Vektoren *pTvicRK* und *pTvicRK(Y306N)* zusammen mit *yycFG* auf dem gleichen Transkript liegt (A). Die indirekte Quantifizierung der vom Chromosom stammenden *yycG*-Kopien erfolgte mit den Primern *yycH-5'-RT* und *yycH-3'-RT*, mit denen ein repräsentatives Nachweisfragment des Gens *yycH* amplifiziert wurde, das Teil des chromosomal-codierten, polycistronischen *yycFGHI*-Transkripts ist (B). ^{*1} *lip*-Terminator nach PESCHEL et al. (1996). ^{*2} putativer σ^A -Promotor nach MARTIN et al. (1999).

Die Quantifizierung der jeweiligen Kopienzahlen von *yycG* mittels der qRT-PCR erfolgte wie für die Bestimmung der Gesamt-Kopienzahl von *yycG* beschrieben (Abschnitt 2.5.14). Es wurde dabei bewusst der OD₆₀₀-Bereich von 3 – 3,5 analysiert, da es in diesem Bereich in Anwesenheit von Xylose zu einer mindestens 52-fachen Überexpression von *yycFG* kommt (siehe Abbildung 3.6). Sollte also tatsächlich eine Autoregulation stattfinden, dann sollte es in Anwesenheit von Xylose durch die Vektor-bedingte Überexpression von *yycFG* nicht nur insgesamt zu einem massiven Anstieg der *yycG*-Transkripte kommen, sondern auch zu einem sehr deutlichen Anstieg der Transkripte kommen, die vom Chromosom stammen. Das sollte sich entsprechend auch im Anteil dieser Transkripte an der Gesamtmenge von allen *yycG*-Kopien niederschlagen. Die Quantifizierung und Diskriminierung von vektoriiellen und chromosomalen *yycG*-Kopien in An- und Abwesenheit von Xylose ist in Abbildung 3.8 dargestellt.



(A)



(B)

Abbildung 3.8: Vollständig-indirekte Quantifizierung der vektoruellen und chromosomalen *yycG*-Kopien bei einer OD₆₀₀ von 3 - 3,5 in An- und Abwesenheit von Xylose als Induktor der *yycFG*-Überexpression auf den induzierbaren Plasmiden. Diskriminierung der vektoruellen und chromosomalen *yycG*-Kopien in *S. aureus*-Stämmen 8325-4 SH1000 pTvicRK(A) und 8325-4 SH1000 pTvicRK(Y306N) (B).

Bei den *S. aureus*-Stämmen 8325-4 SH1000pTvicRK und 8325-4 SH1000pTvicRK(Y306N) beträgt bereits in Abwesenheit von Xylose die Menge der vektoriiellen *yycG*-Transkripte das 2- bzw. 4-fache der Transkriptmengen, die vom Chromosom stammen. Bezogen auf die Gesamtkopienzahl besitzen die chromosomalen *yycG*-Kopien damit einen Anteil von 20 bzw. 30 %. Das Ergebnis, dass die Anzahl der vektoriiellen *yycG*-Kopien in Abwesenheit von Xylose nicht Null entspricht, beruht dabei auf den folgenden beiden Tatsachen: Der für die Konstruktion verwendete Ausgangsvektor pTX15 trägt das Middle-Copy-Replicon *repC* des Vektors pT181. Der Ausgangsvektor und die davon abgeleiteten, hier verwendeten Überexpressionsplasmide liegen deshalb in den Zellen in einer entsprechend hohen Ausgangskopienzahl vor. Damit einhergehend kommt es ferner bei fast allen Plasmiden, die durch einen Repressor kontrolliert werden, zum Phänomen der „leakyness“. D.h. auch in Anwesenheit des Repressors werden die Überexpressionsplasmide geringfügig abgelesen. In Anwesenheit von Xylose kommt es zwar zu einem massiven Anstieg in der Anzahl der *yycG*-Kopien, der sich allerdings fast ausschließlich auf die gestiegene Anzahl der *yycG*-Transkripte mit vektoriellem Ursprung zurückführen lässt. Im Vergleich zu den Transkripten, die vom Chromosom stammen, beträgt die Menge der vektoriiellen *yycG*-Transkripte das 45- bzw. 57-fache. Bezogen auf die Gesamtkopienzahl besitzen damit die chromosomalen *yycG*-Kopien nur noch einen Anteil von 2 %. Da man im Fall einer Autoregulation auch einen deutlichen Anstieg in der vom Chromosom stammenden Kopienzahl von *yycG* erwarten muss, lässt sich durch die vorliegenden Ergebnisse eine Autoregulation der *yycFG* Expression durch YycFG ausschließen.

3.6 Phänotypischer Einfluss der *yycFG*-Überexpression in *S. aureus*

Da gezeigt werden konnte, dass es in Anwesenheit von Xylose als Induktor in den *S. aureus*-Stämmen 8325-4 SH1000 mit den induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) zu einer massiven Überexpression der *yycFG*-Transkripte kommt, sollte in den folgenden Versuchen phänotypisch untersucht werden, wie sich die Überexpression in *S. aureus* auswirkt. So sollten mögliche Rückschlüsse auf die Funktion des durch *yycFG* codierten Zweikomponentenregulationssystems (TCS) YycFG gezogen werden. Das TCS setzt sich aus der Sensor-Histidin-Kinase YycG und dem zugehörigen Responseregulator YycF zusammen. Ein besonderes Augenmerk galt bei diesen Versuchen auch den möglichen Effekten, die sich aus dem nicht-stillen Nukleotidaustausch des auf dem pTvicRK(Y306N) Plasmid codierten, mutierten *yycG* Genes ergeben. Die nicht-stille Mutation (T916A) in der Sequenz von *yycG*

führt letztendlich in der Sensor-Histidin-Kinase YycG zu einem Aminosäureaustausch (Y→N) in Position 306 und liegt damit innerhalb der PAS-Domäne des Proteins, so dass ein möglicher Einfluss auf die Funktionalität der YycG(Y306N)-Kinase unter Umständen auch phänotypisch in Erscheinung treten könnte.

3.6.1 Einfluss auf die Pigmentierung

Bereits bei den ersten Versuchen mit den *S. aureus*-Stämmen 8325-4 SH1000, zeigte sich beim aeroben Wachstum auf Festmedien, dass es im Gegensatz zur Vektorkontrolle pTX15 bei den Stämmen mit den induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) durch die Anwesenheit von Xylose und damit bei Überexpression von *yycFG* zu einer Veränderung des Phänotyps kommt. So zeigt sich bei den Kolonien eine deutlich verminderte Pigmentierung, die ursächlich höchstwahrscheinlich auf die verminderte Produktion des *S. aureus*-Pigmentes Staphyloxanthin zurückzuführen ist (TÜRCK, 2004). Um zu untersuchen, wie sich die Überexpression von *yycFG* bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen auf die Pigmentierung auswirkt, wurden von einer bebrüteten Agarplatte mit BHI½ + Tet. [25 µg/ml] je Stamm 4 – 5 Kolonien mittlerer Größe abgeimpft und in je 3 ml 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung resuspendiert. Ausgehend von den Resuspensionen wurden Mini-Agarplatten (BHI½ + Tet. [25 µg/ml]) ohne bzw. mit 0,5 % (w/v) Xylose mittels eines sterilen Wattetupfers strichförmig angeimpft und die Platten für 24 h bei RT, 25, 30, 34, 37, 42 und 45 °C inkubiert. Da es sich zeigte, dass sich die Pigmentierung nach einer 24 h Inkubation erst ab einer Temperatur von 34 °C vollständig ausprägt, wurden bei der Auswertung nur diese oder höhere Temperaturen berücksichtigt (Abbildung 3.9).

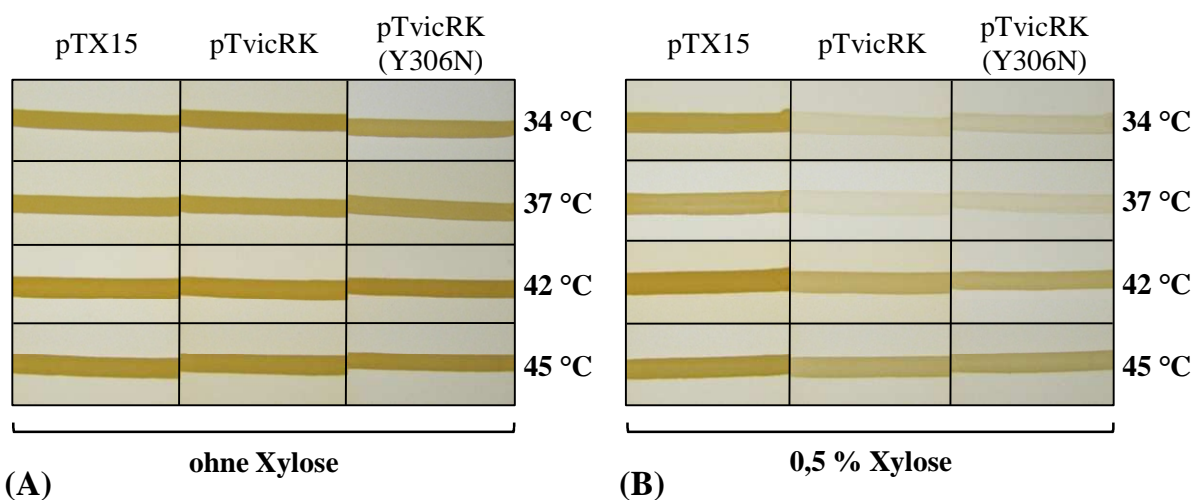


Abbildung 3.9: Einfluss der Überexpression von *yycFG* bei unterschiedlichen Temperaturen auf die Pigmentierung von *S. aureus* 8325-4 SH1000 mit den induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) bzw. der Vektorkontrolle pTX15. Stämme in Abwesenheit von Xylose als Induktor (A). Induzierte Überexpression von *yycFG* durch Xylose (B).

Es zeigt sich deutlich, dass es im Vergleich zur Vektorkontrolle pTX15 durch die Xylosebedingte Überexpression von *yycFG* in den *S. aureus* 8325-4 SH1000-Stämmen mit den induzierenden Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) bei allen Temperaturen zu einer deutlich verminderten Pigmentierung der Zellen kommt. Dieser Effekt ist dabei am stärksten bei den Temperaturen von 34 °C bzw. 37 °C ausgeprägt und schwächt sich bei den höheren Temperaturen von 42 °C bzw. 45 °C deutlich ab. Dies deutet darauf hin, dass die höheren Temperaturen einen zusätzlichen Stressstimulus darstellen, der den durch die Überexpression von *yycFG* bedingten Stress zumindest partiell aufheben kann.

3.6.2 Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber O₂-vermitteltem Stress

Um zu untersuchen, wie sich die Überexpression von *yycFG* auf das Wachstum von *S. aureus* auswirkt, wenn es durch die Anwesenheit von O₂ zur parallelen Induktion von zellulärem Stress kommt, wurden die Xylose-induzierbaren Stämme 8325-4 SH1000pTvicRK und 8325-4 SH1000pTvicRK(Y306N) und der Vektorkontrollstamm 8325-4 SH1000pTX15 zunächst in BHI_{1/2} + Tet. [25 µg/ml] bis zu einer OD₆₀₀ von 1 unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Es folgte die serielle Verdünnung (10⁻¹ – 10⁻⁵) mit frischem Medium, das Ausimpfen auf BHI_{1/2}-Agarplatten ohne und mit 0,5 % (w/v) Xylose und die Inkubation für 24 h bei 37 °C unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen. Zur Induktion des O₂-vermittelten Stresses enthielten die Platten in der 1. Versuchsreihe 0,2 mM Methylviologen (MV) bzw. in der 2. Versuchsreihe 25 mM Hydroxyurea (HU). Als Kontrollen dienten jeweils Platten ohne MV bzw. ohne HU. Um den Inokkulumeneffekt in Bezug auf die konzentrationsabhängige Empfindlichkeit zu berücksichtigen, wurden die Stämme in einer seriellen Verdünnung auf die Platten aufgebracht. Da sich die Verdünnungsreihen unter den jeweiligen Bedingungen über zwei Platten erstreckten, wurde die geringste Verdünnungsstufe (10⁻³) der 1. Platte zunächst auf der 2. Platte wiederholt, bevor in der Verdünnungsreihe fortgefahren wurde. Um außerdem zu verdeutlichen, dass die Anwesenheit von O₂ für die Vermittlung des durch MV oder HU verursachten Stresses notwendig ist, wurde je ein Plattensatz mit allen möglichen Kombination für 24 h bei 37 °C unter aeroben bzw. unter anaeroben Bedingungen inkubiert.

Als weitere Kontrollen wurden die *S. aureus*-Stämme SA1450/94, SA137/93A und SA137/93G in den gleichen Versuchsansätzen und unter gleichen Bedingungen verwendet, allerdings ohne Tet. in den Medien. Das klinische Isolat aus Trachealsekret *S. aureus*-Stamm

SA137/93A ist durch eine natürliche *yycFG*-Überexpression charakterisiert. Die abgeleitete spontane Mutante, Stamm SA137/93G, zeigt dieses Merkmal nicht, ist aber durch eine 56 ORF (Locus-Tags bei *S. aureus* N315: SA0077 – SA0132) umfassende Deletion gekennzeichnet (REIPERT et al., 2003), die mit ORF SA0128 auch das Gen *sodM* beinhaltet, das für die Superoxid-Dismutase SodM codiert. Der „Norddeutsche Epidemiestamm“ SA1450/94 ist epidemiologisch nahe verwandt mit dem Stamm SA137/93A (BIERBAUM et al., 1999) und damit auch mit dessen spontaner Mutante SA137/93G.

1. Versuchsreihe: Methylviologen als Stressinduktor in Anwesenheit von O₂

Untersucht wurde der Einfluss der induzierten *yycFG*-Überexpression auf das Wachstum von *S. aureus* durch O₂-vermittelten Stress in Anwesenheit von Methylviologen (MV) in einer Endkonzentration von 0,2 mM. Betrachtet wurde sowohl der Effekt, der sich durch die An- und Abwesenheit von Xylose als Induktor ergab, als auch die Effekte, die sich durch die An- und Abwesenheit von MV ergaben (Abbildung 3.10).

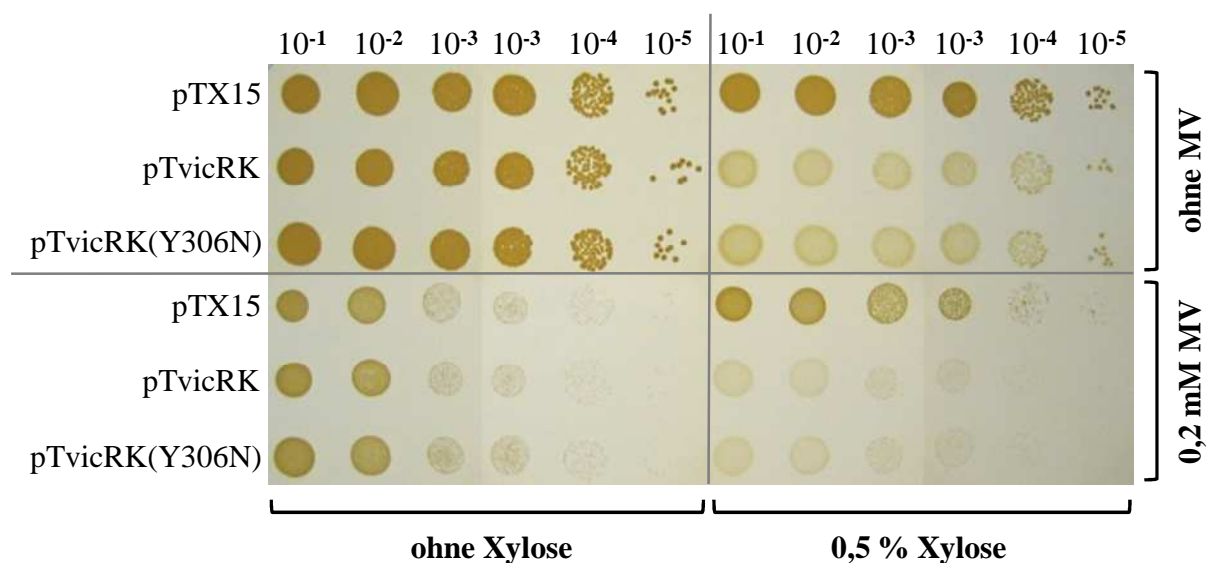


Abbildung 3.10: Aerober Plattensatz: Einfluss der Überexpression von *yycFG* auf das Wachstum der *S. aureus* 8325-4 SH1000-Stämme durch O₂-vermittelten Stress von Methylviologen (MV). Durch Xylose erfolgte die Überexpression von *yycFG* in den Stämmen mit den induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N). Als Vektorkontrolle diente das Plasmid pTX15.

Phänotypisch gut zu erkennen war, dass sich die Xylose-bedingte Überexpression von *yycFG* auf die Koloniefärbung der induzierbaren Stämme auswirkte und diese im Vergleich zu den Kontrollen weniger stark orange pigmentiert waren. Es wurde ferner deutlich, dass sich die Anwesenheit von MV mit zunehmender Verdünnungsstufe der aufgetragenen

Zellsuspensionen insgesamt hemmend auf das Wachstum auswirkte. Die Überexpression von *yycFG* in den induzierbaren Stämmen mit den Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) führte aber im Vergleich zu dem Vektorkontrollstamm (pTX15) zu keinem signifikant schwächeren Wachstum. Dieser Befund bestätigte sich auch in Anwesenheit von MV-Konzentrationen bis 5 mM, die also um bis zu 25-fach höher sind (ohne Abbildung). Durch die Überexpression von *yycFG* ließ sich kein verstärkender oder abschwächender Effekt auf die Empfindlichkeit gegenüber dem MV-vermittelten oxidativen Stress beobachten. Die anaerobe Kontrolle zeigte aber anschaulich, dass die Anwesenheit O₂ notwendig ist, um den MV-bedingten Stress zu vermitteln (Abbildung 3.11).

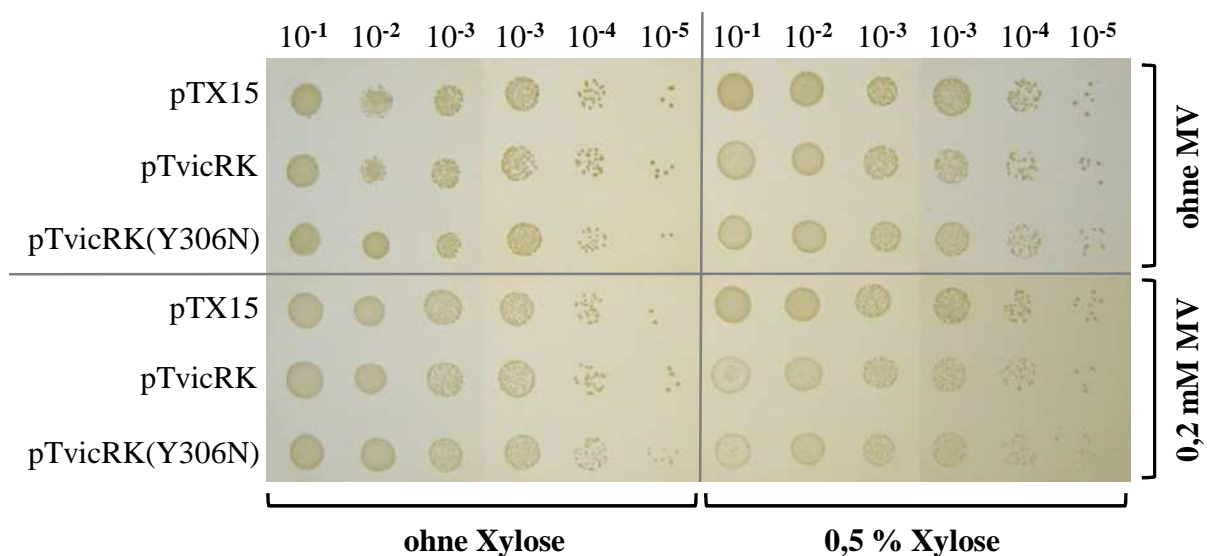


Abbildung 3.11: Anaerober Plattensatz zur Kontrolle: Einfluss der Überexpression von *yycFG* auf das Wachstum der *S. aureus* 8325-4 SH1000-Stämme ohne O₂ als Vermittler von MV-bedingtem Stress. Durch Xylose erfolgte die Überexpression von *yycFG* in den Stämmen mit den induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N). Als Vektorkontrolle diente das Plasmid pTX15.

Bei dem zur Kontrolle angelegten Plattensatz war deutlich zu erkennen, dass es beim anaeroben Wachstum bei allen Stämmen, unter allen Bedingungen, zu einer einheitlich schwachen Pigmentierung kam, die deutlich die Abwesenheit von O₂ anzeigte. Ohne O₂ kam es zu keinem das Wachstum insgesamt schwächenden Effekt durch MV, da keine katalytische Wirkung stattfinden konnte, die zur Bildung von hochreaktiven Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) führte.

Durch die Zusatzkontrollen wird abschließend deutlich, dass für eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem Stress, der durch die Anwesenheit von MV und O₂ entsteht, genetische Faktoren wie die z.B. die Deletion von *sodM* in *S. aureus*-Stamm SA137/93G vorhanden sein müssen, dass aber die Überexpression von *yycFG* nicht dazu gehört (Abbildung 3.12).

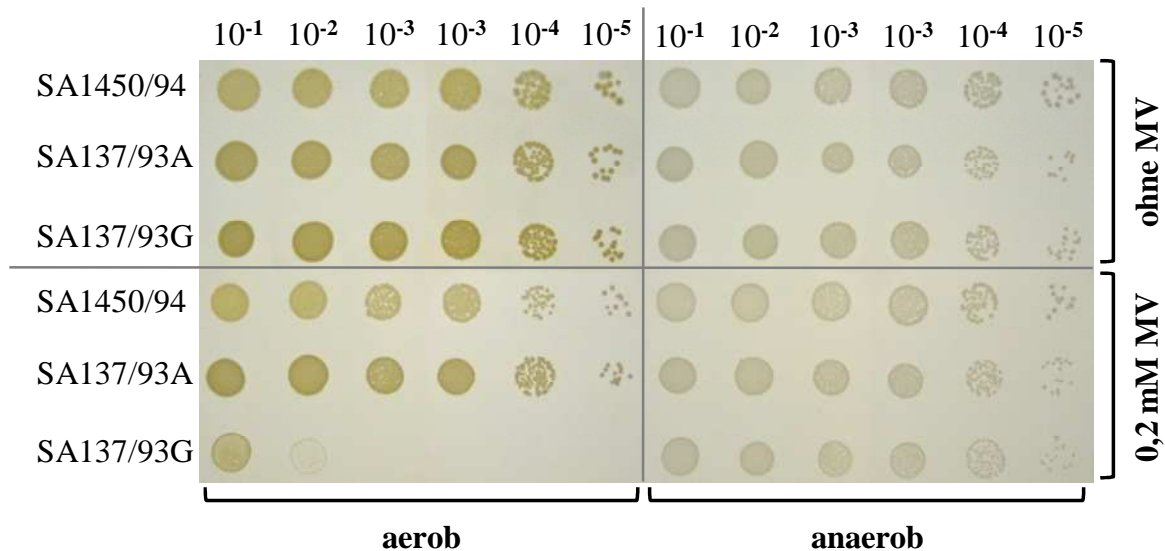
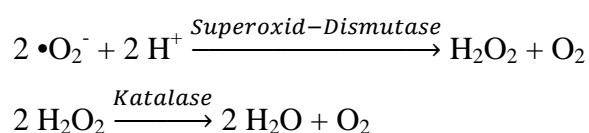


Abbildung 3.12: Weitere *S. aureus*-Kontrollstämmen zur Verdeutlichung des durch O_2 -vermittelten Stress von Methylviologen (MV) unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen. Stamm SA137/93A ist durch eine natürliche Überexpression von *yycFG* charakterisiert. Der abgeleitete Stamm SA137/93G besitzt dieses Merkmal nicht, ist aber durch eine chromosomale Deletion gekennzeichnet, die auch das für die Superoxid-Dismutase SodM codierende Gen *sodM* umfasst und wird damit zur Positivkontrolle für MV-bedingten Stress in Anwesenheit von O_2 . Der „Norddeutsche Stamm“ SA1450/94 ist epidemiologisch mit beiden Stämmen nahe verwandt und fungiert als Negativkontrolle.

Auch bei den Plattensätzen mit den weiteren *S. aureus*-Stämmen war deutlich zu erkennen, dass die Abwesenheit von O_2 zu einer einheitlich schwächeren Pigmentierung als im Vergleich zur Anwesenheit von O_2 führte. Die Deletion von *sodM* in der Positivkontrolle SA137/93G führte zu einer verstärkten Empfindlichkeit gegenüber MV unter aeroben Bedingungen und zeigte sehr anschaulich, dass dieser Stress durch die Anwesenheit von O_2 vermittelt wurde. Das verminderte Wachstum ist dabei darauf zurückzuführen, dass SodM neben der Haupt-Superoxid-Dismutase SodA ein zweites Enzym zur Entgiftung von Superoxid-Anionen ($\bullet O_2^-$) in *S. aureus* ist (VALDERAS and HART, 2001). Dabei erfolgt die Umsetzung von Superoxid-Radikalen ($\bullet O_2^-$) zu Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welcher seinerseits durch das Enzym Katalase in einem weiteren Reaktionsschritt zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2) umgesetzt wird:



Dies ist ein Vorgang, der auch unter normalen Bedingungen im zellulären Stoffwechsel bei aerober Atmung stattfindet. Während das Fehlen von SodM in Stamm SA137/93G unter normalen Bedingungen offensichtlich durch SodA kompensiert wird, ist dies bei zusätzlichem

MV-bedingten Stress – wie man deutlich erkennt – nicht mehr möglich. Anhand von Stamm SA137/93A wurde deutlich, dass die Überexpression von *yycFG* keinen Effekt auf den O₂-vermittelten Stress durch MV besitzt, da es im Vergleich zur Negativkontrolle SA1450/94 keinerlei Unterschiede im Wachstum unter aeroben und anaeroben Bedingungen in An- und Abwesenheit von MV gab. Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, die zuvor auch durch die Versuche mit den *S. aureus*-Stämmen 8325-4 SH1000pTvicRK und 8325-4 SH1000 pTvicRK(Y306N) mit induzierbarer *yycFG*-Überexpression und dem Vektorkontrollstamm 8325-4 SH1000 pTX15 gewonnen werden konnten.

2. Versuchsreihe: Hydroxyurea als Stressinduktor in Anwesenheit von O₂

Untersucht wurde der Einfluss der *yycFG*-Überexpression auf das Wachstum von *S. aureus* durch O₂-vermittelten Stress in Anwesenheit von Hydroxyurea (HU) in einer Endkonzentration von 25 mM. Betrachtet wurde sowohl der Effekt, der sich durch die An- und Abwesenheit der induzierenden Xylose ergab, als auch die Effekte, die sich in den dadurch möglichen Kombinationen durch die An- und Abwesenheit von ergaben (Abbildung 3.13).

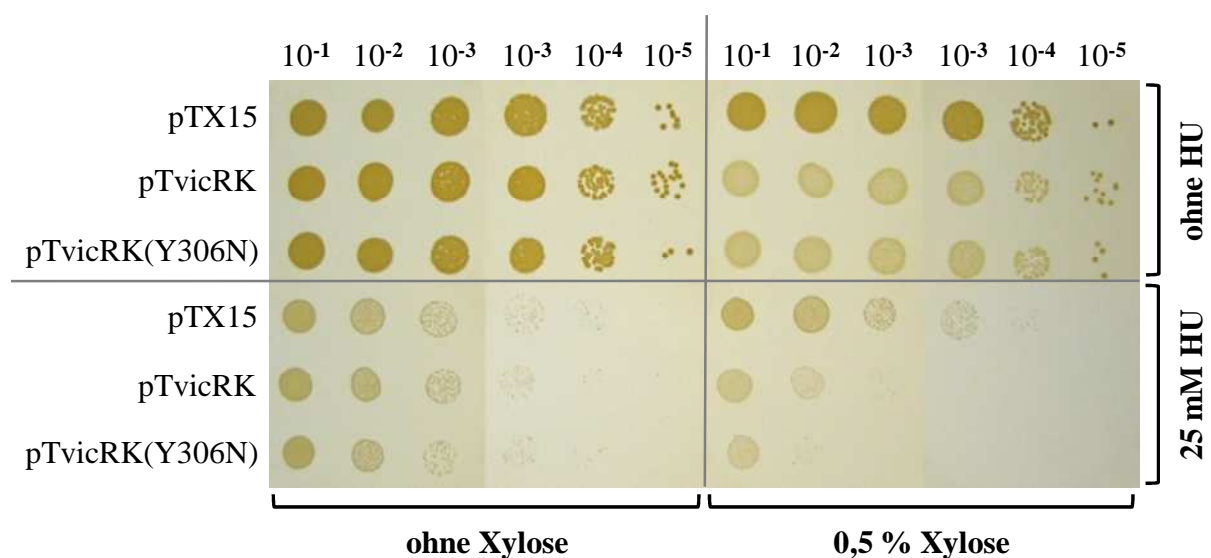


Abbildung 3.13: Aerober Plattensatz: Einfluss der Überexpression von *yycFG* auf das Wachstum der *S. aureus* 8325-4 SH1000 Stämme durch den O₂-vermittelten Stress von Hydroxyurea (HU). Durch Xylose erfolgte die Überexpression von *yycFG* in den Stämmen mit den induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N). Als Vektorkontrolle diente das Plasmid pTX15.

Wie bei der Versuchsreihe mit Methylviologen, ist auch hier phänotypisch gut zu erkennen, dass sich die Xylose-bedingte Überexpression von *yycFG* auf die Koloniefärbung der induzierbaren Stämme auswirkte. Gleichfalls wurde deutlich, dass das Wachstum mit zunehmender Verdünnung durch die Anwesenheit von HU abgeschwächt wurde. Im

Gegensatz zu der Versuchsreihe mit MV führte jedoch die Überexpression von *yycFG* in den induzierbaren Stämmen mit den Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) zu einer zusätzlichen Hemmung des Wachstums. Dieser Effekt war im Fall des Stammes mit dem Plasmid pTvicRK(Y306N) sogar etwas stärker ausgeprägt. Durch die anaerobe Kontrolle wurde anschaulich gezeigt, dass O₂ zur Vermittlung des HU-bedingten Stresses notwendig ist (Abbildung 3.14).

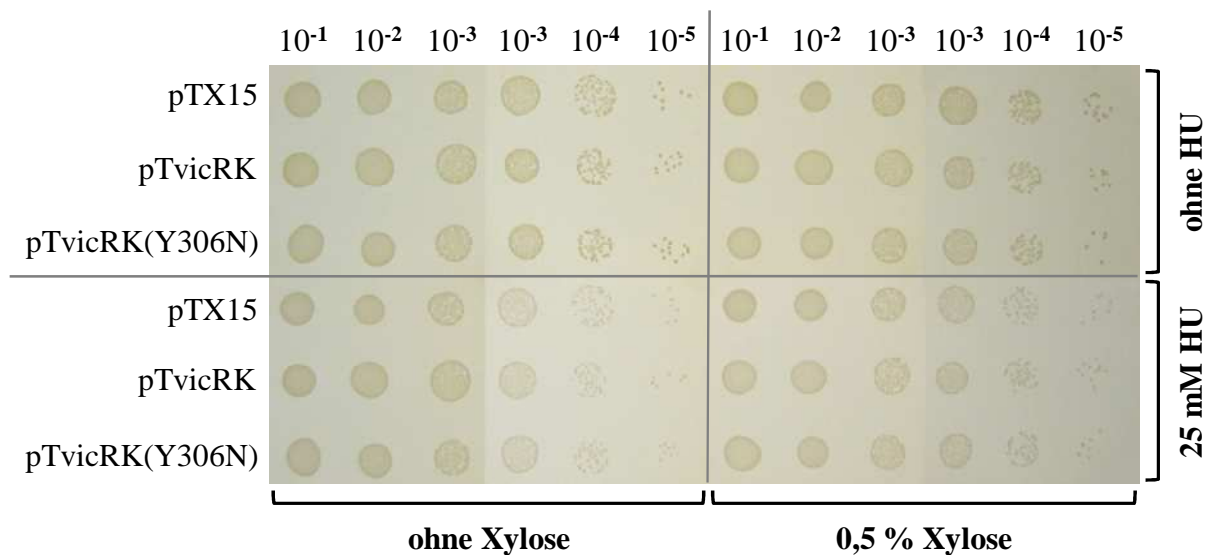


Abbildung 3.14: Anaerober Plattensatz zur Kontrolle: Einfluss der Überexpression von *yycFG* auf das Wachstum der *S. aureus* 8325-4 SH1000-Stämme ohne O₂ als Vermittler von HU-bedingtem Stress. Durch Xylose erfolgte die Überexpression von *yycFG* in den Stämmen mit den induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N). Als Vektorkontrolle diente das Plasmid pTX15.

In Erscheinung trat wieder die schwache Pigmentierung der *S. aureus*-Stämme in Abwesenheit von O₂. Ferner kam es zu keinem das Wachstum schwächenden Effekt durch HU. Im Gegensatz zur aeroben Klasse Ib-Ribonukleotid-Reduktase NrDEF (Locus-Tags bei *S. aureus* N315; NC_002745: SA0686 / SA0687) ist HU also nicht in der Lage die unter anaeroben Bedingungen verstärkt exprimierte Klasse III-Ribonukleotid-Reduktase NrdDG (MASALHA et al., 2001) zu hemmen. Welchen genauen Einfluss die Überexpression von *yycFG* damit auf die Klasse Ib-Ribonukleotid-Reduktase NrDEF hat, bleibt allerdings unklar. Denkbar ist sowohl ein direkter Einfluss auf die Expression von *nrdEF* selbst oder auf das co-transkribierte *nrdI*-Gen (Locus-Tag bei *S. aureus* N315: SA0685), das für einen Stimulator der NrdEF-Aktivität codiert (MASALHA et al., 2001), als auch ein indirekter Effekt. Auf NrdDG (Locus-Tags bei *S. aureus* N315; NC_002745: SA2410 / SA2409) hat die

Überexpression von *yycFG* aber offensichtlich keinen Effekt. Der stressverstärkende Effekt, den die Überexpression von *yycFG* in Anwesenheit von HU und O₂ besitzt, konnte durch das verminderte Wachstum des *S. aureus*-Stammes mit natürlicher *yycFG*-Überexpression SA137/93A bestätigt werden (Abbildung 3.15).

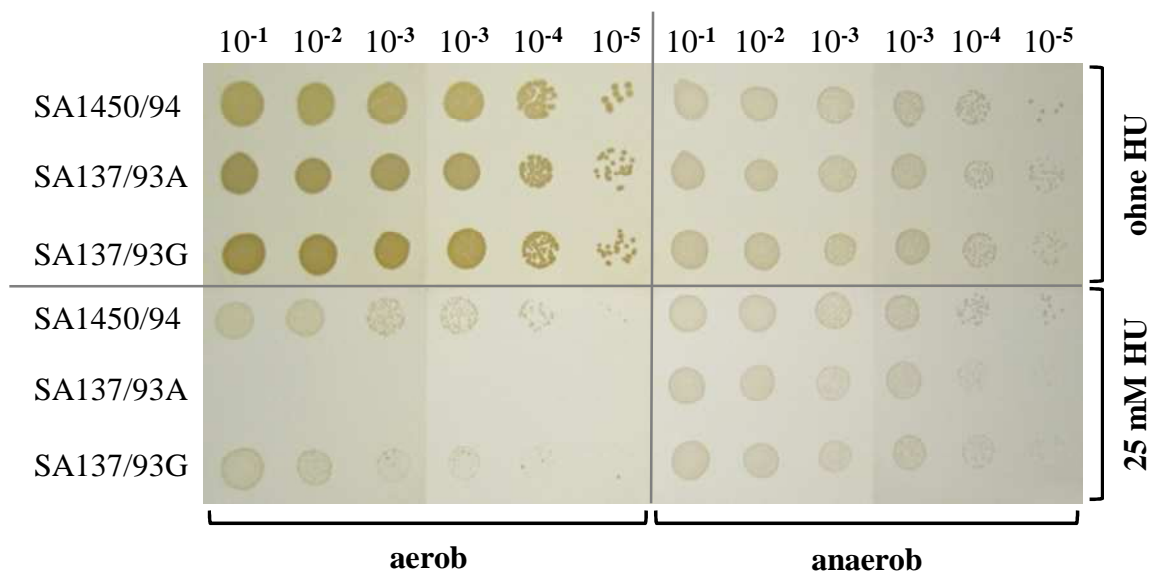


Abbildung 3.15: Weitere *S. aureus* Kontrollstämme zur Verdeutlichung des durch O₂-vermittelten Stress von Hydroxyurea (HU) unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen. Stamm SA137/93A zeigt eine natürliche Überexpression von *yycFG*. Der abgeleitete Stamm SA137/93G besitzt eine chromosomale Deletion, die auch das für die Superoxid-Dismutase SodM codierende Gen *sodM* umfasst. Der „Norddeutsche Stamm“ SA1450/94 fungiert als Negativkontrolle.

Da die Deletion von *sodM* bei Stamm SA137/93G zu keiner veränderten Empfindlichkeit gegenüber HU unter aeroben Bedingungen führte, kann ausgeschlossen werden, dass durch HU ein oxidativer Stress verursacht wird. Anhand von Stamm SA137/93A wurde aber bestätigt, dass die Überexpression von *yycFG* einen starken Effekt auf den O₂-vermittelten Stress durch HU besitzt, da es im Vergleich zur Negativkontrolle SA1450/94 und dem Stamm SA137/93G unter aeroben Bedingungen bei keiner der aufgeführten Verdünnungen zum Zellwachstum kam. Dies bestätigte eindrucksvoll den gleichen Effekt von HU in Anwesenheit von O₂, der auch in den induzierbaren *S. aureus* 8325-4 SH1000 Stämmen beobachtet werden konnte (Abbildung 3.13). Somit wird der Einfluss unterstrichen, den die Überexpression von *yycFG* auf die Nukleotid-Synthese hat. Unklar bleibt in diesem Zusammenhang allerdings, ob es sich um einen direkten Einfluss z.B. auf die Klasse Ib-Ribonukleotid-Reduktase NrEF

selbst oder einen indirekten Einfluss bzw. Effekt handelt, der einem spezifischen Prozess bzw. dessen Ursprung aber nicht näher zugeordnet werden kann.

3.6.3 Einfluss auf die Biofilmbildung

Um den Einfluss der Überexpression von *yycFG* auf die Biofilmbildung zu untersuchen, wurden die *S. aureus* 8325-4 SH1000-Stämme mit den Xylose-induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) und dem Kontrollvektor pTX15 für 24 h bei 37 °C in einer BHI-Charge inkubiert, die sich als besonders geeignet für die Ausbildung von *S. aureus*-Biofilmen erwiesen hatte. Das Wachstum erfolgte in An- und Abwesenheit von 0,5 % (w/v) Xylose. Da Glucose und O₂ die Biofilmbildung begünstigen bzw. beeinflussen können, wurde das BHI-Medium zum Vergleich auch mit 0,25 % (w/v) Glucose supplementiert, und alle Stämme und Medien wurden unter aeroben, O₂-limitierten (7 % CO₂) bzw. anaeroben Bedingungen auf ihre Biofilmbildung untersucht. Als Positivkontrolle diente eine bisher nicht näher charakterisierte Mutante von *S. aureus*-Stamm 8325-4 SH1000pTvicRK(Y306N). Es wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt, und bei jeder Bestimmung erfolgte die Auswertung der Biofilmbildung in drei Vertiefungen (Wells). Eine repräsentative Auswahl von Biofilmplatten zeigt Abbildung 3.16.

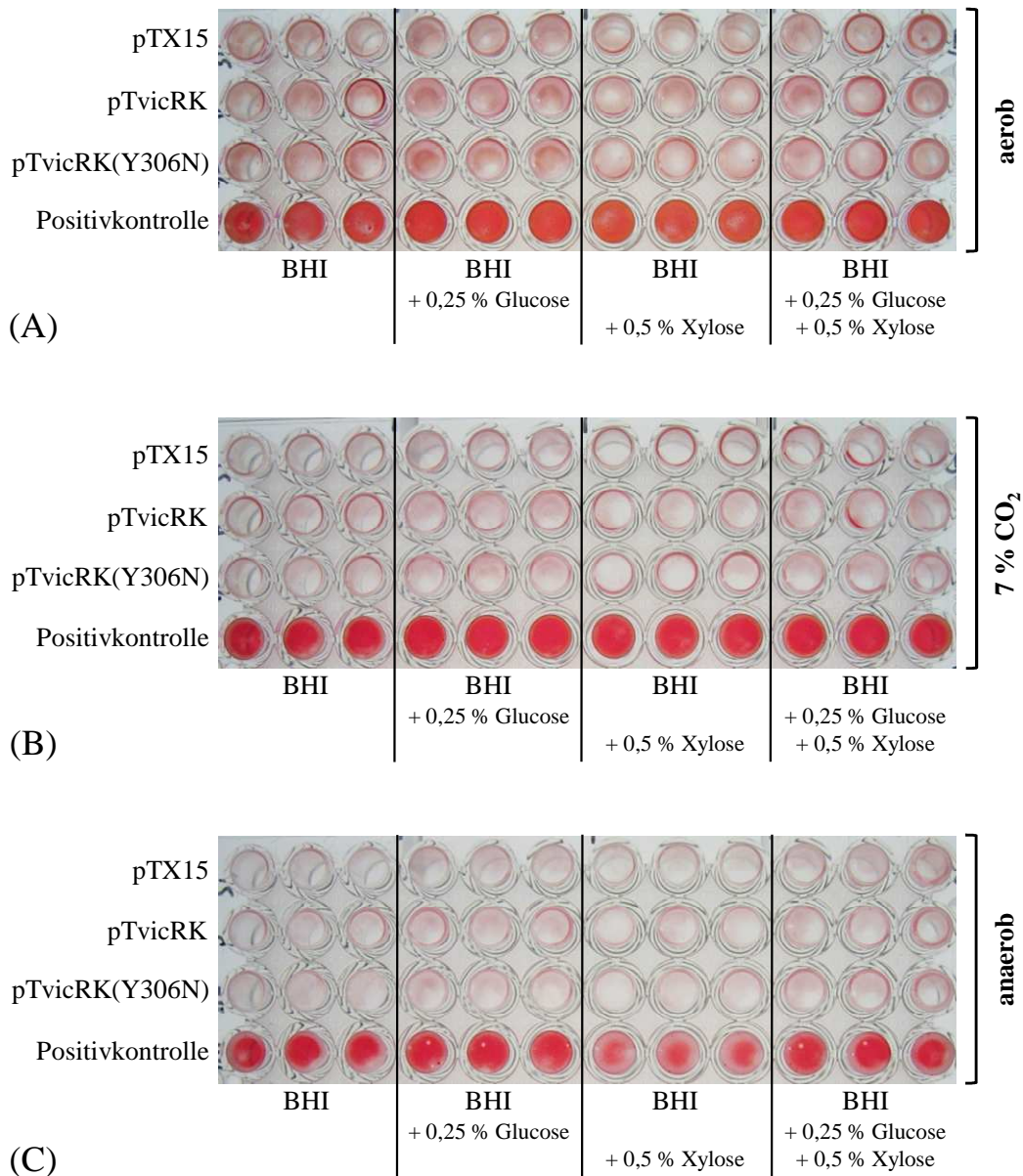


Abbildung 3.16: Biofilmbildung nach 24 h Wachstum in nicht- und supplementierten BHI bei 37 °C. Einfluss der Überexpression von *yycFG* auf das Wachstum der *S. aureus* 8325-4 SH1000-Stämme unter aeroben (A), O₂-limitierten (7 % CO₂) (B) und anaeroben Bedingungen (C). Die Xylose-bedingte Überexpression erfolgte in den Stämmen mit den induzierbaren Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N). Als Vektorkontrolle diente das Plasmid pTX15.

Die Ergebnisse der Biofilmversuche zeigten eindeutig, dass die Überexpression von *yycFG* unter keiner der Bedingungen und in keinem Medium zu einer signifikanten Änderung der Biofilmbildung führte.

3.6.4 Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin

Da durch die Überexpression von *yycFG* bereits zuvor gezeigt werden konnte, dass es zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin kommt (TÜRCK, 2004; JANSEN et al., 2007), sollte nun untersucht werden, ob die Überexpression auch zu einer verminderten

Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin führt. Zu diesem Zweck wurde mit den *S. aureus* 8325-4 SH1000-Stämmen mit den durch Xylose induzierbaren Überexpressionsplasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) und dem Kontrollvektor pTX15 eine Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Daptomycin durchgeführt. Die Ermittlung der MHK erfolgte in Müller-Hinton-Medium + Tet. [25 µg/ml]. Das Medium wurde ferner mit 1,25 mM CaCl₂ bzw. 0,5 % (w/v) Xylose supplementiert. Ausgehend von einer Höchstkonzentration mit 16 µg/ml Daptomycin in der ersten Vertiefung (Well) erfolgte eine serielle Verdünnung des Antibiotikums über 12 Vertiefungen. Als weitere Kontrollen wurden die *S. aureus*-Stämme SA1450/94, SA137/93A und SA137/93G unter gleichen Bedingungen, aber ohne Zusatz von Xylose und Tet., zur MHK-Bestimmung herangezogen. Der Durchschnittswert, der sich für alle Stämme nach drei unabhängigen Bestimmungen, abgelesen nach 24 bzw. 48 h, ergab, ist in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: Bestimmung der Daptomycin-MHK in Müller-Hinton Medium + 1,25 mM CaCl₂. Der Einfluss der Überexpression von *yycFG* auf die Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin wurde mit zwei Sätzen von *S. aureus*-Stämmen gezeigt. Der 1. Satz umfasst die 8325-4 SH1000-Stämme mit den durch die Anwesenheit von Xylose induzierten Plasmiden pTvicRK und pTvicRK(Y306N) im Vergleich zur Vektorkontrolle pTX15 (a). Der 2. Satz umfasste Stamm SA137/93A, der eine natürliche *yycFG*-Überexpression zeigt, dessen spontane Mutante SA137/93G ohne Überexpression dem nah verwandten „Norddeutschen Stamm“ SA1450/94 als weitere Kontrolle (b).

Stamm	Beschreibung	Ø MHK [µg/ml] (24 h)	Ø MHK [µg/ml] (48 h)
a) <i>S. aureus</i> 8325-4 SH1000			
pTX15	Vektorkontrolle	0,125	0,125
pTvicRK	induzierte <i>yycFG</i> -Überexpression	0,250	0,333
pTvicRK(Y306N)	induzierte <i>yycFG</i> -Überexpression	0,250	0,417
b) <i>S. aureus</i>			
SA1450/94	Kontrolle	0,125	0,125
SA137/93A	natürliche <i>yycFG</i> -Überexpression	0,500	0,500
SA137/93G	Kontrolle	0,250	0,250

Es wird deutlich, dass die induzierte Überexpression von *yycFG* zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin führt, die bei den durchgeführten MHK-Bestimmungen eine Titerstufe ausdrückt. Dies wurde durch den *S. aureus*-Stamm 137/93A mit natürlicher Überexpression von *yycFGHI* verifiziert.

3.7 Konstruktion des Plasmids pREP4groESL(MT)

Zur Amplifizierung der Gensequenzen, die für das Chaperon GroEL und dessen Cofaktor GroES codieren, wurde als Template genomische DNA von *E. coli* K12 JM109 in die PCR-Reaktion (Abschnitt 2.5.7) eingesetzt. Anhand des vollständig sequenzierten Genoms von *E. coli* K12 subspecies MG1655 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; NC_000913) wurden die zur Amplifizierung genutzten Oligonukleotid-Primer (Tabelle 2.3) so gelegt, dass sie Basenaustausche enthielten, die für die Klonierung am 5'-Ende des *groESL* umfassenden DNA-Fragmentes eine *NheI*- und am 3'-Ende eine *SalI*-Schnittstelle bereitstellten. Unmittelbar stromabwärts an die *NheI*-Schnittstelle schließt sich mit der Sequenz „AGGAGA“ eine Ribosomenbindestelle (rbs) an, die sich ihrerseits 7 bp stromaufwärts des Startcodons für *groES* auf dem für *groESL* codierenden Sequenzabschnitt befindet. Nach dem enzymatischen Verdau durch die Restriktionsendonukleasen *NheI* und *SalI* wurde die codierende Sequenz zwischen die gleichen Schnittstellen des zuvor enzymatisch verdauten Vektors pREP4 ligiert (sticky end). Das resultierende Plasmid wurde pREP4groESL(MT) genannt und per Elektroporation zur Etablierung zunächst in *E. coli* K12 JM109 als Zwischenwirt transformiert. Zur Bestätigung der Plasmidintegrität erfolgte eine Sequenzierung des Plasmids (Fa. Sequiserve, Vaterstetten). In einem nachfolgenden Schritt wurde pREP4groESL(MT) in die *E. coli*-Expressionsstämme BL21(DE3), C41(DE3) und C43(DE3) transformiert, und die resultierenden Stämme BL21(DE3)pREP4groESL(MT), C41(DE3)pREP4groESL(MT) und C43(DE3)pREP4groESL(MT) wurden als Wirtstämme für die rekombinante Expression der C-His₆-getaggten *S. aureus*-Proteine YycFGHI und YycG(Y308N) genutzt (Abschnitt 2.9.1.4 und 2.9.1.5).

Eine Vektorkarte von pREP4 und pREP4groESL(MT), sowie die Sequenzen, die auf dem letztgenannten Plasmid für die Gene des Chaperon GroESL aus *E. coli* K12 JM109 codieren, befinden sich im Anhang (Abschnitt 7.5.3 und 7.5.4).

3.8 Klonierung der *ycy*-Gene in den Expressionsvektor pET22bΔpelB

Zur Amplifizierung der für die Proteine YycFGHI und YycG(Y308N) codierenden Gensequenzen wurde genomische DNA von *S. aureus* SA137/93A als Template in die PCR-Reaktion (Abschnitt 2.5.7) eingesetzt. Anhand des vollständig sequenzierten Genoms von *S. aureus* N315 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; NC_002745) wurden die zur Amplifizierung genutzten Oligonukleotid-Primer (Tabelle 2.3) so gelegt, dass sie Basenaustausche enthielten, die für die Klonierung am 5'-Ende der Gensequenz eine *NcoI*- und am 3'-Ende eine *XhoI*-

Schnittstelle bereitstellten. Da im Expressionsvektor pET22bΔpelB unmittelbar auf die *XhoI*-Schnittstelle der His₆-Tag und ein Stopp-Codon folgen, wurde der Reverse-Primer so in das Ende der Sequenz des Ziel-Gens gelegt, dass das ursprüngliche Stopp-Codon des Gens durch die *XhoI*-Schnittstelle eliminiert und durch das Stopp-Codon nach dem His₆-Tag auf dem Vektor substituiert wurde. Ferner gab es zu bedenken, dass die verwendete *NcoI*-Schnittstelle im Vektor pET22bΔpelB durch ihre Sequenz (C↓CATGG) ein alternatives ATG-Startcodon für die Translation anbietet. Um einen Frameshift zu verhindern, wurde das Gen-eigene Startcodon zwar beibehalten, aber die Position der *NcoI*-Schnittstelle, unter Verwendung von Basenaustauschen, so in die Gensequenz gelegt, dass sich das originäre Startcodon ebenfalls „in frame“ befindet und zu dem alternativen Startcodon auf allen Vektoren durch ein Codon getrennt ist, dass für die Aminosäure Glycin codiert. Theoretisch ergibt sich damit die Möglichkeit, dass alle Proteine in einer normalen Version und oder in einer Version exprimiert werden, die am N-Terminus um die Aminosäuren Methionin und Glycin verlängert ist. Inwieweit das in der Praxis tatsächlich geschieht wurde nicht näher bestimmt, da eine maßgebliche Beeinflussung der Proteineigenschaften von den am N-Terminus zusätzlich vorhandenen Aminosäuren nicht zu erwarten war. Für das weitere Vorgehen wurde aber davon ausgegangen, dass von dem alternativen, stromaufwärts und damit vorrangig gelegenen Startcodon die Translation ausging und damit die jeweils längere Proteinversion exprimiert wurde. Nach dem enzymatischen Verdau durch die Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *XhoI*, wurden die codierenden Gensequenzen zwischen die gleichen Schnittstellen in der MCS des zuvor enzymatisch verdauten Expressionsvektors pET22bΔpelB ligiert (sticky end). Bei dem Plasmid pET22bΔpelB handelt es sich um Derivat des Vektors pET22b, dessen *pelB*-Signalsequenz deletiert wurde, so dass der Transport der Yyc-C-His6-Proteine in das Periplasma nicht mehr stattfinden kann (SASS, 2005; SASS and BIERBAUM, 2007). Die resultierenden Plasmide wurden als pET22bΔpelBvicR, pET22bΔpelBvicK, pET22bΔpelBvicK(Y308N), pET22bΔpelByycH und pET22bΔpelByycI bezeichnet und zunächst per Elektroporation zur Etablierung in den *E. coli*-Stamm K12 JM109 als Zwischenwirt transformiert. Zur Bestätigung der Plasmidintegrität erfolgte eine Sequenzierung der Expressionsplasmide (Fa. Sequiserve, Vaterstetten).

Vektorkarten zu den abgeleiteten pET22bΔpelB-Plasmiden sowie die Sequenzen der auf den Plasmiden codierten *S. aureus* SA137/93A Gene für die rekombinante Proteinexpression befinden sich im Anhang (Abschnitt 7.5.7 – 7.5.11 und Abschnitt 7.4).

3.9 Expression und Aufreinigung der Yyc-C-His₆-Proteine

Für die rekombinante Expression der C-His₆-Proteine erfolgte in einem nachfolgenden Schritt die Transformation der Expressionsplasmide (Abschnitt 2.5.11) in die *E. coli*-Expressionsstämme BL21(DE3)pREP4groESL(MT), C41(DE3)pREP4groESL(MT) und C43(DE3)pREP4 groESL(MT). Für die Expression der C-His₆-getaggtten Yyc-Proteine wurden die Expressionsstämme in LB-Medium in Anwesenheit von Amp. [40 µ/ml] und Kana. [25 µg/ml] bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 inkubiert und mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Je nach Expressionstamm erfolgte die Zellernte nach 4 h oder 16 h. Die Proteinaufreinigung erfolgte in mehreren Schritten unter nativen Bedingungen mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.9.2). Die Kontrolle der einzelnen Aufreinigungsschritte erfolgte mittels SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 3.17 bis 3.20). Dazu wurden 10 µl der jeweiligen Fraktion nach Säulendurchfluss mit 3 µl 5x SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 2.9.5) versetzt und in die PAGE eingesetzt.

YycF-C-His₆ und YycH-C-His₆

Das im Cytoplasma lösliche Responseregulator-Protein YycF-C-His₆ und das auxiliäre Membranprotein (1 TM-Domäne) YycH-C-His₆ konnten mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pREP4groESL(MT) überexprimiert und mit einem Standardprotokoll (Abschnitt 2.9.2.1) aufgereinigt werden (Abbildung 3.17). Die Anwesenheit des pREP4groESL(MT) im Expressionsstamm sollte durch die parallele, konstitutive Expression des Chaperons GroESL die korrekte Faltung und damit die Ausbeute an funktionalem Protein begünstigen.

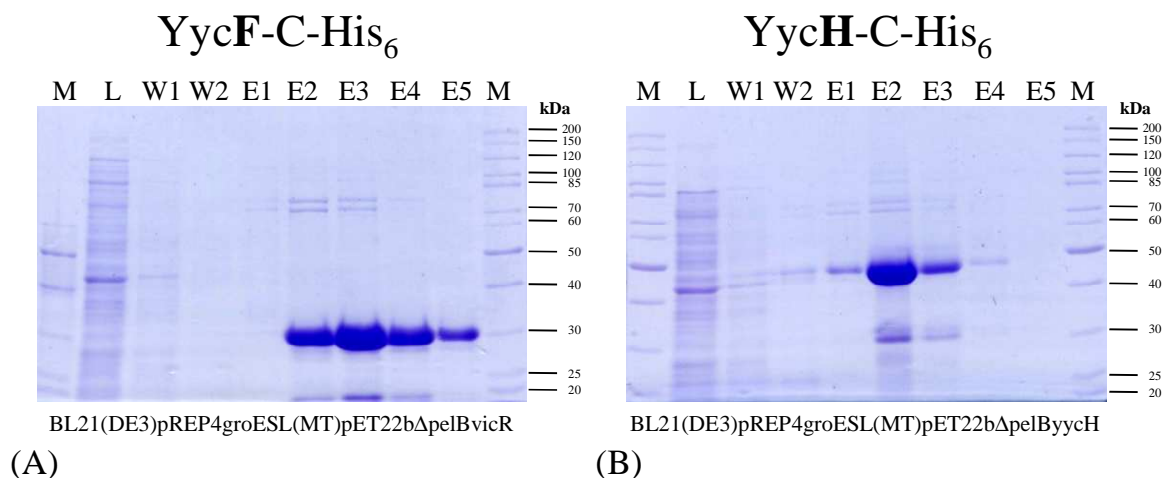


Abbildung 3.17: SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Fraktionen, die nach der Aufreinigung bzw. der Elution als Säulendurchflüsse aufgefangen wurden. Deutlich zu erkennen ist in den Eluaten E1 – E5 das aufgereinigte C-His₆-getaggtte Protein YycF mit einer Laufhöhe von ~ 30 kDa (A) und in den Eluaten E2 – E3 das aufgereinigte C-His₆-getaggtte Protein YycH mit einer Laufhöhe von ~ 50 kDa (B).

M = Marker, Fraktionen nach Säule: L = Lysat, W1 = Waschpuffer 1, W2 = Waschpuffer 2, E1 – E5 = Eluate 1 – 5.

YycG-C-His₆ und YycG(Y308N)-C-His₆

Im Gegensatz zu den rekombinanten Proteinen YycF-C-His₆ und YycH-C-His₆, konnten die Histidin-Kinasen YycG-C-His₆ und YycG(Y308N)-C-His₆, Aminosäureaustausch (Y→N) in der PAS-Domäne (Position 308 des Gesamtproteins), aus dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pREP4groESL(MT) und unter Verwendung des Standardprotokolls (Abschnitt 2.9.2.1) nicht aufgereinigt werden (Abbildung 3.18).

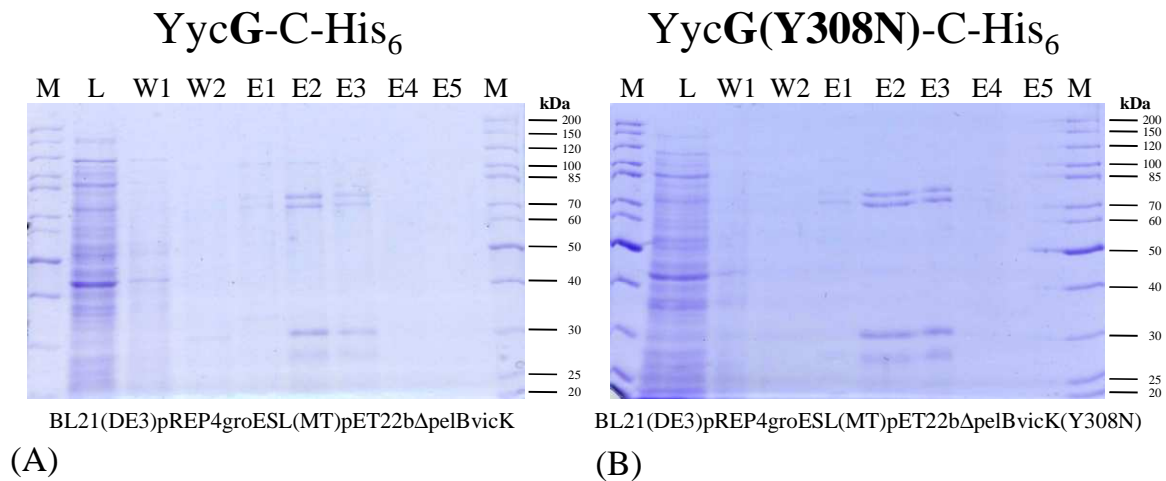


Abbildung 3.18: SDS-PAGE Analyse der einzelnen Fraktionen, die nach der Aufreinigung bzw. der Elution als Säulendurchflüsse aufgefangen wurden. Deutlich zu erkennen ist, dass unter Verwendung des *E. coli* Stammes BL21(DE3)pREP4groESL(MT) mit dem Standardprotokoll die Proteine YycG-C-His₆ (A) bzw. YycG(Y308N)-C-His₆ (B) nicht aufgereinigt werden konnten, da sich in keinem der Eluate in Lauffhöhe der 70 kDa Bande des Markers eine Proteinbande befindet.

M = Marker, Fraktionen nach Säule: L = Lysat, W1 = Waschpuffer 1, W2 = Waschpuffer 2, E1 – E5 = Eluat 1 – 5

Da beide Histidin-Kinasen, YycG und YycG(Y308N), durch den Besitz von zwei Transmembran-Domänen (TM-Domänen) charakterisiert sind, erfolgte die letztendliche Expression dieser Proteine in den *E. coli*-Stämmen C41(DE3)pREP4groESL(MT) und C43(DE3)pREP4groESL(MT). Bei den Stämmen C41(DE3) und C43(DE3) handelt es sich um eine Mutante- bzw. eine Doppelmutante des Stammes BL21(DE3), die aufgrund ihrer Eigenschaft auch Membranproteine und andere für den Wirt toxische Proteine exprimieren zu können, gezielt selektiert wurden (MIROUX and WALKER, 1996). Die zusätzliche Anwesenheit des Plasmids pREP4groESL(MT), zur konstitutiven Expression des Chaperons GroESL, sollte auch hier die korrekte Faltung der überexprimierten Proteine begünstigen. Ferner wurde das Standardprotokoll modifiziert, so dass nach dem Zellaufschluss gezielt die Membranfraktion präpariert und zur Aufreinigung der Membranproteine (Abschnitt 2.9.2.2) genutzt werden konnte. Durch den Einsatz von n-Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM) konnten so in den weiteren Schritten gezielt eine Fraktion mit Membranproteinen und damit schlussendlich

auch die Kinasen YycG-C-His₆ und YycG(Y308N)-C-His₆ aufgereinigt werden (Abbildung 3.19).

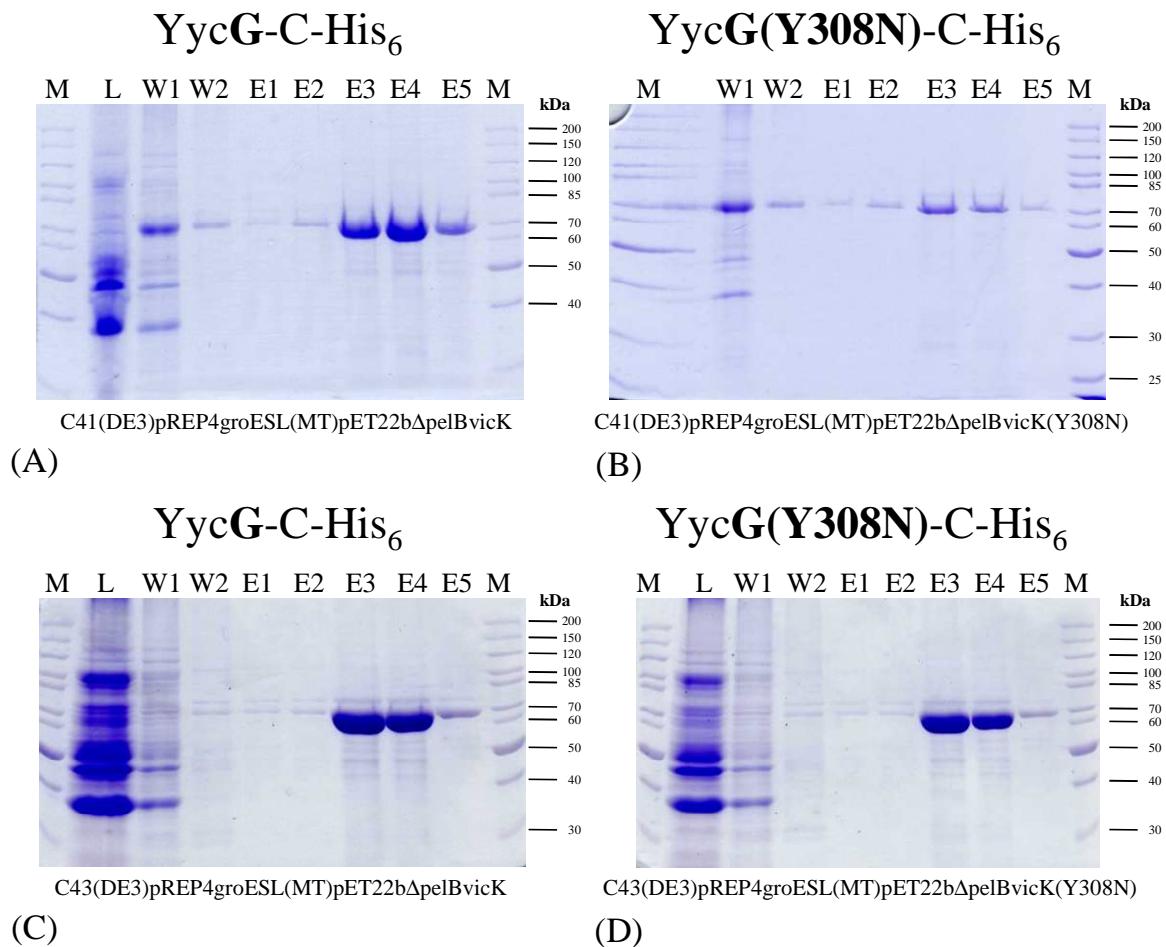


Abbildung 3.19: SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Fraktionen, die nach der Aufreinigung bzw. der Elution als Säulendurchflüsse aufgefangen wurden. Deutlich zu erkennen ist auf Laufhöhe der 70 kDa-Bande des Markers in den Eluaten E3 – E5, dass die beiden rekombinanten Proteine YycG-C-His₆ und YycG(Y308N)-C-His₆ mit dem modifizierten Protokoll zur Aufreinigung von Membranproteinen aus den präparierten Membranfraktionen der Expressionsstämme C41(DE3)pREP4groESL(MT) (A) bzw. (B) und C43(DE3)pREP4groESL(MT) (C) bzw. (D) aufgereinigt werden konnten. Gut zu erkennen ist ferner, dass die Ausbeuten an rekombinanten Protein in beiden Fällen mit Stamm C43(DE3)pREP4groESL(MT) höher waren, als mit Stamm C41(DE3)pREP4groESL(MT).

M = Marker, Fraktionen nach Säule: L = Lysat, W1 = Waschpuffer 1, W2 = Waschpuffer 2, E1 – E5 = Eluat 1 – 5

YycI-C-His₆

Ähnlich wie das auxiliäre Protein YycH-C-His₆, ist auch das auxiliäre Protein YycI-C-His₆ durch den Besitz einer einfachen TM-Domäne charakterisiert. Im Gegensatz zu diesem und genau wie die beiden Kinase-Proteine YycG-C-His₆ und YycG(Y308N)-C-His₆, ließ es sich ebenfalls nicht mit dem Standardprotokoll (Abschnitt 2.9.2.1) aus dem Expressionsstamm BL21(DE3)pREP4groESL(MT) aufreinigen (Abbildung 3.20 (A)). Wie bei den beiden Kinase-Proteinen wurde deshalb das adaptierte Protokoll zur Aufreinigung von Membranproteinen (Abschnitt 2.9.2.2) verwendet. Da sich im Fall der beiden Kinasen gezeigt

hatte, dass mit dem Expressionstamm C43(DE3)pREP4groESL(MT) eine höhere Proteinausbeute möglich ist als mit Stamm C41(DE3)pREP4groESL(MT), wurde der erstgenannte verwendet. Die Anwesenheit des pREP4groESL(MT) Plasmids sollte zu einer erhöhten Ausbeute beitragen (Abschnitt 2.9.1.1). Die erfolgreiche Aufreinigung von YycI-C-His₆ ist in Abbildung 3.20 (B) zu sehen.

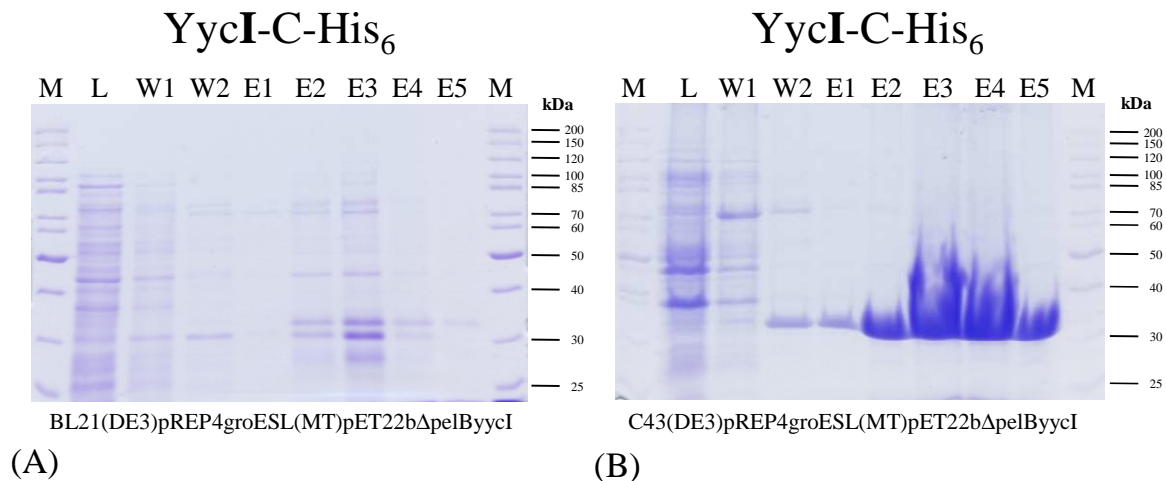


Abbildung 3.20: SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Fraktionen, die nach der Aufreinigung bzw. der Elution als Säulendurchflüsse aufgefangen wurden. Unter Verwendung des Standardprotokolls war eine Aufreinigung aus dem Expressionsstamm BL21(DE3)pREP4groESL(MT) nicht möglich (A). Deutlich zu erkennen ist, dass mit dem modifizierten Protokoll zur Aufreinigung von Membranproteinen aus der präparierten Membranfraktion des Expressionsstamms C43(DE3)pREP4groESL(MT) das rekombinante Protein YycI-C-His₆ (auf Höhe der 30 kDa-Bande des Markers) in den Eluaten E2 – E5 in großer Menge aufgereinigt werden konnte (B).

M = Marker, Fraktionen nach Säule: L = Lysat, W1 = Waschpuffer 1, W2 = Waschpuffer 2, E1 – E5 = Eluat 1 – 5

In Abbildung 3.21 sind alle rekombinant in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten Yyc-C-His₆-Proteine von *S. aureus* in einer SDS-PAGE nebeneinander aufgetragen.

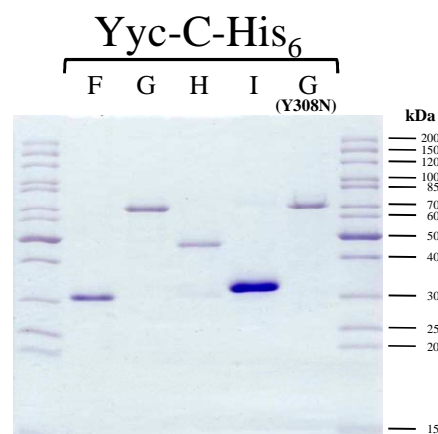


Abbildung 3.21: SDS-PAGE-Analyse aller rekombinant in *E. coli* exprimierten Yyc-C-His₆-Proteine von *S. aureus*. Aufgetragen wurden jeweils 1,5 µg Protein.

3.10 Crosslinking: Untersuchung des oligomeren Status der Yyc-C-His₆-Proteine

Um zu untersuchen, ob die C-His₆-getaggtten Yyc-Proteine unter nativen Bedingungen einen höheren oligomeren Status besitzen, ob sie also in der Lage sind sich zu Dimeren oder noch komplexeren Oligomeren zusammenzulagern, sollte durch die Anwesenheit von Formaldehyd ein stabiles Crosslinking in einem Zeitreihenexperiment herbeigeführt werden. Die Oligomere, die sich dabei möglicherweise bilden, sollten nachfolgend in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die C-His₆-getaggtten Yyc-Proteine wurden in einer Konzentration von 5 µg/20 µl in Crosslinking-Puffer bei 30 °C in einem Thermoblock präinkubiert. Durch die Zugabe von Formaldehyd in einer Endkonzentration von 25 mM wurde das Crosslinking initiiert. Nach 5, 10, 15, 30 und 60 min Inkubationszeit wurden 20 µl Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 6,75 µl 4x LDS-Probenpuffer (Fa. Invitrogen) gestoppt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, dem kein Formaldehyd zugegeben und der unter gleichen Bedingungen für 60 min inkubiert und dann abgestoppt wurde. Die Proben wurden unmittelbar in ein 4 – 20 %iges Gradientengel (Fa. Thermo Fisher Scientific, Precise Protein Gel) zur SDS-PAGE-Analyse eingesetzt. Nach dem Färben mit Coomassie Brilliant Blue R250 wurden die PAGE-Gele ausgewertet. Exemplarische Ergebnisse für das Crosslinking sind für die Proteine YycG und YycG(Y308N) in Abbildung 3.22 dargestellt.

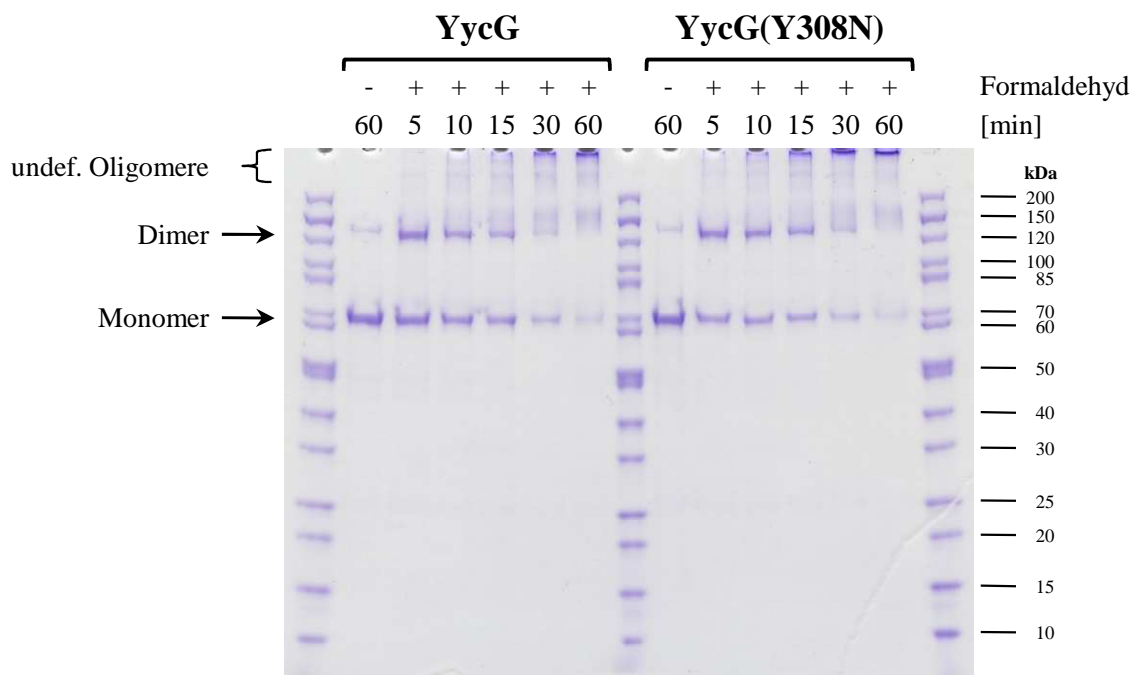


Abbildung 3.22: SDS-PAGE-Analyse. Exemplarische Abbildung für alle durchgeführten Crosslinking-Experimente. In einem Zeitreihenexperiment wurde die Befähigung der C-His₆-getaggtten Protein YycG bzw. YycG(Y308N) zur Ausbildung von höheren oligomeren Organisationen in An- und Abwesenheit des Crosslinkers Formaldehyd untersucht.

Trotz des an sich erfolgreichen Crosslinkings wird anhand der für die C-His₆-getaggten Proteine YycG und YycG(Y308N) exemplarisch dargestellten Ergebnisse deutlich, dass die Methodik für die Darstellung von höheren oligomeren Organisationen, die über den Status von Dimeren hinausgehen, unter diesen Bedingungen nicht geeignet ist. So ließ sich für beide Proteine gut darstellen, dass über den zeitlichen Verlauf die Menge des Proteins, die als Monomer vorlag abnahm, und gleichzeitig die Menge des Proteins, die als Dimer vorlag, zunahm. Im weiteren zeitlichen Verlauf kam es dann auf Kosten der Menge an Monomeren und Dimeren auch zur Entstehung von noch höheren oligomeren Organisationen. Nachteilig war dabei aber, dass sich diese höheren Organisationstufen anhand des aufgetragenen Markers nicht mehr eindeutig in ihrem Status differenzieren ließen, insbesondere durch die Tendenz in den Geltaschen zu akkumulieren. Dieser Umstand ließ sich auch durch die Verwendung eines Systems mit der kapazitiven Möglichkeit, auch Proteine bis zu einer Größe von 500 kDa aufzutrennen, nicht beseitigen. Zu diesem Zweck wurden nachfolgend niedrig konzentrierte Gradientengele (Fa. Invitrogen; NuPAGE® Novex Tris Acetate 3 – 8 %, 1.0 mm, 12 well) unter Gebrauch von Tris-Acetat-Laufpuffer (Fa. Invitrogen; Tris Acetate Running Buffer) und unter Verwendung eines entsprechenden Markers (Fa. Invitrogen; HighMark™ Unstained Protein Marker) in der SDS-PAGE eingesetzt. Die so beobachtbaren oligomeren Organisationen, die über den Status des Dimers hinausgingen, waren aber nur äußerst schwach und nicht in allen Fällen zweifelsfrei darstellbar. Da die Problematik der Protein-Akkumulation in den Geltaschen bestehen blieb, wurde mit der Blau-Nativen-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) eine alternative Methode zur Untersuchung des oligomeren Status der Yyc-C-His₆ Proteine angewendet (Abschnitt 2.9.7 und 3.11).

Durch die Crosslinking-Versuche ließen sich ferner keine Interaktionen der einzelnen Proteine untereinander nachweisen. So ließen sich trotz mehrfacher Versuche unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinerlei durch Zusammenlagerung gebildete Komplexe innerhalb des durch den Marker abgedeckten Größenbereichs beobachten. Dies schließt natürlich generell nicht aus, dass es zu Interaktionen *in vivo* kommt. Am wahrscheinlichsten ist, dass die TM-Domänen der YycG-, Yyc(Y308N)-, YycH- und YycI-Proteine die Anwesenheit einer Membran erfordern, die erst die volle native Konformation der Proteine und damit erst die Fähigkeit zu gegenseitigen Interaktion bedingt. Insbesondere unter dem Aspekt, dass Formaldehyd als Crosslinker mit $\sim 2 - 3 \text{ \AA}$ eine relativ geringe Crosslinking-

Distanz besitzt, ergibt sich, dass zur Interaktion zwischen den Proteinen nur eine sehr kurze Distanz vorliegen darf, die Formaldehyd als Crosslinker überbrücken könnte.

3.11 BN-PAGE: Untersuchung des oligomeren Status der Yyc-C-His₆-Proteine

Da durch die Crosslinking-Experimente nur unzureichend untersucht werden konnte, ob die aufgereinigten Yyc-C-His₆-Proteine unter nicht-denaturierenden Bedingungen eine höhere oligomere Organisation zeigen, wurde mit der Blau-Nativen-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) eine alternative Methode verwendet. Von den rekombinanten Proteinen YycF-C-His₆, YycH-C-His₆ bzw. YycI-C-His₆ wurden jeweils 5 µg und von den Kinasen YycG-C-His₆ und YycG(Y308N)-C-His₆ jeweils 10 µg in ein natives Polyacrylamidgel mit einem linearen Gradient von 4 – 20 % aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 3.23).

Für die Angaben zu den Laufhöhen des Molekulargewichtsstandards (BN-Standard) sei auf Tabelle 7.2 im Anhang unter Punkt 7.7 verwiesen.

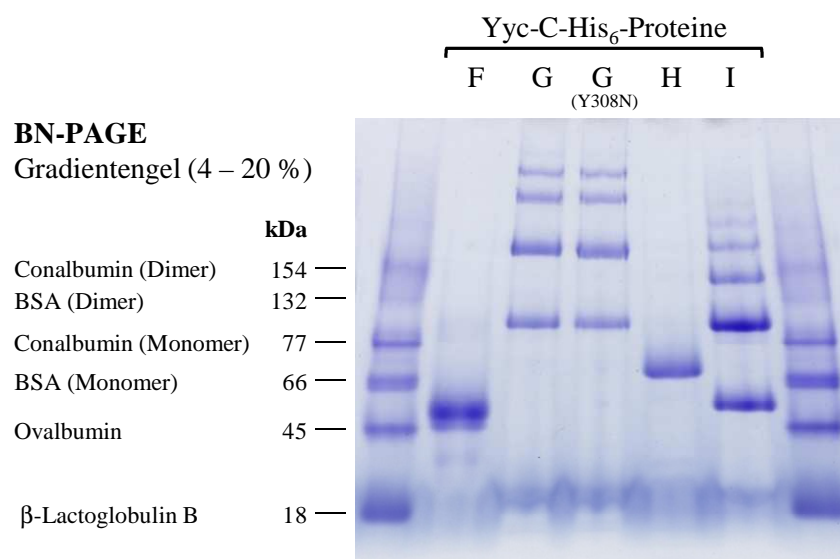


Abbildung 3.23: BN-PAGE zur Analyse der oligomeren Organisation der rekombinant in *E. coli* exprimierten C-His₆-getaggten Yyc-Proteine von *S. aureus*.

Mit der BN-PAGE ließ sich die Ausbildung von höheren oligomeren Organisationen der einzelnen C-His₆-getaggten Yyc-Proteine wesentlich besser beobachten, als mit den durchgeführten Crosslinking-Experimenten. Deutlich zu erkennen ist, dass der Responseregulator YycF-C-His₆ und das auxiliäre Protein YycH-C-His₆ nur als Monomere in

Erscheinung traten. Die Histidin-Kinasen YycG-C-His₆ und YycG(Y308N)-C-His₆ hingegen zeigten eine höhere oligomere Organisation, die vom Monomer bis hin zum Tetramer reichte. Die höchste oligomere Organisation zeigte das auxiliäre Protein YycI-C-His₆, dessen Organisation vom Monomer bis hin zum Hexamer reichte.

Wie bei den Crosslinking-Experimenten konnten auch mit der BN-PAGE keine Interaktionen der Proteine untereinander, in Form von zusammengelagerten Komplexen, nachgewiesen werden. Die möglichen Gründe dafür sind vermutlich ähnlich gelagert, aber selbst wenn eine Membran anwesend wäre, die es den Proteinen erlauben würde miteinander in Form von Hetero-Oligomeren zu interagieren, müsste man davon ausgehen, dass die nicht-kovalenten Bindungen zwischen solcherlei gebildeten Komplexen zu schwach sind, als dass diese während der Migration innerhalb der BN-PAGE stabilisiert würden.

Auffällig ist, dass das Migrationsverhalten der C-His₆-getaggten Yyc-Proteine von dem der Markerproteine deutlich abweicht. Alle Yyc-C-His₆-Proteine, einschließlich der Oligomere, laufen in der BN-PAGE deutlich höher als anhand der Markerproteine zu erwarten wäre (siehe Abbildung 3.23 und Tabelle 3.4). Die Tatsache, dass die in der BN-PAGE beobachteten Molekulargewichte der Yyc-C-His₆-Proteine nicht mit den Größen der Markerproteine korrelieren, kann dadurch erklärt werden, dass erstens im Gegensatz zur SDS-PAGE generell das Verhältnis der Menge von gebundenen Coomassie Brilliant Blue zur Masse des Proteins je nach Protein variiert (SCHÄGGER et al., 1994) und zweitens insbesondere Membranproteine bzw. hydrophobe Proteine deutlich größere Mengen des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue binden, was zu der Masse des Proteins in nicht unbeträchtlicher Maße beitragen kann (HEUBERGER et al., 2002). Um trotzdem die Molekulargewichte diverser rekombinanter Membrantransportproteine zu ermitteln, bestimmten HEUBERGER et al. (2002) für ihre verwendeten Membranproteine experimentell einen Korrekturfaktor von 1,8, der das anhand der BN-PAGE und den Markerproteinen bestimmte höhere Molekulargewicht bereinigt und so dem erhöhten Bindeverhalten von Membranproteinen für Coomassie Brilliant Blue Rechnung trägt.

Für die Bestimmung der Molekulargewichte der Yyc-C-His₆-Proteine wurde in dieser Arbeit entsprechend verfahren. Zunächst wurde für die löslichen Markerproteine anhand der Migrationsstrecken in der BN-PAGE und den bekannten Molekulargewichten eine Eichgerade erstellt. Für die Migrationsstrecken der rekombinanten Yyc-C-His₆-Proteine in der

BN-PAGE wurde dann das Molekulargewicht anhand der Eichgerade der Markerproteine bestimmt. Zur Berechnung des Korrekturfaktors für die rekombinanten Yyc-C-His₆-Proteine wurde dann das in der BN-PAGE ermittelte Molekulargewicht gegen das tatsächliche Molekulargewicht der Yyc-C-His₆-Proteine aufgetragen, welches mittels der Aminosäuresequenz berechnet wurde (siehe Anhang 7.6). Aus der linearen Regression wurde dann der für diese Proteine und dieses Experiment individuelle Korrekturfaktor abgeleitet (Abbildung 3.24).

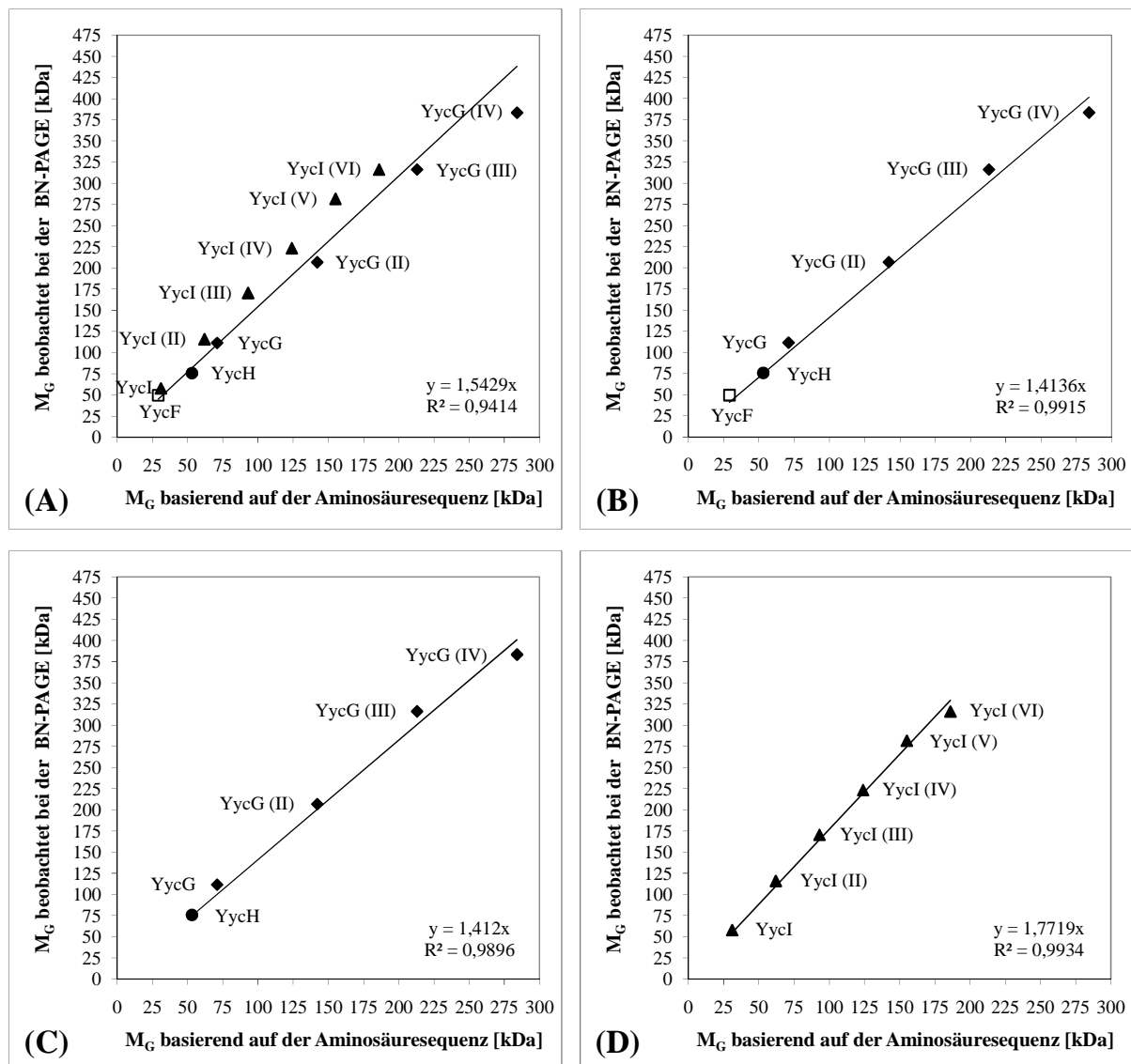


Abbildung 3.24: Berechnung des Korrekturfaktors für die Yyc-C-His₆-Proteine. Die bei der BN-PAGE mit Hilfe der Markerproteine beobachteten Molekulargewichte wurden gegen die, anhand der Aminosäuresequenz der Proteinmonomere, berechneten Molekulargewichte aufgetragen, um den Korrekturfaktor mittels linearer Regression ermitteln zu können. (A) Alle Yyc-C-His₆-Proteine sind zusammen eingezeichnet. (B) Aufgetragen sind die Organisationsstufen aller Yyc-C-His₆-Proteine, die einen isoelektrischen Punkt (pI) von 5,37 bis 5,92 besitzen. (C) Wie Teilabbildung (B), allerdings ohne das C-His₆-getaggte Nicht-Membranprotein YycF. (D) Aufgetragen sind alle Organisationstufen des C-His₆-getaggtten Proteins YycI, das einen pI von 8,69 besitzt.

M_G = Molekulargewicht; Yyc-C-His₆ Proteine: \square = YycF, \blacklozenge = YycG, \bullet = YycH, \blacktriangle = YycI; römische Ziffern: (II) – (VI) = höhere Organisation des Proteins als Dimer bis hin zum Hexamer. Da die His₆-getaggtten Proteine YycG bzw. YycG(Y308N) und ihre Oligomere in der BN-PAGE exakt das gleiche Migrationsverhalten zeigten, wurden für die Berechnungen nur das C-His₆-getaggte YycG-Protein herangezogen.

Da der isoelektrische Punkt (pI), also der pH-Wert, an dem sich die positiven und negativen Ladungen eines Proteins aufheben und die Nettoladung Null beträgt, einen entscheidenden Einfluss auf das Migrationsverhalten der Proteine in der BN-PAGE haben kann (SCHÄGGER et al., 1994), erfolgte zur Ermittlung des Korrekturfaktors in diesem Experiment die Betrachtung der Yyc-C-His₆-Proteine in Abhängigkeit ihres isoelektrischen Punktes (pI). In Abbildung 3.24 (A) zeigt sich, dass besonders die höheren oligomeren Organisationen der C-His₆-getaggtten Proteine YycG und YycI stark vom Verlauf der Regressionsgerade abweichen. Betrachtet man den pI-Wert der Proteine (siehe Anhang 7.6), so zeigt sich, dass die C-His₆-getaggtten Proteine YycF, YycG und YycH alle einen ähnlichen pI von 5,37 – 5,92 besitzen, während YycI mit einem pI von 8,69 einen wesentlich höheren Wert besitzt. Bezieht man dies ein und trägt nur die Proteine zusammen auf, die eine ähnlichen pI besitzen (Abbildung 3.24 (C) und (D)), so zeigt sich, dass das Bestimmtheitsmaß (R^2) der entsprechenden Regressionsgeraden signifikant steigt. Bei einem ähnlichen pI-Wert spielt es offensichtlich auch keine Rolle, dass es sich bei dem C-His₆-getaggtten Protein YycF um kein Membranprotein handelt, da sich bei Einbeziehung weder R^2 der linearen Regression noch der sich daraus ergebende Korrekturfaktor signifikant ändert (vergleiche bei Abbildung 3.24 (B) mit (C)). Dies deutet auch daraufhin, dass die Anzahl der TM-Domänen in diesem Experiment nicht die entscheidende Ursache für das gegenüber den Markerproteinen abweichende Migrationsverhalten in der BN-PAGE ist. Für diese Annahme spricht weiterhin, dass HEUBERGER et al. (2002) in ihren Experimenten wesentlich komplexere rekombinante Membranproteine verwendeten, die durch den Besitz von 4 – 12 TM-Domänen charakterisiert sind. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den in dieser Arbeit in die BN-PAGE eingesetzten Yyc-C-His₆-Proteinen um Membranproteine mit deutlich geringerer Komplexität. So sind YycG-C-His₆ bzw. YycG(Y308N)-C-His₆ nur durch den Besitz von zwei TM-Domänen gekennzeichnet. YycH-C-His₆ und YycI-C-His₆ besitzen jeweils nur eine TM-Domäne, und YycF-C-His₆ hat keinerlei TM-Domäne. Deswegen muss der C-His₆-Tag selbst als wesentlicher Faktor für das veränderte Migrationsverhalten in der BN-PAGE angesehen werden. Aufgrund dieser Tatsache wurde das Protein YycF-C-His₆ für die weitere Betrachtung, obwohl es kein Membranprotein ist, mit einbezogen.

In Tabelle 3.4 sind für die Yyc-C-His₆-Proteine und ihre höheren oligomeren Organisationen, die bei der BN-PAGE beobachteten Molekulargewichte und die anhand der Aminosäuresequenzen der Proteinmonomere berechneten Molekulargewichte aufgeführt. Ferner sind

die nach Anwendung der in Abbildung 3.24 ermittelten Korrekturfaktoren (K) bereinigten Molekulargewichte und der Δ -Wert aufgeführt. Der Δ -Wert zeigt dabei die Abweichung in kDa des nach Anwendung des Korrekturfaktors resultierenden Molekulargewichts von dem mittels der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewichts an. Bleibt der pI-Wert der Proteine bei der Ermittlung des Korrekturfaktors außen vor, so zeigt sich deutlich, dass bei Anwendung dieses Faktors (1,5) der Δ -Wert bei den meisten der berücksichtigten Proteine relativ groß ist. Im Gegensatz dazu ist der Δ -Wert deutlich kleiner, wenn der pI-Wert vor der Ermittlung des Korrekturfaktors berücksichtigt wird.

Tabelle 3.4: Aufgeführt sind der beobachtete oligomere Status der Yyc-C-His₆-Proteine und die Molekulargewichte, welche mit der BN-PAGE ermittelt werden konnten. Den so ermittelten Molekulargewichten ist das Molekulargewicht gegenübergestellt, das mittels der Aminosäuresequenz der Yyc-C-His₆-Proteinmonomere berechnet wurde. Es zeigt sich deutlich die Diskrepanz zwischen den beiden Ermittlungsmethoden, die ursächlich auf das gegenüber den Markerproteinen veränderte Migrationsverhalten in der BN-PAGE zurückzuführen ist. Mittels den aus der Abbildung 3.24 ermittelten Korrekturfaktoren wurde das in der BN-PAGE beobachtete Molekulargewicht durch die Anwendung des Korrekturfaktors bereinigt: (1) Anwendung des Korrekturfaktors der den pI-Wert der Yyc-C-His₆-Proteine nicht berücksichtigt, (2) Anwendung des Korrekturfaktors für die Yyc-C-His₆-Proteine mit einem pI von 5,37 – 5,92 und (3) Anwendung des Korrekturfaktors für das C-His₆-getaggte Protein YycI, das einen pI von 8,69 besitzt. Deutlich zu erkennen ist, dass die unter Berücksichtigung des pI-Wertes bei der Ermittlung des Korrekturfaktors bereinigten Molekulargewichte (kursiv) und deren Δ -Werte (kursiv) deutlich näher an dem Molekulargewicht liegen, das auf Basis der Aminosäuresequenz berechnet wurde (fett) als die Werte, die unter ermittelt wurden, wenn der pI-Wert nicht berücksichtigt wurde.

Da die C-His₆-getaggtten Proteine YycG bzw. YycG(Y308N) und ihre Oligomere in der BN-PAGE exakt das gleiche Migrationsverhalten zeigten, wurden für die Berechnungen nur das C-His₆-getaggte YycG-Protein herangezogen.

Oligomerer Status in der BN-PAGE	Molekulargewicht (M _G) [kDa]		M _G [kDa] und Δ -Werte [kDa] nach Anwendung des Korrekturfaktors					
	auf Basis der Aminosäure- sequenz	beobachtet bei der BN-PAGE	(1) M _G	Δ	(2) M _G	Δ	(3) M _G	Δ
			(K=1,5)		(K=1,4)		(K=1,8)	
YycF	29	50	33	4	<i>35</i>	<i>6</i>	-	-
YycG (Tetramer)	284	383	256	28	<i>274</i>	<i>10</i>	-	-
YycG (Trimer)	213	316	211	2	<i>226</i>	<i>13</i>	-	-
YycG (Dimer)	142	207	138	4	<i>148</i>	<i>6</i>	-	-
YycG	71	111	74	3	<i>80</i>	<i>9</i>	-	-
YycH	53	76	51	2	<i>54</i>	<i>1</i>	-	-
YycI (Hexamer)	186	316	211	25	-	-	<i>176</i>	<i>10</i>
YycI (Pentamer)	155	282	188	33	-	-	<i>156</i>	<i>1</i>
YycI (Tetramer)	124	223	149	25	-	-	<i>124</i>	<i>0</i>
YycI (Trimer)	93	170	114	21	-	-	<i>95</i>	<i>2</i>
YycI (Dimer)	62	116	77	15	-	-	<i>64</i>	<i>2</i>
YycI	31	58	39	8	-	-	<i>32</i>	<i>1</i>

3.12 Phosphorylierungsassays

Zunächst wurden die geeigneten Bedingungen ermittelt, unter denen die vollständigen, mit beiden TM-Domänen rekombinant in *E. coli* exprimierten, C-His₆-getaggten *S. aureus* Sensor-Histidin-Kinasen YycG und YycG(Y308N) eine *in vitro*-Phosphorylierungsaktivität zeigten. Dabei sollte in einem ersten Schritt die Autophosphorylierungsaktivität, und in einem zweiten Schritt die Befähigung zum Phosphorylgruppentransfer auf den zugehörigen Responseregulator YycF beobachtet werden, der ebenfalls als C-His₆-getaggt und rekombinantes Protein exprimiert wurde. Beide Aktivitäten sollten dabei durch die Anwesenheit von radioaktiven [γ ³³P]ATP nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Experimente wurde zunächst ein Detergenz-Mizellen-Modell etabliert, in dem dem Detergenz Triton X-100 eine entscheidende Rolle zukommt. Das Detergenz ermöglicht es, dass die beiden Kinasen YycG und YycG(Y308N) trotz ihrer beiden TM-Domänen und den damit einhergehenden Eigenschaften als Membranprotein auch in Abwesenheit einer Membran eine partielle Aktivität zeigen, die für die oben genannten beiden Phosphorylierungsaktivitäten notwendig ist. Das setzt voraus, dass unter diesen Bedingungen mindestens die HATPase_c-Domäne für die ATPase-Aktivität, die HisKA-Domäne als Akzeptor- und in einem zweiten Schritt auch als Transferdomäne funktional sein müssen. Da die Autophosphorylierung *in vivo* außerdem *in trans* erfolgt, ist es wahrscheinlich auch notwendig, dass die HAMP-Domäne als Dimerisierungsschnittstelle funktional ist, um auch im Detergenz-Mizellen-Modell die Dimerisierung von zwei Kinase-Monomeren herbeizuführen.

Nach der erfolgreichen Etablierung, erfolgte auf der Basis des Detergenz-Mizellen-Modells die Etablierung eines Phospholipid-Liposomen-Modells, um bei den Kinasen YycG und YycG(Y308N) auch dem Charakter eines Membranproteins gerecht zu werden. Im Idealfall sollte es so möglich werden, die Eigenschaften der Kinasen bei voller Funktionalität untersuchen zu können.

Alle nachfolgend aufgeführten Ergebnisse wurden in Phosphorylierungsassays ermittelt, die mit rekombinant exprimierten Yyc-C-His₆-Proteinen durchgeführt wurden. Zur stabilen Lagerung befanden sich diese bei -20 °C in phosphatfreiem Dialysepuffer II (Lagerpuffer II).

3.12.1 Detergenz-Mizellen-Modell

Bei der Etablierung des Detergenz-Mizellen-Modells wurden anfänglich, neben dem später ausschließlich verwendeten Detergenz Triton X-100, auch noch weitere Detergenzien wie CHAPS, CHAPSO, deoxyBIGCHAP, N-Laurylsarcosin und DDM getestet. Allerdings ergaben sich bei den Experimenten mit diversen Endkonzentrationen, unter Berücksichtigung der jeweiligen CMC (critical micelle concentration) des verwendeten Detergenz, bei allen Detergenzien zunächst – allenfalls – nur äußerst schwache Signalintensitäten auf den belichteten Röntgenfilmen. Da die ersten schwachen Phosphorylierungsaktivitäten keine Hinweise darauf gaben, dass ein Detergenz wesentlich besser geeignet ist als Triton X-100, erfolgte die Optimierung der Reaktionsbedingungen, auch wenn sich zeigte, dass in Anwesenheit von CHAPS bzw. CHAPSO Aktivitäten der YycG- und YycG(Y308N)-Kinasen zu verzeichnen waren, ausschließlich für Triton X-100. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen in Anwesenheit von Triton X-100 umfasste u.a. auch das Austesten von verschiedenen Endkonzentrationen des bei der Autophosphorylierung notwendigen Cofaktors Mg^{2+} . Wie sich relativ spät herausstellte, hat aber besonders eine hohe Salzkonzentration (KCl) im Phosphorylierungspuffer einen sehr entscheidenden Einfluss auf die Aktivität der Kinasen (Abschnitt 3.12.1.1).

3.12.1.1 Einfluss der Salzkonzentration (KCl) auf die Kinase-Aktivität

Um den Einfluss der Salzkonzentration auf die Aktivität genauer zu untersuchen, erfolgten mit den Kinasen Phosphorylierungsassays mit einer ansteigenden KCl-Konzentration (200 – 600 mM) im Phosphorylierungspuffer. Ferner war in allen Ansätzen das Detergenz Triton X-100 in einer Endkonzentration von 8,5 mM vorhanden. Die Initiation der Autophosphorylierungsreaktion erfolgte durch die Zugabe eines Mixes aus „kaltem“ ATP und „heißem“ $[\gamma^{33}P]ATP$. Die Abhängigkeit der Phosphorylierungsaktivität von der eingesetzten KCl-Konzentration zeigt Abbildung 3.25.

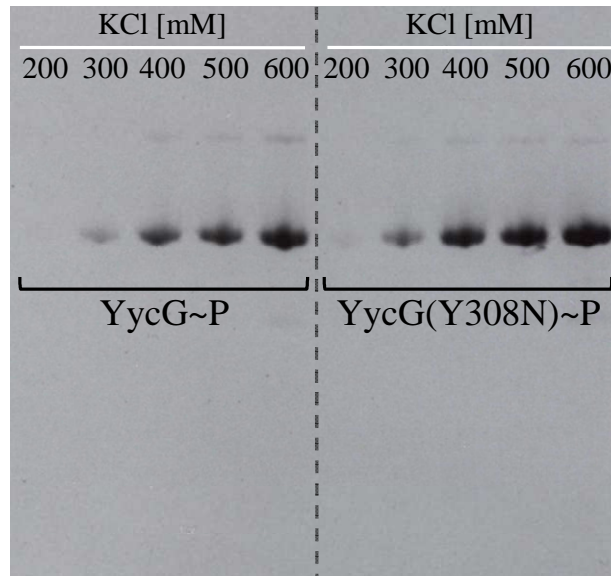


Abbildung 3.25: Autoradiogramm. Abhängigkeit der Phosphorylierungsaktivität der vollständig exprimierten C-His₆-getaggten Kinasen YycG und YycG(Y308N) von der Salzkonzentration.

Gut zu erkennen ist, dass die Autophosphorylierungsaktivität der C-His₆-getaggten Kinasen YycG und YycG(Y308N) im Detergenz-Mizellen-Modell in deutlicher Abhängigkeit zu der im Phosphorylierungspuffer enthaltenen KCl-Konzentration steht und unter den gewählten Bedingungen ein Maximum zwischen 500 – 600 mM erreicht. Diese Konzentration ist ungewöhnlich hoch, insbesondere wenn man bedenkt, dass z.B. isotonische NaCl-Lösung 0,9 % (w/v) NaCl enthält und damit eine Konzentration von 154 mM besitzt. Für alle nachfolgenden Phosphorylierungsassays wurde der 1x CL3.5-Phosphorylierungspuffer auf eine KCl-Konzentration von 500 mM standardisiert.

1x CL3.5-Phosphorylierungspuffer: 50 mM HEPES, 500 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 3,5 % (v/v) Glycerin, pH 8

3.12.1.2 Phosphorylgruppentransfer von YycG bzw. YycG(Y308N) auf YycF

Um zu prüfen, ob die beiden C-His₆-getaggten Kinasen YycG und YycG(Y308N) nach der erfolgreich gezeigten Autophosphorylierung (Abbildung 3.25) auch in der Lage sind, in einem zweiten Schritt ihren zugehörigen Responseregulator YycF zu phosphorylieren, wurde das C-His₆-getaggte Protein YycF in Anwesenheit der beiden Kinasen unter den gleichen Bedingungen inkubiert, die zu einer erfolgreichen Autophosphorylierung der Kinasen geführt

hatten. Für ein Zeitreihenexperiment erfolgte durch die Zugabe einer Mischung aus „kaltem“ ATP und „heißem“ [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP die Initiation der Phosphorylierungsreaktion. Für die Zeitreihe erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch die Zugabe von 5x SDS-Probenpuffer (nach Fa. Qiagen) nach 1, 5, 15, 30 bzw. 60 min. Als Kontrolle der Autophosphorylierungsaktivität wurden die Kinaseproteine YycG und YycG(Y308N) unter gleichen Bedingungen ohne YycF für 1 min inkubiert und nachfolgend abgestoppt. Den Phosphorylgruppentransfer im zeitlichen Verlauf zeigt Abbildung 3.26.

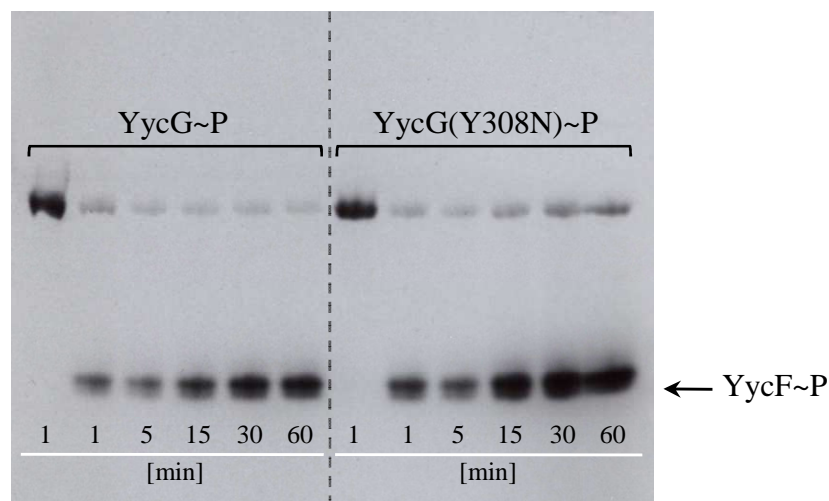


Abbildung 3.26: Autoradiogramm. Zeitabhängige, in einem zweiten Schritt vollzogene Phosphorylierung des Responseregulators YycF durch die Histidin-Kinasen YycG oder YycG(Y308N). Zur Kontrolle der Autophosphorylierungsaktivität wurden beide Kinasen in Abwesenheit von YycF unter gleichen Bedingungen für 1 min inkubiert.

Es wird deutlich, dass die beiden vollständig exprimierten Kinasen YycG und YycG(Y308N) *in vitro* nicht nur zur Autophosphorylierung in der Lage sind, sondern auch in einem nachfolgenden Schritt befähigt sind, einen Phosphorylgruppentransfer auf ihren zugehörigen Responseregulator YycF zu leisten. Interessant ist dabei, dass der Phosphorylgruppentransfer deutlich langsamer von statten zu gehen scheint als die initiale Autophosphorylierung der Kinasen, da erst nach 30 min die maximale Phosphorylierung des anwesenden Responseregulators YycF erreicht wird. Auffallend ist ferner, dass die Autophosphorylierungsaktivität in Anwesenheit von YycF kein Maximum erreicht. In Anwesenheit von YycF ist zu allen Zeiten die Signalintensität der Kinasen etwa gleich ausgeprägt, aber wesentlich schwächer als die Intensität, die die Kinasen in Abwesenheit von YycF bereits nach 1 min Inkubationszeit zeigen. Dies ein Hinweis darauf, dass es in

Anwesenheit von YycF auch zu einer Dephosphorylierungsaktivität der vollständigen Kinasen kommt. Diese Dephosphorylierungsaktivität konnte bei einer trunkiert (ohne TM-Domänen) exprimierten YycG'-Kinase von *S. aureus* nicht beobachtet werden (DUBRAC and MSADEK, 2004).

3.12.1.3 Dephosphorylierung von YycG(Y308N)~P und YycF~P durch Hitze

Um während des Etablierungsprozesses der Phosphorylierungsassays zu überprüfen inwieweit sich die Hitzeinwirkung bei der Denaturierung des Probenmaterials, die der SDS-PAGE-Analyse vorangeht, nachteilig auswirkt, wurden hitzebehandelte und unbehandelte Ansätze einander gegenübergestellt. Dazu wurden die Ansätze zunächst zur Phosphorylierung für 60 min in Anwesenheit von $[\gamma^{33}\text{P}]\text{ATP}$ und bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Nachfolgend wurde zum Vergleich vor der SDS-PAGE Analyse jeweils ein Ansatz für 10 min bei 95 °C inkubiert und ein zweiter Ansatz unmittelbar eingesetzt. Die hitzebedingte Dephosphorylierung der phosphorylierten Kinase YycG(Y308N) bzw. des phosphorylierten Responseregulators YycF zeigt Abbildung 3.27.

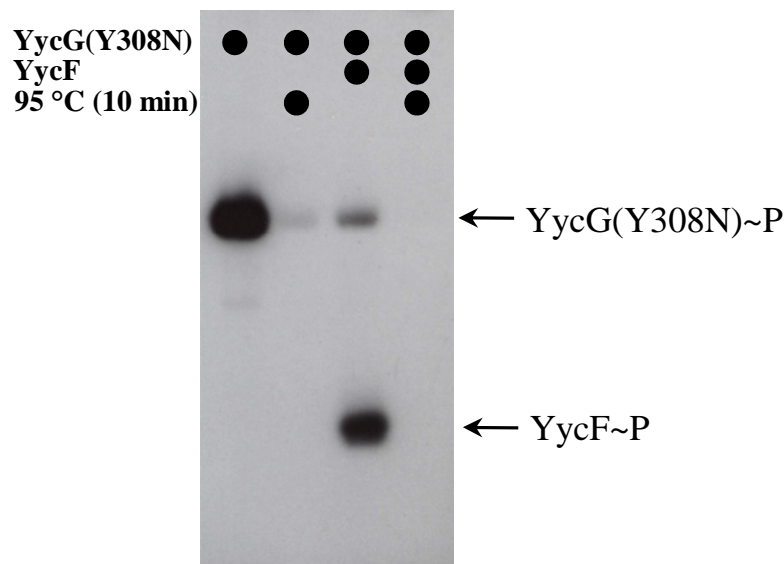


Abbildung 3.27: Autoradiogramm. Dephosphorylierung durch Hitzeinwirkung am Beispiel der Histidin-Kinase YycG(Y308N)~P und des Responseregulators YycF~P.

Auf dem belichteten Röntgenfilm ist deutlich zu erkennen, dass bei den hitzebehandelten Vergleichsproben in den entsprechenden Laufhöhen kaum Radioaktivität vorhanden ist. Dies verdeutlicht anschaulich die massive Dephosphorylierung, die durch die Hitzeinwirkung

verursacht wird. Als Konsequenz wurde in allen in dieser Arbeit durchgeführten Phosphorylierungsassays auf eine Denaturierung der Proteinproben vor der SDS-PAGE verzichtet. Stattdessen wurden die Proben unmittelbar in die PAGE-Gele aufgetragen.

3.12.1.4 Aktivität der YycG-Kinase in Anwesenheit von YycH und oder YycI

Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass die Kinasen YycG und YycG(Y308N) im Detergenz-Mizellen-Modell zur Autophosphorylierung und zum Phosphorylgruppentransfer auf YycF befähigt sind, sollte untersucht werden, ob sich die Anwesenheit der beiden auxiliären Proteine YycH bzw. YycI auf diese Aktivitäten möglicherweise verstärkend, abschwächend oder inhibierend auswirkt. Nach der Zugabe eines Mixes aus „kaltem“ ATP und „heißem“ $[\gamma^{33}\text{P}]\text{ATP}$ zum Starten der Phosphorylierungsreaktion erfolgte die Inkubation der Ansätze bei RT. Zum Abstoppen der Reaktion erfolgte nach 60 s die Zugabe von 5x SDS-Probenpuffer (nach Fa. Qiagen). Die Phosphorylierungsaktivitäten der YycG-Kinase in Anwesenheit der YycFHI-Proteine zeigt Abbildung 3.28.

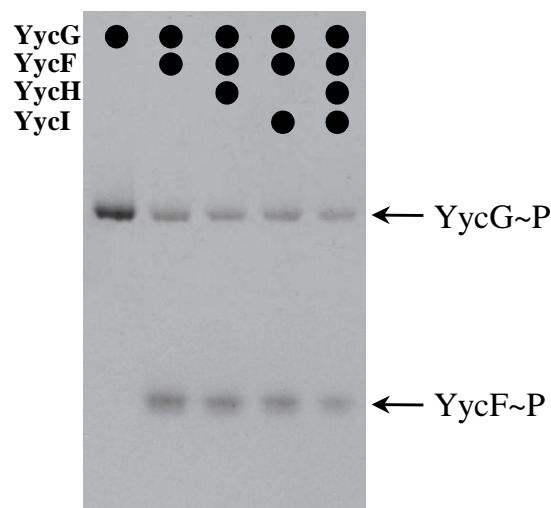


Abbildung 3.28: Autoradiogramm. Phosphorylierungsassays mit den C-His₆-getaggtten rekombinanten Yyc-Proteinen. Einfluss der auxiliären Proteine YycH und oder YycI auf die Phosphorylierungsaktivität der YycG-Histidin-Kinase in Anwesenheit des Responseregulators YycF.

Im Detergenz-Mizellen-Modell konnte durch die Anwesenheit der auxiliären Proteine YycH und oder YycI keinerlei Effekt auf die Aktivität der YycG-Kinase beobachtet werden. Dies ist höchstwahrscheinlich dadurch bedingt, dass in diesem Modell die Eigenschaften als Membranproteine von YycGHI nicht zum Tragen kommen können. Durch das Detergenz

liegen zwar ganz offensichtlich geeignete Bedingungen vor, die für die beiden Phosphorylierungsaktivitäten der Kinase hinreichend sind, aber scheinbar nicht ausreichend, um eine Interaktion zwischen YycG und den auxiliären Proteinen YycH bzw. YycI zu begünstigen. Auch bei einer Verkürzung der Inkubationszeit auf 30 bzw. 15 s ließ sich kein eindeutiger Effekt auf die Phosphorylierungsaktivität der YycG-Kinase beobachten. Insgesamt lässt sich daraus zumindest eine partielle Funktionalität der Kinase unter diesen Bedingungen schlussfolgern, die aber offensichtlich nur die funktionalen Domänen im cytoplasmatischen Teil der YycG-Kinase umfasst. Da aber besonders die Transmembran-Domänen der Kinase und die der auxiliären Proteine als maßgeblich bei der Protein-Protein-Interaktion angesehen werden (SZURMANT et al., 2008), ist das Detergenz-Mizellen-Modell nicht ausreichend geeignet, um das volle Spektrum der Interaktionen untersuchen zu können.

3.12.2 Phospholipid-Liposomen-Modell

Nach der erfolgreichen Etablierung des Detergenz-Mizellen Modells zur Untersuchung der YycFGHI-Proteine von *S. aureus*, erfolgte auf der Basis der gewonnen Erkenntnisse die Etablierung einer Methodik, die auch den Eigenschaften als Membranprotein der zu untersuchenden Proteine, insbesondere dem der Histidin-Kinasen YycG und YycG(Y308N), Rechnung trägt. Ziel war es dabei, ein Modellsystem zu schaffen, das deutlich näher an die tatsächliche *in vivo*-Situation heranreicht. Da eine aus Phospholipiden bestehende Biomembran mit hoher Sicherheit als unabdingbar für die volle Ausprägung der durch die Konformation bedingten Aktivität eines Membranproteins angesehen werden kann, wurde für die Phosphorylierungsassays ein Detergenz-freies Phospholipid-Liposomen-Modell als experimentelle Basis etabliert.

3.12.2.1 Phosphorylierungsaktivität von YycG-ULVs / YycG(Y308N)-ULVs

Analog zu den Assays mit den C-His₆-getaggtten Histidin-Kinasen YycG und YycG(Y308N) im Detergenz-Mizellen-Modell und der dort etablierten Standardzusammensetzung für den 1x CL3.5-Phosphorylierungspuffer, wurden mit den in ULVs rekonstituierten Kinasen ebenfalls Phosphorylierungsassays – ohne Detergenz – durchgeführt. Es wurde überprüft, inwieweit die Kinasen nach der Rekonstitution zur Autophosphorylierung fähig sind und ob sie auch in der Lage sind, in einem zweiten Schritt den Phosphorylgruppentransfer auf den Responseregulator YycF zu leisten. Der Responseregulator YycF wurde dabei den Ansätzen

mit den in die ULVs rekonstituierten Kinasen extern zugegeben. Die Initiation der Phosphorylierungsreaktion erfolgte durch die Zugabe von „heißem“ $[\gamma^{33}\text{P}]\text{ATP}$. Die Ansätze wurden durch die Zugabe von 5x SDS-Probenpuffer (nach Fa. Qiagen) abgestoppt und unmittelbar in die SDS-PAGE aufgetragen. Die Analyse der PAGE-Gele erfolgte durch die autoradiographische Belichtung von Röntgenfilmen. Die Phosphorylierungsaktivitäten der in ULVs rekonstituierten YycG(Y308N)-Kinase zeigt Abbildung 3.29.

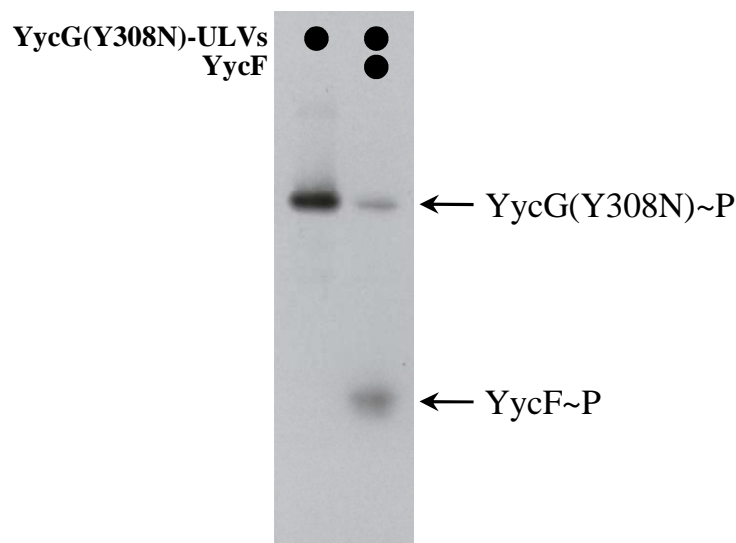


Abbildung 3.29: Autoradiogramm. Phosphorylierungsassays im Phospholipid-Liposomen-Modell. Das C-His₆-getaggte *S. aureus*-Kinaseprotein YycG(Y308N) wurde in ULVs aus einem polaren Lipidextrakt von *E. coli* rekonstituiert.

Für die Rekonstitution der C-His₆-getaggtten Kinase YycG(Y308N) konnte eine deutliche Befähigung zur Autophosphorylierung und damit auch für den Phosphorylgruppentransfer auf den C-His₆-getaggtten Responseregulator YycF gezeigt werden. Daraus wird ersichtlich, dass das Phospholipid-Liposomen-Modell, wie das Detergenz-Mizellen-Modell, grundsätzlich geeignete Bedingungen für die beiden Phosphorylierungsaktivitäten bereitstellt. Ein bedeutender Unterschied zwischen den beiden Modellen zeigte sich jedoch im Fall der ebenfalls in ULVs rekonstituierten, nativen YycG Kinase. Für diese konnten infolge einer deutlich verminderten Aktivität im Phospholipid-Liposomen-Modell keine äquivalenten Ergebnisse, wie für die mutierte YycG(Y308N)-Kinase, erbracht werden. Damit wird im Phospholipid-Liposomen-Modell, das näher an der tatsächlichen *in vivo*-Bedingungen ist als das Detergenz-Mizellen-Modell, ein drastischer Unterschied zwischen den beiden Histidin-Kinasen YycG und YycG(Y308N) deutlich. Da sich beide Kinasen nur durch den

Aminosäureaustausch (Y308N) in der PAS-Domäne der mutierten Kinase unterscheiden, kann der Austausch als ursächlich für diesen Unterschied in der Aktivität angesehen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Phospholipid-Liposomen-Modell auch den Membranprotein-Eigenschaften der YycG-Kinasen gerecht wird, da erst durch die Anwesenheit einer Membran und der damit einhergehenden korrekten Faltung der Proteine ein Effekt des Aminosäureaustausches *in vitro* zum Vorschein gebracht werden konnte, bzw. die native YycG-Kinase erst unter diesen Bedingungen eine verminderte Aktivität zeigte. Es sei in diesem Zusammenhang auf den direkten Aktivitätsvergleich der beiden Kinasen in beiden Modellsystemen in Abbildung 3.31 verwiesen.

3.12.2.2 Einfluss von C₅₅-P / Lipid II auf die Aktivität von YycG(Y308N)-ULVs

Um zu prüfen, ob Lipid II als Komponente der Zellwandbiosynthese als mögliches Signal einen Einfluss auf die Aktivität der C-His₆-getaggten Histidin-Kinase YycG(Y308N) hat, wurden für die Rekonstitution der Kinase Lipid II-dotierte ULVs verwendet. Als Kontrolle wurde die Kinase desweiteren in undotierte ULVs und in C₅₅-P-dotierte ULVs rekonstituiert. Um die ULV-Chargen in den nachfolgenden Phosphorylierungsassays miteinander vergleichen zu können, wurden von den dotierten und undotierten YycG(Y308N)-ULVs mittels des Phosphattestes gleiche Mengen an anorganischen Phosphat (P_i) eingesetzt. Die Initiation der Phosphorylierungsreaktion erfolgte durch die Zugabe von „heißem“ [γ ³³P]ATP und wurde durch die Zugabe von 5x SDS-Probenpuffer (nach Fa. Qiagen) abgestoppt. Die Autophosphorylierungsaktivität der dotierten und undotierten YycG(Y308N)-ULVs zeigt Abbildung 3.30.

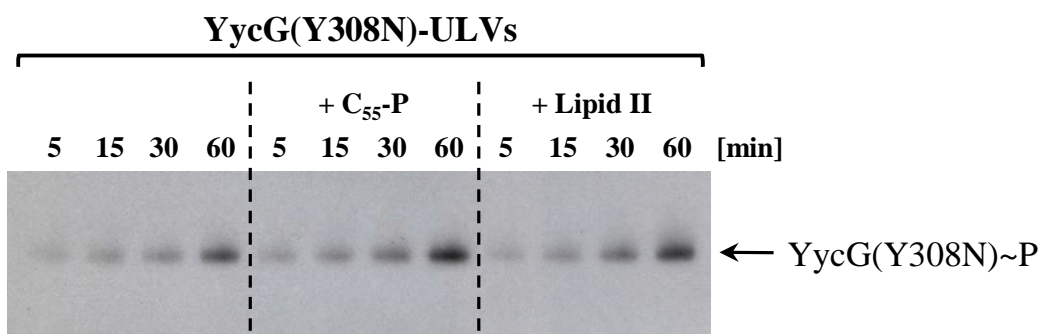


Abbildung 3.30: Autoradiogramm. Vergleich der Aktivität der C-His₆-getaggten Histidin-Kinase YycG(Y308N) in Lipid II-dotierten ULVs. Als Kontrollen dienten C₅₅-P-dotierte und undotierte YycG(Y308N)-Proteoliposomen.

Aus den Zeitreihenexperimenten mit den dotierten und undotierten YycG(Y308N)-ULVs, wurde bei den dotierten Proteoliposomen im Vergleich zu den undotierten Kontroll-Proteoliposomen ersichtlich, dass C₅₅-P bzw. Lipid II weder einen hemmenden noch einen verstärkenden Effekt auf die Autophosphorylierungsaktivität der in die Liposomen rekonstituierten YycG(Y308N)-Kinase hat. Für die zweite Kinaseaktivität, den Phosphorylgruppentransfer auf den extern zugegebenen Responseregulator YycF, zeigte sich das gleiche Bild. Auch wenn kein Effekt beobachtet werden konnte, lässt sich daraus aber nicht abschließend bewerten, inwieweit C₅₅-P oder insbesondere Lipid II als zentrale Komponenten der Zellwandbiosynthese als Signal-Moleküle für die YycG-Sensor-Histidin-Kinase fungieren. Dazu muss man sich vergegenwärtigen, dass die durchgeführten Phosphorylierungsassays im Phospholipid-Liposomen-Modell ausschließlich mit der mutierten YycG(Y308N)-Kinase in den ULVs durchgeführt werden konnte, weil die native YycG-Kinase nach der Rekonstitution in die ULVs – wie in Abbildung 3.31 dargelegt – eine vergleichsweise geringe Aktivität zeigte. Da desweiteren der Aminosäureaustausch auf die Aktivität der mutierten YycG(Y308N)-Kinase offenbar einen triggernden Effekt hat (Abschnitt 3.12.2.1), bleibt vorerst offen, inwieweit in dotierten ULVs die Anwesenheit von C₅₅-P bzw. Lipid II einen Effekt auf die rekonstituierte native YycG-Kinase haben könnte. An dieser Stelle sei auf den Diskussionsteil (Abschnitt 4.2.3) verwiesen, in dem die Möglichkeit dargelegt wird, dass der Aminosäureaustausch in der YycG(Y308N)-Kinase eine „ON“-Mutation bezüglich der Kinaseaktivität darstellen könnte.

3.12.3 Die beiden Modellsysteme im Vergleich

Zum direkten Vergleich der C-His₆-getaggtten Histidin-Kinasen YycG und YycG(Y308N) im Detergenz-Mizellen-Modell bzw. im Phospholipid-Liposomen-Modell erfolgte eine Gegenüberstellung der Proteine in beiden Modellsystemen. Im Detergenz-Mizellen-Modell wurden jeweils 1,5 µg pro Protein eingesetzt. Zur Gewährleistung, dass im Phospholipid-Liposomen-Modell gleiche Mengen Proteoliposomen miteinander verglichen wurden, wurde mit den frisch extrudierten Proteoliposomen zuvor ein Phosphattest (Abschnitt 2.9.11) durchgeführt, um sicherzustellen, dass gleiche Mengen von YycG-ULVs und YycG(Y308N)-ULVs miteinander verglichen wurden. Bei allen Modellsystemen wurde je ein Ansatz alleine mit der jeweiligen Kinase durchgeführt, und zum Vergleich wurde jeweils zu einem zweiten Ansatz je 1,5 µg des C-His₆-getaggtten Responseregulators YycF zugegeben. Beim Detergenz-Mizellen-Modell erfolgt die Phosphorylierung standardmäßig in Anwesenheit von Triton

ausgeprägte Autophosphorylierungsaktivität besaß und damit auch eine deutlich stärkere Befähigung zum Phosphorylgruppentransfer auf den Responseregulator YycF zeigen konnte. Ferner war es interessant zu beobachten, dass im Phospholipid-Liposomen-Modell die Anwesenheit von Triton X-100 (in der gleichen Endkonzentration die für das Detergenz-Mizellen-Modell notwendig ist) zu einer sehr starken Verminderung der Kinaseaktivität führte. Zusammen mit der im Vergleich zu YycG(Y308N) geringen Kinaseaktivität von YycG wurde so deutlich, dass die durch die Phospholipide gebildete Membran in diesem Modell als ordnendes Element für die volle Kinaseaktivität notwendig ist, da die Anwesenheit des Detergenz offenbar zu einer Teilsolubilisierung dieser notwendigen Struktur führte, die als Folge die Kinaseaktivität aufhob.

4. Diskussion

4.1 Phänotypische Charakterisierung der *yycFG*-Überexpression in *S. aureus*

Um Hinweise auf die Funktion des Zwei-Komponentenregulationssystem YycFG in *S. aureus* zu erhalten erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung des Stammes 8325-4 SH1000, in den ein Xylose-induzierbares Plasmid eingebracht wurde, auf dem die *yycFG*-Gene codiert sind. Desweiteren wurde auch ein zusätzliches, konstruktionsgleiches Plasmid in diesen Wirtstamm eingebracht, bei dem es durch eine nicht-stille Mutation (T916A) in *yycG* zu einem Aminosäureaustausch (Y306N) in der putativ funktionalen PAS-Domäne von YycG kommt. Für die beiden induzierbaren Plasmide konnte mittels der qRT-PCR bei einer $OD_{600} \sim 1$ eine 7- bis 12-fache und in einem OD_{600} -Bereich von 3 – 3,5 eine mindestens 52-fache Überexpression des vektoriiellen *yycFG*-Transkriptes gemessen werden. Durch die Quantifizierungen konnte sichergestellt werden, dass es durch die induzierte *yycFG*-Überexpression in *S. aureus* zu einem massiven Anstieg in der Anzahl der von den Plasmiden transkribierten *yycFG*-Kopien kommt und dadurch eine maximale Hebelwirkung für die phänotypische Charakterisierung gewährleistet war.

4.1.1 Autoregulation der *yycFG*-Expression durch das YycFG-System

Da für die orthologen *yycFG*-Gene von *Streptococcus pneumoniae* in der Literatur (NG et al., 2003; MOHEDANO et al., 2005; NG et al., 2005) bezüglich einer möglichen Autoregulation kontroverse Ergebnisse beschrieben sind, sollte in dieser Arbeit für *S. aureus* die Möglichkeit der Autoregulation, also die Regulation der Expression der *yycFG*-Gene durch das YycFG-System selbst, geprüft und abschließend beantwortet werden. Prinzipiell kann eine solche Autoregulation direkt oder indirekt erfolgen. Bei der indirekten Variante, würde dabei der Responseregulator YycF nicht direkt auf die Expression einwirken, sondern über einen oder mehrere zwischengeschaltete Mediatoren. Die Möglichkeit der direkten Autoregulation durch YycF selbst wurde zunächst durch eine Literaturrecherche abgeklärt. So wird im Fall von *Bacillus subtilis* eine potenzielle Konsensus-Erkennungssequenz für den Responseregulator YycF beschrieben (HOWELL et al., 2003), die in einer nachfolgenden Publikation auch zur *in silico*-Vorhersage der möglicherweise in *S. aureus* regulierten Gene genutzt wurde, und zum Teil auch experimentell durch Gel-Mobility-Shifts bzw. DNase I-Footprinting-Assays verifiziert werden konnte (DUBRAC and MSADEK, 2004). In einer späteren Studie wurde dies für weitere Gene des vorhergesagten Regulons geprüft und mit der Methode der qRT-PCR

konnte ein positiver Effekt einer schwach-induzierten *yycFG*-Expression auf die Transkription von mehreren Genen gezeigt werden, die in den Abbau der bakteriellen Zellwand (Autolyse) involviert sind (DUBRAC et al., 2007). Allerdings gab es in den aufgeführten Studien keinerlei Hinweis darauf, dass das *yyc*-Operon selbst zu dem YycF-Regulon gehört. Diese Tatsache macht aber nur eine direkte Autoregulation unwahrscheinlich, während die Möglichkeit einer indirekten Autoregulation weiterhin bestehen bleibt. Diese könnte zum Beispiel mittels eines sogenannten „Cross-Talk“ erfolgen. Bei dieser Art der Regulation würde die YycG-Kinase mittels Phosphorylierung auf die Aktivität eines nicht-kognaten Responseregulators einwirken, der dann seinerseits Einfluss auf die Expression von *yycFG* nähme. Es muss allerdings eingeräumt werden, dass es umstritten ist, inwieweit es im Rahmen der normalen biologischen Funktion tatsächlich zum Cross-Talk kommt. Zwar wird der Cross-Talk mehrfach in der Literatur beschrieben, aber oft unter sehr unnatürlichen Bedingungen, z.B. bei stark unstöchiometrischen Verhältnissen zwischen Kinase und Responseregulator oder nach Deletion der kognaten Kinase (BIJLSMA and GROISMAN, 2003). Interessanterweise ist jedoch für *B. subtilis* auch ein physiologisch relevanter Cross-Talk beschrieben, bei dem PhoPR-TCS, welches unter Bedingungen der Phosphat-Limitierung eine Rolle spielt, eine regulatorische Interaktion mit dem YycFG-TCS zeigte. Konkret konnte gezeigt werden, dass durch eine gezielte Phosphatlimitierung, die bei den Zellen zum Übergang in die stationäre Phase führte, es durch die PhoR-Histidin-Kinase zur Phosphorylierung von YycF kam (HOWELL et al., 2006). Für die Serin/Threonin-Kinase StkP aus *S. pneumoniae* gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass sie in der Lage ist die Aktivität YycF zu modulieren (SASKOVA et al., 2007). Trotz dieser Befunde, bleibt es aber offen, inwieweit auch die YycG-Kinase – also im umgekehrten Fall – zu solch einer Art von Cross-Talk befähigt ist oder unter welchen Bedingungen dieser erfolgen könnte. Wichtig ist aber, dass diese Art der Regulation grundsätzlich möglich ist, und deshalb auch eine indirekte Autoregulation der *yycFG*-Expression mittels Cross-Talk auch nicht ausgeschlossen werden kann. Der Ansatz der in dieser Arbeit zur Untersuchung der Autoregulation von *yycFG* verwendet wurde, berücksichtigte deshalb sowohl eine direkte, als auch eine indirekte Autoregulation. Unter der Prämisse, dass es im Fall der Autoregulation durch den induzierten Anstieg in der Anzahl der vektoriellen *yycFG*-Transkripte auch zu einem Anstieg in der Anzahl der chromosomalen *yycFG*-Transkripte kommt, wurde zwischen dem Ursprung dieser Transkripte differenziert, um die jeweiligen Transkriptmengen quantifizieren zu können. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass es in den *S. aureus*-Überexpressionsstämmen durch die Anwesenheit des Induktors Xylose in einem OD₆₀₀-Bereich von 3 – 3,5 zu einer 45- bis

57-fachen *yycFG*-Überexpression von den Plasmiden kommt, es aber damit einhergehend nicht zu einem signifikanten Anstieg der chromosomalen *yycFG*-Transkripte kommt, ist der logische Schluss, dass die Autoregulation offensichtlich für *S. aureus* ausgeschlossen werden kann. Um diesen Sachverhalt zu verdeutlichen, muss man sich vergegenwärtigen, dass unter nicht-induzierenden Bedingungen der Anteil der chromosomalen *yycFG*-Kopien an der Gesamtanzahl zwischen 20 – 30 % beträgt und der Anteil unter induzierenden Bedingungen auf etwa 2 % abfällt, und damit etwa 98 % der *yycFG*-Transkripte dem vektoriiellen Ursprung zugeordnet werden können. Im Fall der Autoregulation hätte man aber erwartet, dass es als Feedback auf den massiven Anstieg der vektoriiellen *yycFG*-Transkripte auch zu einem deutlichen Anstieg in der Anzahl der chromosomalen *yycFG*-Transkripte kommt. Daraus folgt sehr klar, dass es in *S. aureus* zu keiner Autoregulation der *yycFG*-Expression durch das YycFG-TCS kommt, weder auf eine direkte noch eine indirekte Art und Weise.

4.1.2 Der Einfluss der YycFG-Aktivität auf die Pigmentierung

Aus *S. aureus* können 17 Pigmentverbindungen isoliert und aufgereinigt werden, bei denen es sich durchweg um Triterpen-Carotinoide mit einer C₃₀-Kette anstelle einer C₄₀-Kette, wie sie bei den meisten anderen Organismen gefunden wird, handelt (MARSHALL and WILMOTH, 1981a). Bereits relativ früh erfolgte die Charakterisierung von *S. aureus*-Mutanten, die Unterschiede in ihrer Pigmentzusammensetzung zeigten, was dazu genutzt wurde einen möglichen Biosyntheseweg für diese Triterpen-Carotinoide über das erste C₃₀-Intermediat 4,4'-Diapophyten (Dehydrosqualen) bis hin zum orangenen *S. aureus*-Hauptpigment Staphyloxanthin vorzuschlagen (MARSHALL and WILMOTH, 1981b). Staphyloxanthin steht dabei als Trivialname (MARSHALL and RODWELL, 1972) für die IUPAC-Bezeichnung α -D-Glucopyranosyl-1-O-(4,4'-Diaponeurosporen-4-*oat*)-6-O-(12-methyltetradecanoat) (B. WIELAND et al., 1994). Mit der genetischen Analyse des Biosynthese-Weges für Staphyloxanthin konnten nachfolgend die Gene *crtOPQMN* (SA2352 – SA2348) als Bestandteile eines Operons in *S. aureus* identifiziert werden, das stromaufwärts von *crtO* einen σ^B -abhängigen Promotor besitzt (B. WIELAND et al., 1994; PELZ et al., 2005). Ein funktionales *sigB*-Operon spielt in *S. aureus* nicht nur für die Synthese von Staphyloxanthin, sondern generell als Regulator für die Expression von Virulenzgenen eine wichtige Rolle (KULLIK et al., 1998). Im Zusammenhang mit der Staphyloxanthin-Biosynthese ist interessant, dass CspA (Cold-Shock Protein A; SA1234) in einem σ^B -abhängigen Mechanismus für die volle Ausprägung der Pigmentierung in *S. aureus* notwendig ist und

vermutlich als Transkriptions-Enhancer auf das *crt*-Operon einwirkt (KATZIF et al., 2005). Der in dieser Arbeit für die *yycFG*-Überexpression verwendete *S. aureus*-Stamm 8325-4 SH1000 zeichnet sich durch die Reparatur des *rsbU*-Gens aus und verfügt deshalb mit dem intakt exprimierten Positiv-Regulator RsbU, im Gegensatz zu seinem Elternstamm *S. aureus* 8325-4, wieder über ein vollständig funktionales *sigB*-Operon (HORSBURGH et al., 2002), was sich phänotypisch bereits durch seine intensive orange Pigmentierung bemerkbar macht. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von *yycFG* zu einer starken Verminderung der orangen Pigmentierung bei einer Inkubationstemperatur von 34 °C bzw. 37 °C führt, stellt sich die Frage inwieweit sich daraus ein möglicher regulatorischer Einfluss des YycFG-TCS auf das *sigB*-Regulon ableiten lässt. Ein Hinweis dafür könnte sein, dass in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt wurde, dass die durch die Überexpression von *yycFG* verursachte Verminderung der Pigmentierung bei einer Wachstumstemperatur von 42 °C bzw. 45 °C deutlich geringer ausfällt. Da bekannt ist, dass ein herbeigeführter Hitzeshock in *S. aureus* als Stress-Antwort innerhalb von wenigen Minuten zu einer Induktion der σ^B -Aktivität führt (SENN et al., 2005), ließe sich daraus schließen, dass der durch die *yycFG*-Überexpression bedingte Effekt, der zur verminderten Pigmentierung führt, zumindest partiell durch eine erhöhte σ^B -Aktivität kompensiert wird, was bedeuten könnte, dass das σ^B -System und das YycFG-TCS Gegenspieler sind. Neben einer möglichen Interaktion des YycFG-TCS mit den Rsb-Regulatoren (Transkription von σ^B) selbst, wäre es allerdings auch denkbar, dass das YycFG-TCS auf den putativen Transkriptions-Enhancer CspA des *crt*-Operons (KATZIF et al., 2005) hemmend einwirken könnte und damit in Opposition zu σ^B agieren würde.

Dass es zu einer verminderten Pigmentierung kommt, kann aber auch unter einem anderen Aspekt betrachtet werden. So könnte die verminderte Pigmentierung auch eine kompensatorische Reaktion auf die Überexpression von *yycFG* sein. In der Literatur wird bei *S. aureus* die Carotinoid-Produktion in Korrelation mit einer verminderten Membranfluidität gebracht (CHAMBERLAIN et al., 1991; XIONG et al., 1993). Dies könnte damit im Zusammenhang stehen, dass für *S. aureus* beschrieben wurde, dass eine Mutation in *yycF* zu einer erhöhten Temperaturempfindlichkeit führt, so dass bei der beschriebenen Mutante bei einer Temperatur über 40 °C kein Wachstum mehr erfolgen konnte und auch eine Hyperempfindlichkeit gegenüber ungesättigten langkettigen Fettsäuren bestand. Die Autoren folgerten daraus eine Beteiligung des YycFG-TCS an der „korrekten“ Zusammensetzung der Zellwand oder der Membran (MARTIN et al., 1999). Es ist also denkbar, dass das YycFG-TCS unter normalen Bedingungen dahingehend an der Stabilisierung der Membran beteiligt ist, dass es zur Verminderung der Fluidität beiträgt. Die Überexpression von *yycFG* würde dann

die Membranfluidität unter normalen Bedingungen (hier: 34 °C bzw. 37 °C) zu stark herabsetzen. Da die Zelle auf die induzierte *yycFG*-Überexpression selbst nicht einwirken kann, würde folgerichtig die Ausprägung von Faktoren, die die Membranfluidität zusätzlich herabsetzen, wie z.B. die Produktion der Carotinoide, vermindert. Da bei höheren Temperaturen (hier: 42 °C bzw. 45 °C), wieder eine erhöhte Stabilisierung der Membran notwendig wäre, würde dies auch erklären warum – wie beobachtet – wieder vermehrt Carotinoide gebildet wurden. Auch wenn die Carotinoide einen Beitrag zur Stabilisierung der Membran leisten, so ist der letztendlich entscheidende Einfluss auf die Fluidität der Membran aber sicherlich in deren Zusammensetzung aus den einzelnen Phospholipiden selbst zu suchen. Dabei ist als allgemeine Tatsache anerkannt, dass über die Kettenlänge der einzelnen Fettsäurereste bzw. deren Sättigung die Fluidität entscheidend beeinflusst wird. In Bezug auf die Membranfluidität bei *S. aureus* konnte allerdings noch nicht gezeigt werden, dass das YycFG-TCS auf die Expression einzelner Gene, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind, einwirkt. Für das orthologe *yyc*-Operon von *Streptococcus pneumoniae* hingegen konnte zumindest ein regulatorischer Einfluss von YycF auf die bei der Synthese beteiligten *fab*-Gene demonstriert werden, auch wenn dies in der Zusammensetzung der Fettsäuren der Membran nicht zu großen Veränderungen führte, verbleiben zumindest Hinweise darauf, dass das YycFG-TCS in *S. pneumoniae* zur Aufrechterhaltung der Membranintegrität dient (MOHEDANO et al., 2005; NG et al., 2005).

4.1.3 Staphyloxanthin als Antioxidans und Virulenzfaktor

Staphyloxanthin, das orange Triterpen-Carotinoid ist als Hauptpigment zusammen mit seinen Biosynthesestufen für die charakteristische und namensgebende Pigmentierung von *S. aureus* verantwortlich (MARSHALL and WILMOTH, 1981a). Es ist eine bekannte Tatsache, dass Carotinoide eine Wirkung als Antioxidans besitzen und es wurde bereits vor einigen Jahren vorgeschlagen, dass Staphyloxanthin auch *S. aureus* vor oxidativem Stress schützen kann (LANG et al., 2000). In diesem Zusammenhang kommt Staphyloxanthin auch eine Wirkung als Virulenzfaktor zu. So konnte gezeigt werden, dass bei *S. aureus* eine $\Delta crtM$ -Mutante mit defekter Staphyloxanthin-Synthese sich gegenüber dem Wildtyp durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem sogenannten „oxidant killing“ in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid bzw. Singulett-Sauerstoff, eine geringere Überlebensrate in Anwesenheit von humanen Neutrophilen und durch eine geringere Pathogenität in einem Maus-Modell (subkutaner Abszess) unterscheidet (G. Y. LIU et al., 2005). Dies alles spricht dafür, dass

S. aureus das Pigment Staphyloxanthin nutzen kann, um den Oxidans-basierten Mechanismen des angeborenen Immunsystems zu widerstehen. Die Bedeutung von Staphyloxanthin als Virulenzfaktor wird durch eine weitere Studie unterstrichen, in der ebenfalls eine *crtM*-Mutante und ihr Wildtyp bezüglich der Interaktion von Staphyloxanthin mit hochreaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) untersucht wurden. Dort konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die weniger stark pigmentierte Mutante deutlich empfindlicher gegenüber ROS wie z.B. Wasserstoffperoxid, Superoxid-Anionen, Hydroxylradikalen, Hydrochlorid und der Abtötung durch Neutrophile war (CLAUDITZ et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich die phänotypisch stark verminderte Pigmentierung bei 37 °C, welche aus der induzierten Überexpression von *yycFG* in *S. aureus* resultiert, auf die Empfindlichkeit gegenüber Methylviologen (MV; aka Paraquat) auswirkt. Durch die katalytische Wirkung von MV kommt es dabei in Anwesenheit von O₂ zur Bildung von ROS. Diesen Mechanismus macht man sich generell zu Nutze, um die Auswirkungen von oxidativem Stress auf Zellen zu untersuchen (BUS and GIBSON, 1984). Zu erwarten wäre gewesen, dass die verminderte Pigmentierung bei *yycFG*-Überexpression zu einer erhöhten Empfindlichkeit von *S. aureus* in Anwesenheit von MV führt, da weniger Staphyloxanthin als Antioxidans verfügbar ist. Das konnte aber auch in Abhängigkeit von der Zellzahl, durch Ausplattierung verschiedener Verdünnungsstufen, nicht beobachtet werden. In der Literatur ist bei *Streptococcus mutans* ein Zusammenhang zwischen dem orthologen *yyc*-Operon und oxidativen Stress widersprüchlich beschrieben. In *Streptococcus* ist von den Genen *yycFGJ* (*vicRKX*) des orthologen 3-cistronischen *yyc*-Operons nur das Gen *yycF* (*vicR*), das für den Response-Regulator YycF codiert, essentiell (SZURMANT et al., 2005) und bei einer YycG-Knock-Out-Mutante wurde im Vergleich zum Wildtyp beobachtet, dass diese empfindlicher gegenüber Wasserstoffperoxid ist, was u.a. zur Schlussfolgerung führte, dass das YycFG-TCS in *S. mutans* auf oxidativen Stress anspricht und so auch das Bakterium vor diesem schützen kann (DENG et al., 2007). Eine weitere Studie mit einem *yycJ* (*vicX*) Knock-out in *S. mutans* zeigte im Vergleich zum Wildtyp ein vermindertes Wachstum der Mutante in Anwesenheit von MV, was die Autoren schließen ließ, dass das YycJ (VicX) Protein eine Rolle bei der Toleranz gegenüber von oxidativen Stress spielt (SENADHEERA et al., 2007). Dem gegenüber steht allerdings eine neuere Studie, die ebenfalls mit einer Knock-Out-Mutante von *yycG* in *S. mutans* arbeitete, deren Ergebnisse aber keinen Hinweis darauf lieferten, dass die Mutante empfindlicher gegenüber oxidativem Stress oder Superoxid-Anionen ist (I. BISWAS et al., 2008). Die Tatsache, dass in dieser Arbeit für *S. aureus* beobachtet werden konnte, dass die *yycFG*-Überexpression zu einer verminderten Bildung von Staphyloxanthin führte, aber nicht

– wie erwartet – mit einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Stress einhergehend, könnte darauf hindeuten, dass möglicherweise nur die letzten Syntheseschritte zum Staphyloxanthin blockiert sind und deshalb ein Schutzeffekt durch die synthetisierten Vorstufen, bei denen es sich ebenfalls um Carotinoide handelt, erhalten bleibt. Eventuell kommt es durch die *yycFG*-Überexpression aber auch zu anderen kompensatorischen Effekten. Der Einfluss des YycFG-TCS auf die Pigmentierung verbleibt damit unter dem Aspekt der Resistenzentwicklung für die anti-infektive Therapie in diesem Zusammenhang interessant. So wird die Synthese von Staphyloxanthin nicht nur als ein mögliches Ziel für die Bekämpfung von Infektionen durch *S. aureus* angesehen (G. Y. LIU et al., 2005), sondern könnte auch einen konkreten Therapieansatz bieten. Für die Dehydrosqualen-Synthase CrtM (B. WIELAND et al., 1994) konnte jüngst, bedingt durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zur humanen Squalen-Synthase (SQS), mit einem SQS-Inhibitor der Cholesterinbiosynthese, auch in *S. aureus* eine Inaktivierung gezeigt werden (C. I. LIU et al., 2008). Die Aufklärung der Rolle des *yyc*-Operon von *S. aureus* bei der Pigmentierung verbleibt also eine interessante Aufgabenstellung.

4.1.4 Die *S. aureus*-Biofilmbildung und das YycFG-System

Die Befähigung zur Biofilmbildung bei *S. aureus* ist ein multifaktorieller Prozess und in zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass es mindestens zwei Mechanismen zur Biofilmbildung in *S. aureus* gibt (O'GARA, 2007). Bei dem einen ist die Produktion eines extrazellulären Polysaccharids, dem sogenannten „polysaccharide intercellular adhesin“ (PIA), einem Polymer aus N-Acetyl-Glucosamin (PNAG), notwendig, wobei für die PIA-Produktion dem *ica*-Gencluster eine entscheidende Funktion zugeordnet wurde (CRAMTON et al., 1999). So konnten bei vielen *S. aureus*-Stämmen mit fehlender Biofilmbildung zahlreiche Mutationen im *ica*-Gencluster nachgewiesen werden (TU QUOC et al., 2007). In späteren Studien kristallisierte sich ein zweiter Mechanismus heraus, da bei einigen *S. aureus*-Stämmen gezeigt werden konnte, dass Mutationen im *ica*-Gencluster nicht zu einer Verminderung der Biofilmbildung führten und so ein *ica*-unabhängiger Mechanismus der Biofilmbildung aufzeigt werden konnte (O'GARA, 2007). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass jüngst gezeigt wurde, dass auch σ^B eine entscheidende Rolle bei der *ica*-unabhängigen Biofilmreifung in *S. aureus* zu kommt (LAUDERDALE et al., 2009). Bezüglich der Biofilmbildung bei *Streptococcus mutans* konnte desweiteren auch eine Abhängigkeit vom *yycFGJ*- (*vicRKX*-) Operon demonstriert werden. So zeigte eine *yycG*-Deletionsmutante,

im Vergleich zum glatten Biofilm des Wildtyps, eine deutliche Abweichung in der Biofilmausprägung, die sich darin äußerte, dass dieser deutlich rauer und klumpiger war (SENADHEERA et al., 2005). Ebenfalls bei *S. mutans*, wurde bei einer *yycJ*-Deletionsmutante beobachtet, dass die Dichte des Biofilms im Vergleich zum Wildtyp deutlich zunahm (SENADHEERA et al., 2007). In weiteren Studien konnte der Einfluss des *yyc*-Operons in *S. mutans* auf die Biofilmbildung weiter aufgeklärt werden. So wurde bei einer *yycG*-Disruptionsmutante ebenfalls eine verstärkte Biofilmbildung beobachtet und ferner konnte gezeigt werden, dass in *S. mutans* die Expression des zum *AtlA*-Autolysin orthologen OFRs (SMu0630) positiv durch den stromaufwärts gelegenen ORF SMu0629 beeinflusst wird, welcher seinerseits unter der Kontrolle des *YycFG*-TCS steht (AHN and BURNE, 2007). Knock-Outs beider ORFs führten zur verstärkten Biofilmbildung in *S. mutans*, was den Zusammenhang bestätigte (AHN and BURNE, 2007). Auch in *S. aureus* konnte die Abhängigkeit der Biofilmbildung vom Autolysin *AtlA* gezeigt werden (R. BISWAS et al., 2006), was darauf beruht, dass auch die Expression von *atlA* in *S. aureus* vom *YycFG*-TCS positiv reguliert wird, was sich deshalb wahrscheinlich auch in diesem Organismus positiv auf die Biofilmbildung auswirkt (DUBRAC et al., 2007). Die Beteiligung von weiteren Murein-Hydrolasen (Autolysinen) bei der Biofilmbildung in *S. aureus* konnte in weiteren Studien gezeigt werden (R. BISWAS et al., 2006; RICE et al., 2007). Auch wenn in der Literatur eine Beteiligung von *yyc*-Operons an der Biofilmbildung beschrieben wird, konnte in der vorliegenden Arbeit, trotz der nachweislich massiven Überexpression von *yycFG*, kein Effekt auf die Biofilmbildung von *S. aureus* unter aeroben, O₂-limitierten (7 % CO₂) und anaeroben Bedingungen beobachtet werden. An der grundsätzlichen Befähigung des verwendeten *S. aureus*-Stammes zur Biofilmbildung kann dies nicht liegen, da in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass der hier für die Überexpression von *yycFG* verwendete Wirtstamm 8325-4 SH1000 (SH1000) einen *ica*-unabhängigen Biofilm produziert, der nicht aus PIA besteht, dafür aber proteinogene Eigenschaften zeigte (BOLES and HORSWILL, 2008; LAUDERDALE et al., 2009). Die grundsätzliche Befähigung des SH1000-Stammes zur Biofilmbildung konnte ferner auch bei der in dieser Arbeit verwendeten Positivkontrolle gezeigt werden. Bei dieser Positivkontrolle, die eine massive Biofilmbildung zeigte, handelt es sich um eine nicht näher charakterisierte Mutante des Stammes 8325-4 SH1000pTvicRK(Y306N), bei der die Biofilmbildung allerdings nicht auf die Überexpression von *yycFG* zurückzuführen war. Dies zeigte sich daran, dass die Biofilmbildung von der An- oder Abwesenheit von Xylose als Induktor der Überexpression unberührt blieb. Eine Sequenzierung der chromosomalen *yycFG*-Loci ergab auch keine Abweichungen zu der

Sequenz des Elternstamms. Die extreme Biofilmbildung ist deshalb höchst wahrscheinlich auf eine Hintergrundmutation in diesem Klon zurückzuführen, die es noch zu charakterisieren gilt. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit mit dem normalen SH1000-Hintergrund keine *yycFG*-abhängige Biofilmbildung in *S. aureus* gezeigt werden konnte, kann mehrere mögliche Ursachen haben. Ein Grund könnte die *yycFG*-Überexpressionsrate selbst sein, da diese mindestens das 52-fache betrug und damit möglicherweise zu hoch war um einen Effekt beobachten zu können. So wurde zum Vergleich bei DUBRAC et al. (2007) die graduelle Steigerung der Biofilmbildung bei *S. aureus* in einem Bereich bis zu einer maximal 6-fachen Überexpression gezeigt. Für die Situation einer massiven Überexpression liegen also in der Literatur keine vergleichbaren Daten vor. Obwohl, wie weiter oben in aller Kürze dargelegt, für die Befähigung zur Biofilmbildung durch *S. aureus* multiple genetisch Voraussetzungen gegeben sein müssen, könnte der hier aufgezeigte Unterschied in der *yycFG*-abhängigen Biofilmbildung bei *S. aureus* auch darin begründet liegen, dass der in dieser Arbeit verwendete Stamm 8325-4 SH1000 (SH1000) durch die Reparatur des *rsbU* Gens einen *sigB*-positiven Phänotyp besitzt (HORSBURGH et al., 2002), während der von DUBRAC et al. (2007) verwendete Wirtsstamm ST1000 ein Derivat mit dem genetischen Hintergrund des *S. aureus*-Stammes RN4220 ist (DUBRAC et al., 2007). Der Stamm RN4220 wurde durch chemische Mutagenese (KREISWIRTH et al., 1983) vom Prophagen-kurierten Stamm 8325-4 (NOVICK, 1967) abgeleitet, der einen defekten *rsbU*-Locus und damit eine *sigB*-negativen Phänotyp besitzt (HORSBURGH et al., 2002). Es ist deshalb naheliegend, dass es sich auch bei dem bei DUBRAC et al. (2007) beobachteten Biofilm, der in Abhängigkeit des YycFG-TCS und der akzessorischen Yyc-Proteine gebildet wurde, um eine *ica*-unabhängige Erscheinung handelt, deren Ausbildung scheinbar durch den *sigB*-negativen Phänotyp begünstigt wurde. Um dies allerdings abschließend bewerten zu wollen, müssten aber wesentlich mehr Daten vorliegen, da insbesondere an der *ica*-unabhängigen Biofilmbildung einige sehr komplexe regulatorische Systeme beteiligt sind. Am besten charakterisiert sind dabei die beiden globalen Regulatorsysteme *agr* (accessory gene regulator) und *sarA*. Von beiden Regulatoren weiß man, dass sie die Anheftung an Oberflächen in Opposition zueinander modulieren. So ist SarA notwendig für die Anheftung, während das *agr*-System über die Regulation der Protease-Aktivität die Mechanismen zur Ablösung kontrolliert (LAUDERDALE et al., 2009). Komplizierend kommt hinzu, dass es so scheint, als ob die Transkription von einigen Regulatoren, wie *sae*, *sarA* und *sigB* nicht nur in Abhängigkeit von der Anwesenheit von O₂, steht, sondern auch von Stamm zu Stamm bei *S. aureus* abweichen kann (STER et al., 2005). Welche letztendliche Rolle also das YycFG-TCS in der Biofilmbildung, insbesondere bei

S. aureus, spielt, verbleibt also unklar. Insgesamt deutet sich jedoch an, dass es eher eine untergeordnete Rolle spielt, die sich lediglich darin äußert, dass es einen positiv regulatorischen Effekt auf die Autolysine wie IsaA und SceD hat, die ihrerseits mit zum Biofilm-Phänotyp beitragen (DUBRAC et al., 2007; STAPLETON et al., 2007).

4.1.5 Die Rolle des YycFG-TCS in der Antibiotikaresistenz

Dass ein Zusammenhang zwischen dem YycFG-TCS und der Resistenz bzw. der verminderten Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika besteht, wurde bereits in mehreren Arbeiten aufgezeigt. So konnten wir zeigen, dass die Überexpression von *yycFG* in *S. aureus* zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin führt und die IS256-bedingte Überexpression von *yycFG* in dem klinischen *S. aureus*-Tracheal-Isolat SA137/93A (TÜRCK, 2004) dabei einen Beitrag zum VISA-Phänotyp dieses Stamms (JANSEN et al., 2007) leistet. In Bezug auf die Resistenz gegenüber dem Lipopeptid-Antibiotikum Daptomycin bei *S. aureus* gibt es mehrere interessante Berichte in der Literatur. So konnten bei einigen Stämmen, die in Anwesenheit von sublethalen Konzentrationen von Daptomycin inkubiert wurden, u.a. Punktmutationen in dem Genlocus für *yycG* identifiziert werden, die mit einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin einhergingen. In der gleichen Studie wurde auch ein Befund vorgestellt, bei dem in einem Daptomycin-unempfindlichen klinischen *S. aureus*-Isolat eine Nukleotid-Insertion in *yycG* gefunden wurde, die zu einem Frameshift führte (FRIEDMAN et al., 2006). In einer weiteren Literaturstelle wird mit *yycH* ein weiteres Mitglied des *yyc*-Operons von *S. aureus* in den Zusammenhang mit einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin und Vancomycin gebracht, weil dort bei einem weniger empfindlichen Klon eine Punktmutation verursacht, dass ein Stopp-Codon in der Sequenz von *yycH* entsteht, so dass nach der Transkription nur 10 % der Nukleotidsequenz translatiert werden (MWANGI et al., 2007). Ein weiteres Beispiel für einen *S. aureus*-Stamm mit verminderter Resistenz gegenüber Vancomycin und Daptomycin ist das klinische Isolat VISA-BRAGA, das nach einem chirurgischen Eingriff aus einer Wundinfektion isoliert wurde (GARDETE et al., 2008a) und Punktmutationen in *yycF* und *vraR* besitzt, die in den Response-Regulatoren YycF und VraR zu Aminosäureaustauschen führen (GARDETE et al., 2008b). Tatsächlich ist der Wirkmechanismus von Daptomycin, obwohl es bereits im klinischen Einsatz ist, noch nicht vollständig aufgeklärt. So weiß man zwar, dass die bakterizide Aktivität von Daptomycin in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen steht und mit einer Depolarisierung der Membran korreliert (SILVERMAN et al., 2003), es

dabei aber nicht zur Lyse der Zellen kommt (COTRONEO et al., 2008). Es wurde auch beobachtet, dass Daptomycin zu einer anormalen Septenbildung bei der Zellteilung führt (COTRONEO et al., 2008). In einer weiteren Studie wurde anhand von Transkriptom-Profilen gezeigt, dass Daptomycin zur Induktion von Genen des Zellwand-Stress-Stimulons in *S. aureus* führt und die Autoren schlussfolgerten, dass als Wirkungsweise neben der Depolarisierung der Membran eine direkte oder indirekte Inhibierung der Peptidoglykansynthese vorliegen muss (MUTHAIYAN et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte bei der MHK-Bestimmung gezeigt werden, dass die Überexpression von *yycFG* zu einer leichten Verminderung der Empfindlichkeit gegenüber von Daptomycin führte. Diese Verminderung der Empfindlichkeit könnte im Zusammenhang mit der unter Punkt 4.1.2 diskutierten Verringerung der Membranfluidität durch die *yycFG*-Überexpression stehen. So wurde jüngst in diesem Zusammenhang beschrieben, dass eine *in vitro*-Selektion in Anwesenheit von Daptomycin bei einem Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stamm auch zu einer Verminderung der Membranfluidität führte, die so einen Beitrag zur Daptomycin-Resistenz leisten könnte (MISHRA et al., 2009). Bezüglich des Wirkmechanismus von Daptomycin wird in einer ebenfalls aktuellen Veröffentlichung sogar über einen dualen Wirkmechanismus von Daptomycin spekuliert, der sowohl in einer Störung der Membranfunktion, als auch in einer Inhibierung der YycFG-vermittelten Signal-Transduktion besteht und damit YycG als mögliche Zielstruktur von Daptomycin in den Fokus rückt (BALTZ, 2009). Inwieweit eine tatsächliche Inhibierung von YycG *in vitro* erfolgen kann, wurde aber mit dem in dieser Arbeit etablierten Phospholipid-Liposomen Modell und den funktional rekonstituierten Kinasen YycG und YycG(Y308N) noch nicht getestet. Allerdings könnte eine direkte Inhibierung der YycG-Kinase erklären, warum die massive Überexpression bei der MHK-Bestimmung zu der beobachteten schwachen Verminderung der Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin führte.

An dieser Stelle ist auch erwähnenswert, dass in der Literatur auch der umgekehrte Fall, also eine Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika unter Beteiligung des YycFG-TCS beschrieben ist. So führte eine Mutation in *yycF* von *S. aureus* neben einer erhöhten Temperaturempfindlichkeit, auch zu einer Hyperempfindlichkeit gegenüber MLS_B- (Makrolid-Lincosamid-Streptogramin B) Antibiotika (MARTIN et al., 1999). Später konnte gezeigt werden, dass dieser Phänotyp durch die Überexpression von *ssaA* auf das Empfindlichkeitslevel des Wildtyps restauriert werden konnte (MARTIN et al., 2002). Zu bemerken ist hier, dass SsaA (secretory antigen; Locus-Tag bei *S. aureus* N315: SA2093) mit

zum YycFG-Regulon (DUBRAC and MSADEK, 2004) gehört, eine CHAP (Cystein, Histidin-abhängige Aminohydrolase (Peptidase) Amidase-Domäne und damit eine mögliche Peptidoglykan-Hydrolase-Aktivität besitzt (DUBRAC et al., 2007). Auch bei *S. mutans* ist eine Mutante beschrieben, die durch die Deletion von *yycG* im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cefotaxim, Cefuroxim, Ceftazidim, Meropenem, Mezlocillin, Penicillin und Trimethoprim zeigte (I. BISWAS et al., 2008). Aus diesen zahlreichen Arbeiten und Befunden lässt sich also feststellen, dass das YycFG-TCS in Bezug auf die Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika, die Zielstrukturen im Rahmen der Zellwandbiosynthese besitzen, auch zukünftig eine bedeutende Rolle spielen wird.

4.2 Charakterisierung des YycFGHI-Systems auf Proteinebene

Obwohl das System zur Überexpression von *yycFG* für die Charakterisierung des YycFG-TCS in *S. aureus* einige interessante Ergebnisse, wertvolle Hinweise über die Funktion und entscheidende Denkanstöße für die weitere Erforschung dieses essentiellen regulatorischen TCS hervorgebracht hat, wurden doch auch einige Nachteile dieser rein phänotypischen Untersuchungen deutlich. Die beiden essentiellen Gene *yycF* und *yycG* sind zwar unbestreitbar die Hauptkomponenten dieses regulatorischen Systems, da sie das TCS selbst ausmachen, aber dabei wird den beiden auxiliären Genen *yycH* und *yycI* zu wenig Beachtung geschenkt. Hierbei sind insbesondere die möglichen regulatorischen Prozesse wichtig, die innerhalb des YycFGHI-Systems von diesen beiden Genen ausgehen könnten und direkt auf die YycG-Sensor-Histidin-Kinase einwirken, die das Herzstück der Wahrnehmung und Antwort auf eintreffende Signale darstellt. Den auxiliären Proteinen YycH und YycI könnte in diesem Rahmen deshalb eine Art Schrittmacherfunktion bei der Signaltransduktion und Prozessierung zu kommen, die es zukünftig näher zu untersuchen gilt.

Diese Detailuntersuchungen vermag das Überexpressionssystem nicht zu leisten, sondern sie können nur durch die direkte Analyse der Interaktionen zwischen diesen Proteinen näher bestimmt werden. Entscheidende Schritte, die die Untersuchung dieser Vorgänge im Detail *in vitro* ermöglichen, umfassten dabei in dieser Arbeit: I) die erstmalig erfolgreich beschriebene rekombinante Expression der vollständigen Proteine (einschließlich der N-terminalen Transmembran-Domänen) des *S. aureus* YycFGHI-Systems in *E. coli*, II) die Darstellung der Befähigung von einzelnen der rekombinanten YycFGHI-Proteine zur Ausbildung einer höheren oligomeren Organisation, III) die Etablierung eines Detergenz-Mizellen-Modells als Basis für die Ausprägung der vollen *in vitro*-Phosphorylierungs-

aktivitäten der YycG- bzw. YycG(Y308N)-Kinase und IV) die auf Punkt III aufbauende funktionale Rekonstitution der YycG- und YycG(Y308N)-Kinase in Liposomen zur Etablierung eines Phospholipid-Liposomen-Modells, das durch eine artifizielle Membran auch den Eigenschaften der YycGHI-Proteine als Membranproteine gerecht werden kann und so erst die volle Ausprägung aller strukturellen Eigenschaften der Proteine erlaubt, die höchst wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei deren Interaktion spielen.

4.2.1 Regulation der YycG-Kinase durch die auxiliären Proteine YycH & YycI

Für das auxiliäre YycH-Protein von *Bacillus subtilis* wurde gezeigt, dass es auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert ist und dass eine Deletion von *yycH* zu Wachstums- und Zellwanddefekten führte, die auf eine Überaktivität des YycFG-TCS hindeuteten. Dies ließ die Autoren schlussfolgern, dass YycH ein negativer Regulator der Aktivität der YycG-Histidin-Kinase ist (SZURMANT et al., 2005). Die Aufklärung der Kristallstruktur von YycH brachte interessante Einblicke in die Topographie von YycH, unter anderem wurde eine putative N-terminale Ca^{2+} -Bindestelle gefunden, die möglicherweise die Interaktion von YycH mit einem anderen Protein über die Koordinierung zu einem O-Atom verstärken könnte (SZURMANT et al., 2007a). Die Ergebnisse der gleichen Studie ergaben auch, dass das auxiliäre YycI-Protein ebenfalls außerhalb des Cytoplasmas lokalisiert ist, und mittels „bacterial two-hybrid“ Untersuchungen wurde ferner gezeigt, dass die beiden Proteine YycH und YycI sowohl alleine, als auch zusammen mit YycG interagieren, so dass die YycGHI-Proteine zusammen einen ternären Komplex bilden können (SZURMANT et al., 2007a). Zusammen legen alle Ergebnisse der Studie eine gemeinsame negative Regulation von YycG durch YycH und YycI nahe (SZURMANT et al., 2007a). Unterstützt wird dieser Befund durch die Kristallstrukturen von YycH und YycI aus *B. subtilis* (SZURMANT et al., 2006; SANTELLI et al., 2007). Erstaunlicherweise zeigten nämlich die YycHI-Proteine trotz einer geringen Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz strukturelle Übereinstimmungen in der Topographie von zwei Domänen (SANTELLI et al., 2007). Während das trunkierte YycH (39 – 458) als Monomer vorlag (SZURMANT et al., 2007a), kristallisierte das ebenfalls trunkierte YycI (31 – 280) als Dimer aus, was mit dem Verhalten von YycI, welches in der nativen Gelelektrophorese beobachtet wurde, einherging (SANTELLI et al., 2007). Für die Dimerisierung von YycI wurde dabei anhand der Kristallstruktur eine putative Ligandenbindestelle, die wahrscheinlich von einem Chlorid-Ion besetzt wird, als notwendig vorgeschlagen (SANTELLI et al., 2007). Der aktuellste Kenntnisstand schlägt für die

Interaktion der orthologen YycGHI-Proteine in *B. subtilis* ein oktameres Modell vor, bei dem die Interaktion der Proteine nahezu vollständig über deren Transmembran- (TM-) Domänen erfolgt und sich wie folgt gestaltet: jeweils zwei YycG-Dimere lagern sich zusammen und während je ein YycI-Monomer direkt mit einem YycG Dimer interagiert, vermittelt das jeweilige YycI-Monomer indirekt die Interaktion eines YycH-Monomers mit dem YycG-Dimer (SZURMANT et al., 2008). Diese Interaktion über die TM-Domänen beim Oktameren-Modell stellt sich vereinfachend und schematisch ausgedrückt so dar: $H \leftrightarrow I \leftrightarrow G_2 \leftrightarrow G_2' \leftrightarrow I' \leftrightarrow H'$. Inwieweit dieses Modell die tatsächliche Situation darstellt und inwieweit es auch Gültigkeit für *S. aureus* hat, ist diskutabel. In der vorliegenden Arbeit konnte weder durch das Crosslinking noch durch die BN-PAGE eine Interaktion zwischen den verschiedenen Yyc-Proteinen selbst gezeigt werden. Dies ist jedoch wahrscheinlich auf die schwächeren Bindungskräfte zurückzuführen, die bei den heterogenen Protein-Protein-Interaktionen im Gegensatz zu homogenen Protein-Protein-Interaktionen auftreten, weshalb erstere insbesondere in der BN-PAGE nicht dargestellt werden konnten. Durch die BN-PAGE konnte aber eindrucksvoll gezeigt werden, dass die einzelnen, vollständig exprimierten Yyc-Proteine zur einer höheren oligomeren Organisation befähigt sind. So konnte hier beobachtet werden, dass sich die YycG-Kinase bis hin zu Tetrameren organisierte, und dass das YycH-Protein lediglich als Monomer in Erscheinung tritt. Soweit zu den Übereinstimmungen mit den Literaturbefunden. Für das YycI-Protein zeigte sich jedoch ein sehr unerwartetes Bild, da dieses eine oligomere Organisation bis hin zum Hexamer zeigte. Dies könnte auch Auswirkungen für das beschriebene Oktamer-Modell und die dort vorgeschlagene Interaktion der putativen, negativen Regulatoren YycH und YycI mit der YycG-Kinase (SZURMANT et al., 2008) haben. So könnte die Interaktion wesentlich dynamischer ausfallen als dort vorgeschlagen ist. Insbesondere unter der Prämisse, dass die Regulatoren auch eine Rolle bei der Erkennung und Prozessierung von möglichen Signalen spielen, wie in der Literatur an mehreren Stellen angedeutet oder vorgeschlagen (SZURMANT et al., 2005; SANTELLI et al., 2007; SZURMANT et al., 2007a; SZURMANT et al., 2008), würden sich so zahlreiche Möglichkeiten in der Modulation der Kinase-Aktivität ergeben. Dabei könnte die Befähigung des YycI-Proteins, mehrere oligomere Formen zu bilden, ein Ausdruck eines möglichen Fine-Tunings sein. So ist es denkbar, dass je nach Organisationsstufe des YycI-Proteins die indirekte Interaktion von YycH mit der YycG-Kinase, welche von YycI im Oktamer-Modell vermittelt wird, erschwert oder sogar vollständig unterbunden wird. Andererseits könnte YycI, wenn es eine höhere Organisationsstufe einnimmt, auch den Weg für eine direkte Interaktion zwischen YycH und YycG frei machen. Dies alles könnte wiederum in

Abhängigkeit von der An- bzw. Abwesenheit von einem oder mehreren Signalen und unter Umständen auch in Abhängigkeit der Signalintensität(en) sein. Eine direkte Interaktion der YycGHI-Proteine, die sich auf die Aktivität der YycG-Kinase auswirkt, konnte im *Bacillus*-System aber noch nicht gezeigt werden. Auch mit dem in dieser Arbeit etablierten Detergenz-Mizellen-Modell ist dies für die YycGHI-Proteine von *S. aureus* nicht geglückt, was aber damit zusammenhängt, dass dieses Modell den Eigenschaften von YycGHI als Membranproteine nicht genug Rechnung trägt. Die TM-Domänen dieser Proteine werden aber bei *B. subtilis* als unabdingbare Mediatoren der Interaktion angesehen (SZURMANT et al., 2008). Das ebenfalls in dieser Arbeit etablierte Phospholipid-Liposomen-Modell bietet mit seiner artifiziellen Membran dahingehend genau die richtigen Bedingungen um diese über die TM-Domänen vermittelte Interaktion zwischen den YycGHI-Proteinen zu charakterisieren und konnte sich durch die Demonstration der funktional rekonstituierten Kinasen YycG und YycG(Y308N) bereits jetzt als geeignetes Werkzeug auszeichnen.

4.2.2 Mögliche Signale der YycG-Sensor-Histidin-Kinase

4.2.2.1 Osmotischer Stress

In Bezug auf mögliche Signale der Sensor-Histidin-Kinase YycG ist eine interessante Auffälligkeit, die in dieser Arbeit für die vollständig exprimierten Kinasen YycG und YycG(Y308N) in den Phosphorylierungsassays festgestellt werden konnte, dass die Kinasen für die volle Ausprägung ihrer Phosphorylierungsaktivitäten, insbesondere für die initiale Autophosphorylierung, die Anwesenheit von sehr hohen Salzkonzentrationen (KCl) benötigen. Für die KCl-Konzentration konnte dabei festgestellt werden, dass diese für eine gute Aktivität höher 200 mM sein muss und dass ein Maximum der Kinaseaktivität zwischen 500 mM und 600 mM zu beobachten ist. Dies steht im krassen Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen trunkierten YycG⁻-Kinasen, die ohne ihre beiden N-terminalen Transmembran-Domänen (TM-Domänen) exprimiert und in Phosphorylierungsassays eingesetzt wurden. Bei den entsprechenden Literaturstellen sind für die orthologen YycG⁻-Kinasen von *S. aureus* und *B. subtilis* Salzkonzentration (KCL) von 50 mM oder 200 mM in den Phosphorylierungsassays beschrieben (YAMAMOTO et al., 2001; HOWELL et al., 2003; DUBRAC and MSADEK, 2004). Es scheint also möglich, dass bei den in dieser Arbeit vollständig exprimierten Kinasen die erhöhte KCl-Konzentration über die TM-Domänen zumindest im Detergenz-Mizellen-Modell einen triggernden Effekt auf die Aktivität der YycG- und YycG(Y308N)-Kinase ausüben könnte. Dem scheint zu widersprechen, dass im

Phospholipid-Liposomen-Modell die native Kinase YycG, nach der Rekonstitution in die Liposomen, im direkten Vergleich zu der mutierten Kinase YycG(Y308N) eine deutlich geringere Aktivität zeigte, was einen per se triggernden Effekt der KCL-Konzentration unwahrscheinlicher erscheinen lässt. Weitergehende Untersuchungen zu der Salzkonzentration im Phospholipid-Liposomen-Modell wurden allerdings nicht durchgeführt, könnten aber diesbezüglich Aufklärung bieten. So würde es sich anbieten, z.B. einen Konzentrationsgradienten zwischen dem inneren und äußeren Puffer der Proteoliposomen zu nutzen, um zu untersuchen, ob die YycG-Kinase von *S. aureus* auch bei der Wahrnehmung von osmotischem Stress beteiligt ist. In diesem Zusammenhang ist für das orthologe YycFG-TCS von *Streptococcus pyogenes* (Gruppe A *Streptococcus*, GAS) beschrieben, dass eine Mutation in *yycF* zu einem Phänotyp führte, der vergleichbar war mit dem Phänotyp einer *yycG*-Deletionsmutante, was auf eine verminderte Aktivität, genauer gesagt auf eine fast vollständige Inaktivierung von YycF in der Mutante hindeutete (M. LIU et al., 2006). Dies führte in der gleichen Studie zu einer verstärkten Expression der Gene *spy0183* und *spy0184*, die für den Transporter von kompatiblen Soluten („osmoprotectants“) OpuA codieren. In Übereinstimmung mit diesen Mikroarray-Daten konnte auch eine verstärkte Aufnahme der kompatiblen Solute Betain und Prolin und eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber osmotischem Stress verzeichnet werden (M. LIU et al., 2006). In diesem Zusammenhang, also bezüglich der Wahrnehmung von osmotischen Stress und die Reaktion darauf, ist sehr interessant, dass bei Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt in der Gruppe der Actinobakterien, die die industriell relevanten Gattung *Streptomyces* und *Corynebacterium* bzw. die medizinisch bedeutenden Gattungen *Mycobacterium* und ebenfalls *Corynebacterium* beinhaltet, mit MtrAB ein TCS beschrieben ist, dass einige Eigenschaften mit dem YycFG-TCS der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt gemeinsam hat (WINKLER and HOCH, 2008). So spielen die zu MtrAB orthologen Systeme z.B. eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der normalen Zellteilung und der Synthese der Zellwand (WINKLER and HOCH, 2008). Für *Corynebacterium glutamicum* ist aber auch beschrieben, dass die Sensor-Histidin-Kinase MtrB eine Rolle bei Wahrnehmung von osmotischem Stress spielt, und dass das MtrAB-TCS an der Regulation der Gene *betP* und *proP* beteiligt ist, die für Transporter der kompatiblen Solute Betain und Prolin codieren (MÖKER et al., 2004; MÖKER et al., 2007). Eine alternative – wesentlich simplere – Erklärung für die hohe Salzkonzentration, die im Detergenz-Mizellen-Modell für die volle Ausprägung der Phosphorylierungsaktivitäten beider YycG-Kinasen notwendig ist, wäre einer Art von „feel well“-Effekt. Es gilt dabei zu bedenken, dass die Kinasen für die durchgeführten *in vitro*-Analysen vollständig ihres

natürlichen Umfeldes beraubt wurden. So könnten *in vivo* beispielsweise stabilisierende Proteine vorhanden sein, die unter den *in vitro*-Bedingungen fehlen. Der hohen Salzkonzentration könnte deshalb lediglich ein stabilisierender Effekt, besonders im Detergenz-Mizellen-Modell, zukommen. Dieser stabilisierende Effekt könnte auch im Phospholipid-Liposomen-Modell notwendig sein, da die Kinasen zwar in eine artifizielle Membran rekonstituiert wurden, diese aber aus einem polaren Lipidextrakt von *E. coli* besteht und die damit zu *S. aureus* bestehenden Unterschiede in der Zusammensetzung der Phospholipide könnten deshalb auch eine mögliche Rolle spielen.

4.2.2.2 Oxidativer Stress

In der Literatur werden immer wieder O₂ oder generell die oxidativen Bedingungen als mögliches Signal bzw. als Umstände, die von den orthologen YycG-Kinasen in *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *S. mutans* wahrgenommen werden, an zahlreichen Stellen diskutiert und dabei immer im Zusammenhang mit der cytoplasmatischen PAS-Domäne von YycG betrachtet (MARTIN et al., 1999; ECHENIQUE and TROMBE, 2001; KADIOGLU et al., 2003; AHN and BURNE, 2007; DENG et al., 2007). – An dieser Stelle sei auch auf den Abschnitt 4.1.3 verwiesen, in dem u.a. der Einfluss von YycFG auf die Anwesenheit von oxidativen Stress diskutiert wird. – Das Akronym PAS steht dabei für die Namen der Proteine, in denen dieses Sequenzmotiv erstmals wiederholt erkannt wurde: das *Drosophila* „period clock protein“ (PER), das „aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ (ARNDT) Protein in Vertebraten und das *Drosophila* „single-minded protein“ (SIM) (TAYLOR and ZHULIN, 1999). Durch die Anwesenheit der PAS-Domäne bestünde damit tatsächlich die Möglichkeit, dass YycG auch in der Wahrnehmung des O₂-Levels und oder des Redoxpotential beteiligt ist. Wie bereits aufgeführt, konnte in dieser Arbeit durch die massive Überexpression von *yycFG* in *S. aureus* keine Empfindlichkeit gegenüber von Methylviologen (MV; aka Paraquat) bzw. den durch MV erzeugten Stress durch hochreaktive Sauerstoffradikale (ROS, reactive oxygen species) auf das Wachstum beobachtet werden. Dabei waren auch keine Unterschiede zu beobachten, die sich durch den Aminosäureaustausch (AS-Austausch) in der PAS-Domäne in der mutierten YycG(Y306N)-Kinase hätten ergeben können. Dies ist dahingehend interessant, als dass der AS-Austausch, wie im Phospholipid-Liposomen-Modell beobachtet, im Gegensatz zu der nativen YycG-Kinase einen triggernden Effekt auf die Aktivität der mutierten YycG(Y308N)-Kinase hat. Dies deutet daraufhin, dass der AS-Austausch nicht im Zusammenhang mit der möglichen Fähigkeit der YycG-Kinase zur direkten Wahrnehmung

von O₂ oder oxidativem Stress steht. In der Literatur sind PAS-Domänen, die in Proteinen z.B. dem *E. coli*-Redox-Sensor *Ec* DOS als Beteiligte an der Erkennung des O₂- bzw. Redoxstatus beschrieben sind, oft über eine Häm-Bindestelle charakterisiert (GONG et al., 1998; TAYLOR and ZHULIN, 1999; GILLES-GONZALEZ and GONZALEZ, 2004; KUROKAWA et al., 2004). Das legt nahe, dass das Häm-Molekül und das darin komplexierte Fe³⁺/Fe²⁺ zur direkten Wahrnehmung von O₂ absolut notwendig sind. Neben diesen Rezeptor-Proteinen gibt es aber auch Transducer-Proteine, wie das *E. coli*-Protein Aer, bei denen die Wahrnehmung von O₂ indirekt über die Erkennung von Veränderungen des Redox-Status über die beteiligten Proteine der Elektronen-Transportkette erfolgt (TAYLOR and ZHULIN, 1999). Für die PAS-Domäne der orthologen YycG-Kinasen ist weder in der Literatur eine Häm-Bindestelle beschrieben, noch konnte für das YycG-Protein aus *S. aureus* eine solche durch die CD-Search (conserved domain search, siehe Abschnitt 3.2) in dieser Arbeit *in silico* ermittelt werden. Dass die orthologen YycG-Kinasen in der Literatur immer wieder im Zusammenhang mit O₂ und oxidativem Stress unter bestimmten Bedingungen als auffallend beschrieben werden, könnte – wie dargelegt – auch ohne eine direkte Wahrnehmung dieser Bedingungen erklärt werden. In diesem Zusammenhang wäre eine denkbare Möglichkeit der indirekten Wahrnehmung, dass die cytoplasmatische PAS-Domäne in den orthologen YycG-Kinasen, eventuell auch in Assoziation mit YycJ, kleine Moleküle oder Cofaktoren wahrnimmt, die den metabolischen Status reflektieren, und unter aerobem oder anaerobem Wachstum oder Stress akkumulieren (NG and WINKLER, 2004). Eine direkte Wahrnehmung von oxidativem Stress durch die YycG-Kinase erscheint also abschließend unwahrscheinlich, auch unter dem Aspekt, dass für eine direkte Wahrnehmung andere Systeme in Frage kommen bzw. beschrieben sind, wie z.B. in *S. pneumoniae* das CiaRH-TCS im Zusammenspiel mit ComDE, die die Antwort auf O₂ vermitteln, was letztendlich in der Ausbildung der Kompetenz des Bakteriums kumuliert (ECHENIQUE and TROMBE, 2001). Im Fall von *S. carnosus* ist mit NreB ein direkter O₂-Sensor beschrieben, der eine PAS-Domäne mit einem Sauerstoffempfindlichen [4Fe-4S]²⁺-Cluster beinhaltet (REINHART et al., 2009).

4.2.2.3 Komponenten der Zellwandbiosynthese

Da das YycFG-TCS als entscheidendes regulatorisches Element in der Zellwandbiosynthese angesehen wird, ist es auch sehr naheliegend, dass als mögliches Signal mit Lipid II auch eine zentrale Komponente der Peptidoglykansynthese vorgeschlagen wurde (DUBRAC et al., 2008). Trotz einiger Indizien, konnte diese Hypothese aber noch nicht bewiesen werden. Diese

Möglichkeit wurde für *S. aureus* auch in dieser Arbeit untersucht. Für die in unilamellare Vesikel (ULVs) rekonstituierte, mutierte YycG(Y308N)-Kinase konnte jedoch in ULVs, die zuvor mit Lipid II oder C₅₅-P (Bactoprenol) dotiert wurden, keine Veränderung in der Autophosphorylierungsaktivität im Vergleich zu undotierten Proteoliposomen festgestellt werden. Da es sich, wie in Abschnitt 4.2.3 diskutiert, aller Wahrscheinlichkeit nach bezüglich der Aktivität um eine „ON“-Mutation in der mutierten YycG(Y308N)-Kinase handelt, und die native YycG-Kinase wegen ihrer geringen Aktivität im Phospholipid-Liposomen-Modell nicht hinreichend auf einen Effekt durch die Anwesenheit von Lipid II bzw. C₅₅-P getestet werden konnte, bleibt deshalb die Möglichkeit bestehen, dass es sich bei Lipid II tatsächlich um ein oder das Signal der YycG-Kinase handelt - unter der Prämisse, dass Lipid II wie vermutet zur Inaktivierung der Kinase führt.

4.2.3 Einfluss des AS-Austausches in der PAS-Domäne von YycG(Y308N)

Wie in dieser Arbeit mit dem Phospholipid-Liposomen-Modell gezeigt werden konnte, hat der Aminosäureaustausch in der mutierten YycG(Y308N)-Kinase, nach deren Rekonstitution in Liposomen, einen triggernden Effekt auf die Phosphorylierungsaktivitäten. Das lässt sich deshalb so klar schlussfolgern, da die native YycG-Kinase nach der Rekonstitution nur äußerst schwache Aktivitäten im direkten Vergleich zu der mutierten Kinase zeigte. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass für die Sensor-Histidin-Kinase DcuS aus *E. coli* beschrieben ist, dass die cytoplasmatischen PAS-Domäne (PAS_C-Domäne) des Proteins eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung des Proteins spielt, und dass zwei unterschiedliche Aminosäureaustausche in dieser PAS_C-Domäne jeweils dazu führten, dass eine konstitutive Aktivierung des Proteins beobachtet werden konnte, für die kein Stimulus durch das Signal Fumarat notwendig war (DÜNNWALD et al., 2009). In vorhergehenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die beiden mutierten Positionen in der PAS_C-Domäne eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Dimer-Schnittstelle (dimer interface) spielen, die für die Aktivierung der Kinase notwendig ist (ETZKORN et al., 2008). Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass die PAS_C-Domäne bei DcuS eine Rolle in der Signal-Transduktion spielt, und dass das durch die periplasmatische PAS-Domäne (PAS_P-Domäne) wahrgenommen Signalmolekül Fumarat eine Änderung in der Konformation induziert, die über die nachgeschaltete Transmembran- auch an die PAS_C-Domäne weitergeleitet und letztendlich zur Aktivierung der Kinase-Funktion des Proteins führt (ETZKORN et al., 2008; DÜNNWALD et al., 2009). Trotz der strukturellen Unterschiede der DcuS- und der YycG-

Kinase ist ein vergleichbarer Effekt des Aminosäureaustausches in der PAS_C-Domäne von YycG denkbar. Insbesondere wenn man bedenkt, dass die PAS_C-Domäne von YycG zwischen der HAMP- und der HisKA-Domäne des Proteins liegt, wobei erstere die Dimerisierungsschnittstelle (dimerization interface) umfasst und letztere die Dimer-Schnittstelle (dimer interface) des Proteins beinhaltet (siehe Abbildung 3.2 und oder 3.3 in Abschnitt 3.2). Mögliche Änderungen in der Konformation der PAS_C-Domäne, die sich durch den Aminosäureaustausch ergeben, könnten so auch nachhaltig auf die Konformation der flankierenden beiden Domänen einwirken und damit auch einen Effekt auf die Signal-Transduktion und die Aktivierung der nachgeschalteten HATPase_c-Domäne haben. Einen Hinweis darauf, dass es tatsächlich zu einer Konformationsänderung und damit zu einem Effekt in der Signal-Transduktionskette kommt, liefert wie beschrieben die mutierte YycG(Y308N)-Kinase im Phospholipid-Liposomen-Modell. Erstens ist der Effekt des Aminosäureaustausch im Detergenz-Mizellen-Modell nicht beobachtbar, weil sich die native YycG-Kinase zu der mutierten Kinase gleich verhält, d.h. nur die Anwesenheit einer artifiziellen Membran, die erst die volle Ausprägung der Konformation erlaubt, brachte den Effekt des Aminosäureaustausches hervor, und zweitens weist die äußerst schwache Phosphorylierungsaktivität der nativen YycG-Kinase im Phospholipid-Liposomen-Modell darauf hin, dass kein aktivierendes Signal vorhanden ist, und dass dieses aber notwendig wäre, um die volle Signal-Transduktion als Kettenreaktion über alle Domänen bis hin zur Aktivierung der Kinasefunktion zu initiieren. Abschließend lässt sich also schlussfolgern, dass der Aminosäureaustausch in der mutierten YycG(Y308N)-Kinase eine „ON“-Mutation darstellt, die auch in Abwesenheit eines Signals zur Aktivierung der Kinase führt.

4.3 Ausblick

Es ist deutlich geworden, dass es sich bei dem Zwei-Komponentenregulationssystem (TCS) YycFG aufgrund seiner nahezu ubiquitären Verbreitung bei allen Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt im Phylum der Firmicutes und wegen seiner lebenswichtigen Funktion für das Wachstum dieser Bakterien um ein einzigartiges regulatorisches System handelt, bei dem trotz der weltweiten intensiven Forschung in den letzten zehn Jahren entscheidende Fragen bezüglich der genauen Funktion und der Signalwahrnehmung noch immer unbeantwortet sind.

Mit den Ergebnissen aus den Versuchen zur Überexpression von *yycFG* in *S. aureus* konnten viele Hypothesen und Ideen zu der Funktion der orthologen YycFG-Proteine in anderen

Bakterien auch in *S. aureus* überprüft werden, so dass sowohl Übereinstimmungen, als Abweichungen festgestellt werden konnten. Für diese Art der Charakterisierung musste jedoch festgestellt werden, dass das YycFG-TCS zwar bei diversen zellulären Prozessen beteiligt ist, dass es jedoch eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, die insbesondere durch Wechselwirkungen mit anderen regulatorischen Systemen geprägt wird. Daraus resultierte die Erkenntnis, dass dieses System viel unmittelbarer betrachtet werden muss, um die entscheidenden Fragen bezüglich der exakten Funktion beantworten zu können. Zu diesem Zweck wurden die YycFG-Proteine, die das TCS selbst ausmachen, und die auxiliären Proteine YycH und YycI selbst in den Focus der Untersuchungen gesetzt. Durch die rekombinante Expression der *S. aureus*-Proteine in *E. coli* konnten die YycFGHI-Proteine, insbesondere die erstmalig vollständig aufgereinigten Membranproteine YycGHI, nicht nur dazu genutzt werden, um *in vitro* in einem ersten Detergenz-Mizellen-Modell die beiden Phosphorylierungsaktivitäten der vollständig rekombinant exprimierten YycG-Kinase zu demonstrieren, sondern auch auf Basis von diesem ein zweites Modellsystem zu etablieren. Dieses zweite Phospholipid-Liposomen-Modell bietet mit seiner durch Liposomen-bereitgestellten artifiziellen Membran eine ideale experimentelle Ausgangsbasis, da es auch den Eigenschaften von YycGHI als Membranproteine gerecht wird. Durch die funktionale Rekonstitution der Kinasen YycG und YycG(Y308N) konnte durch den Nachweis der Phosphorylierungsaktivitäten in diesem Detergenz-freien Modellsystem bereits der Wert dieses Modells eindrucksvoll unterstrichen werden und auch dadurch, dass die mutierte YycG(Y308N)-Kinase durch dieses Modell als „ON“-Mutante charakterisiert werden konnte. Für die weitere Forschung bieten das Phospholipid-Liposomen-Modell, die native YycG-Kinase und die YycG(Y308N)-Kinase mit ihrer „ON“-Mutation ein breites Spektrum an Möglichkeiten, um zukünftig zahlreiche Fragestellungen eingehend untersuchen zu können.

Aufschlüsselung des Signal bzw. der Signale der YycG-Kinase

Mit der funktional in Liposomen rekonstituierten nativen YycG-Kinase könnte relativ einfach ein Screening zur Aufklärung des Signals oder möglichen Signalen dieses Sensorproteins durchgeführt werden. So könnten infrage kommende kleinere, lösliche Signalmoleküle, z.B. solche, die den metabolischen Status der Zelle reflektieren, zu den unilamellaren Vesikeln (ULVs) mit der Membran-ständigen Kinase einfach extern über den Phosphorylierungspuffer zugesetzt werden. So ließe sich beobachten, inwieweit es durch die Anwesenheit dieser Moleküle zu einer Aktivierung der Autophosphorylierungsfunktion der Kinase kommt. Desweiteren sollten eingehendere Untersuchungen mit den Membran-gebundenen

Komponenten der Zellwandbiosynthese wie Lipid II, C₅₅-P (Bactoprenol) und eventuell auch mit Lipid I bezüglich deren Effekt auf die Aktivität der YycG-Kinase durchgeführt werden.

Untersuchungen zu den Protein-Protein-Interaktion

Die ULVs mit den rekonstituierten YycG- und YycG(Y308N)-Kinasen bieten durch die Rekonstitution der auxiliären Proteine YycH und YycI die Möglichkeit, erstmalig eine direkte Interaktion zwischen diesen Proteinen und den damit einhergehenden Auswirkungen auf die Aktivitäten der Kinasen zu beobachten. Auch mögliche Effekte, die sich durch die Anwesenheit von YycH und oder YycI, auf die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des Responseregulators YycF ergeben könnten, ließen sich so leicht darstellen. In diesem Zusammenhang wäre es zudem interessant zu untersuchen, ob es durch die Anwesenheit des YycJ-Proteins zu Veränderungen in diesen Aktivitäten kommt. Dazu müsste das YycJ-Protein allerdings zuvor mit den in dieser Arbeit erfolgreich adaptierten und angewandten Methoden rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden.

Neue Inhibitoren der YycG-Kinase

Das Phospholipid-Liposomen-Modell erlaubt ferner auch das Screening nach ganz neuen Inhibitoren der YycG-Kinase. Während man mit den trunkeierten YycG-Kinasen, die in der Literatur beschrieben sind, lediglich Inhibitoren testen konnte und kann, die zu einer Hemmung der Kinasefunktion durch Anlagerung an die cytoplasmatischen Domänen führen, bietet die in dieser Arbeit vollständig exprimierte und in ULVs funktional rekonstituierte YycG-Kinase mit ihrer extraplasmatischen Schleife und den beiden flankierenden Transmembran-Domänen zusätzliche Angriffsflächen, die für das Testen von neuen hochspezifischen Inhibitoren genutzt werden könnten.

Generell könnten die YycG-ULVs auch zu wesentlich allgemeineren Interaktionsstudien genutzt werden. So könnte geprüft werden, inwieweit bestehende Antibiotika z.B. Daptomycin tatsächlich in der Lage sind mit der YycG-Kinase zu interagieren. Dieses Wissen könnte dann auch dazu genutzt werden, um möglichen Resistenzentwicklungen vorzubeugen.

5. Zusammenfassung

Bei dem essentiellen Zwei-Komponenten-Regulationssystem (TCS) YycFG handelt es sich um ein hochkonserviertes System, das aus der Sensor-Histidin-Kinase YycG und ihrem zugehörigen Responseregulator YycF besteht. Da die YycFG-Proteine innerhalb des Phylums der Firmicutes, in der Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt, nahezu ubiquitär verbreitet sind und in vielen Gattungen in der Folgezeit ebenfalls als essentiell nachgewiesen werden konnten, hat dieses TCS seit seiner Entdeckung durch FABRET und HOCH im Jahre 1998, große Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Innerhalb der Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt finden sich einige bedeutende humanpathogene Krankheitserreger wie z.B. *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. mutans* und *Listeria monocytogenes*, weshalb dieses TCS bereits seit seiner Entdeckung als bedeutendes Ziel für neue oder modifizierte Antibiotika angesehen wird und deshalb auch stark in den Fokus der Forschung bei diesen Bakterien rückte. Trotz der intensiven Erforschung der zu YycFG orthologen Proteine in den diversen Organismen verbleibt die exakte Funktion dieses TCS noch unklar. In den letzten Jahren wird dieses TCS aber zunehmend im direkten Zusammenhang mit der Regulation der Biosynthese der bakteriellen Zellwand gesehen. Vollkommen unbekannt ist hingegen das Signal, auf das die YycG-Sensor-Histidin-Kinase reagiert. Möglicherweise handelt es sich dabei tatsächlich um ein oder sogar mehrere Signale, die mit der Zellwandbiosynthese assoziiert sind. Inwieweit bei der Verarbeitung von Signalen auch die beiden auxiliären Proteine YycH und YycI eine Rolle spielen, z.B. in der Erkennung und Prozessierung, ist noch ungeklärt. Bekannt ist lediglich, dass es in Abwesenheit dieser Proteine zu Schäden in der Zellwand kommt, was darauf hindeuten scheint, dass diese „Hilfsproteine“ negativ auf die Aktivität der YycG-Kinase einwirken können.

Da die für YycFG codierenden Gene *yycFG* beide in *S. aureus* essentiell sind und deshalb nicht durch Deletion oder Disruption inaktiviert werden können, erfolgte in dieser Arbeit zur Charakterisierung dieses TCS zunächst ein alternativer Ansatz, bei dem die beiden essentiellen *yycFG* (*vicRK*) Gene in Anwesenheit von Xylose als Induktor mittels der induzierbaren Vektoren pTvicRK und pTvicRK(Y306N) in *S. aureus* Stamm 8325-4 SH1000 überexprimiert werden konnten. Die phänotypischen Auswirkungen der Überexpression von *yycFG* wurden nachfolgend untersucht.

- Mittels der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) konnte gezeigt werden, dass es im *S. aureus*-Stamm 8325-4 SH1000 durch die induzierbaren Plasmide pTvicRK und pTvicRK(Y306N) in Anwesenheit des Induktors Xylose bei einer $OD_{600} \sim 1$ zu einer 7- bis 12-fachen und in einem OD_{600} -Bereich von 3 – 3,5 es sogar zu einer mindestens 52-fachen Expression von *yycFG* kommt.
- Durch eine Strategie zur vollständig-indirekten Quantifizierung der *yycFG*-Transkripte konnte in der qRT-PCR bei den Überexpressionsstämmen 8325-4 SH1000pTvicRK und 8325-4 SH1000pTvicRK(Y306N) erfolgreich zwischen den chromosomalen und vektoriellen *yycFG*-Transkripten differenziert werden. Unter nicht-induzierenden Bedingungen betrug dabei der Anteil der vektoriellen *yycFG*-Kopien das 2- bis 4-fache, was auf eine gewisse „leakyness“ des *xylA*-Promotors auf den Plasmiden schließen lässt. Unter induzierenden Bedingungen betrug die Expression der vektoriellen *yycFG*-Kopien das 45- bis 57-fache der chromosomalen Kopien.
- Durch die Diskriminierung der chromosomalen und vektoriellen *yycFG*-Kopien in den induzierbaren Überexpressionsstämmen 8325-4 SH1000pTvicRK und 8325-4 SH1000pTvicRK(Y306N) konnte des Weiteren dargelegt werden, dass die Expression der *yycFG*-Gene keiner Autoregulation durch das YycFG-TCS selbst unterliegt, da der massive Anstieg der vektoriellen *yycFG*-Transkripte offensichtlich keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der chromosomalen *yycFG*-Transkripte hatte.
- Durch die induzierte Überexpression von *yycFG* kommt es zu einer verminderten Pigmentierung bei *S. aureus*, deren Ursache die Verminderung des *S. aureus*-Hauptpigmentes Staphyloxanthin ist. Dieser Effekt war am stärksten bei einer Temperatur von 34 °C bzw. 37 °C ausgeprägt und schwächte sich deutlich bei einer höheren Temperatur von 42 °C bzw. 45 °C ab.
- Die durch die Überexpression von *yycFG* verminderte Pigmentierung (Staphyloxanthin) in *S. aureus* führte erstaunlicherweise nicht zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber von oxidativem Stress, der durch die Anwesenheit von Methylviologen und O_2 durch die Bildung von hochreaktiven Sauerstoffradikalen (ROS; reactive oxygen species) verursacht wurde. Dies legt den Schluss nahe, dass nur die letzten Syntheseschritte von Staphyloxanthin nicht vollzogen wurden und eine protektive Wirkung von den anderen Carotinoid-Vorstufen ausging.
- Durch die Anwesenheit von Hydroxyurea (HU) und O_2 konnte bei der induzierten Überexpression von *yycFG* ein vermindertes Wachstum der *S. aureus*-Zellen

beobachtet werden. Da bekannt ist, dass HU die Klasse Ib-Ribonukleotid-Reduktase NrdEF hemmt, scheint die Überexpression von *yycFG* diesen hemmenden Effekt unter aeroben Bedingungen zu verstärken.

- Im Gegensatz zu einer Literaturstelle (DUBRAC et al., 2007) konnte durch die induzierte Überexpression von *yycFG* bei dem in dieser Arbeit verwendeten *S. aureus*-Stamm kein Effekt auf die Biofilmbildung festgestellt werden, was wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem σ^B -positiven Phänotyp dieses Stammes steht und auf eine Wechselwirkung des YycFG-TCS und dem σ^B -System hindeutet.
- Die induzierte Überexpression von *yycFG* führt in *S. aureus* zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber dem Lipopeptid-Antibiotikum Daptomycin. Der Unterschied betrug dabei eine Titerstufe.

Bei der phänotypischen Charakterisierung der durch die induzierte *yycFG*-Überexpression bedingten Effekte in *S. aureus*, lag auch immer ein Hauptaugenmerk auf dem Aminosäureaustausch (AS-Austausch) der mutierten YycG(Y306N)-Kinase, die von dem Plasmid pTvicRK(Y306N) exprimiert wurde. Der AS-Austausch (Y→N) liegt in Position 306 von YycG und damit in der putativ funktionalen PAS-Domäne.

- Ein Multiple-Sequence-Alignment mit Clustal W2 mit der AS-Sequenz von YycG von 14 *S. aureus*-Stämmen zeigte, dass der Austausch zumindest auf der Stamm-Ebene ungewöhnlich ist.
- Ein weiteres Multiple-Sequence-Alignment mit der AS-Sequenz von YycG von *S. aureus* und 14 orthologen Klasse I-YycG-Proteinen aus nahe verwandten Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt zeigte, dass der Austausch allerdings in keiner hochkonservierten Region liegt.
- Das Multiple-Sequence-Alignment brachte zum Vorschein, dass die extraplasmatische Schleife, die eine mögliche Rolle bei der Signalerkennung spielt, bei allen orthologen Klasse I-YycG-Proteinen unerwartet schwach konserviert ist. Im Gegensatz dazu weisen die flankierenden Transmembran-Domänen einen hohen Grad der Konservierung auf, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass diesen möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der Signal-Erkennung zu kommt.
- Bei den *yycFG*-Überexpressionsversuchen konnte nur ein marginaler Effekt des AS-Austausches bei der mutierten YycG(Y306N)-Kinase beobachtet werden.

Die weitere Charakterisierung des essentiellen YycFGHI-Systems, also des kompletten polycistronischen Teils des *yyc*-Operons von *S. aureus*, erfolgte auf Proteinebene zur

Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Im Rahmen der rekombinanten Protein-expression erfolgte zu weiteren Studienzwecken auch die Aufreinigung der mutierten YycG-Kinase aus den Überexpressionsversuchen. Das aufgereinigte mutierte Protein trägt die Bezeichnung YycG(Y308N).

- Die mutierte YycG(Y308N)-Kinase und die YycFGHI-Proteine von *S. aureus*, wurden erstmalig vollständig, d.h. auch mit den Transmembran-Domänen bei YycGHI, rekombinant in *E. coli* exprimiert und erfolgreich aufgereinigt.
- Mittels der BN-PAGE wurde die höhere oligomere Organisation der YycFGHI-Proteine untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Responseregulator YycF und das auxiliäre Protein YycH ausschließlich als Monomere vorliegen. Für die Histidin-Kinasen YycG und YycG(Y308N) konnte eine höhere Organisation bis hin zum Tetramer nachgewiesen werden. Das auxiliäre Protein YycI zeigte sogar eine Organisation bis hin zum Hexamer.
- Die Beobachtungen in der BN-PAGE legen nahe, dass das beobachtete und auch in der Literatur beschriebene Migrationsverhalten von rekombinanten Proteinen in der BN-PAGE ursächlich stärker auf den His₆-Tag als auf die TM-Domänen rückführbar ist.

Zur Überprüfung, ob die rekombinant exprimierten Kinasen YycG und Yyc(Y308N) auch funktional aufgereinigt werden konnten, erfolgte zunächst die Etablierung eines Detergenz-Mizellen-Modells.

- Durch *in vitro*-Phosphorylierungsassays (in Anwesenheit von [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP) konnte im Detergenz-Mizellen-Modell für die vollständig exprimierten, eigentlich Membran-assoziierten, Sensor-Histidin-Kinasen YycG und YycG(Y308N) sowohl die Autophosphorylierungsaktivität, als auch in einem subsequenten Schritt der Phosphorylgruppentransfer auf den zugehörigen Responseregulator YycF gezeigt werden.
- Mit den vollständig exprimierten Kinasen YycG und YycG(Y308N) konnten anders als für eine in der Literatur beschriebene trunkierte YycG-Kinase (DUBRAC and MSADEK, 2004) auch Hinweise für eine Dephosphorylierungsaktivität in Anwesenheit des Responseregulators YycF beobachtet werden. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Transmembran-Domänen von YycG für die volle Funktionalität der Kinase vorhanden sein müssen.

- Im Detergenz-Mizellen-Modell konnte kein Effekt der auxiliären und als putative Negativregulatoren beschriebenen Proteine YycH und YycI auf die Phosphorylierungsaktivitäten der YycG- und YycG(Y308N)-Kinasen gezeigt werden.

Um bei den YycGHI-Proteinen den Eigenschaften als Membranprotein mehr Rechnung zu tragen, wurde auf Basis des Detergenz-Mizellen-Modells ein Detergenz-freies Phospholipid-Liposomen-Modell etabliert. Die volle Funktionalität der Kinasen YycG und YycG(Y308N) sollte durch die Rekonstitution dieser Proteine in die artifizielle Phospholipid-Membran von unilamellaren Vesikeln (ULVs) gewährleistet werden.

- Durch *in vitro*-Phosphorylierungsassays konnte gezeigt werden, dass die in ULVs rekonstituierte YycG(Y308N)-Kinase sowohl zur Autophosphorylierungsaktivität, als auch zum Phosphorylgruppentransfer auf den extern zugegebenen Responseregulator YycF befähigt ist.
- Im direkten Vergleich zur mutierten YycG(Y308N)-Kinase, konnten für die in ULVs rekonstituierte YycG-Kinase nur sehr schwache Phosphorylierungsaktivitäten nachgewiesen werden. Da beide Kinasen im Detergenz-Mizellen-Modell aber eine vergleichbare Aktivität zeigten, wurde dadurch deutlich, dass sich der AS-Austausch in der PAS-Domäne auf die Aktivität der mutierten YycG(Y308N)-Kinase auswirkt und diese als eine Art „ON“-Mutante angesehen werden kann.

Da der Unterschied in der Aktivität der nativen und der mutierten Kinase erst im Phospholipid-Liposomen-Modell beobachtbar wurde, kann man schlussfolgern, dass dieses Modell deutlich näher an die tatsächlichen *in vivo*-Bedingungen heranreicht und damit für die weitere Charakterisierung des regulatorischen YycFGHI-Systems von *S. aureus* eine hervorragende experimentelle Basis bietet.

- Die Anwesenheit der Zellwandbiosynthese-Komponenten C₅₅-P (Bactoprenol) bzw. Lipid II zeigte in dotierten ULVs keinen Effekt auf die Phosphorylierungsaktivitäten der in die ULVs rekonstituierten mutierten YycG(Y308N)-Kinase. Da dies auf den Effekt des AS-Austausches zurückführbar ist, der sehr wahrscheinlich eine „ON“-Mutation darstellt, bleibt eine mögliche Signal-Funktion dieser Komponenten aber weiterhin offen und höchst wahrscheinlich.

6. Literaturverzeichnis

- AHN, S. J., and BURNE, R. A. (2007). Effects of oxygen on biofilm formation and the AtlA autolysin of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 189(17):6293-6302.
- AMREIN, K. E., TAKACS, B., STIEGER, M., MOLNOS, J., FLINT, N. A., and BURN, P. (1995). Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(4):1048-1052.
- BALTZ, R. H. (2009). Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Curr Opin Chem Biol*, 13(2):144-151.
- BARRETEAU, H., KOVAC, A., BONIFACE, A., SOVA, M., GOBEC, S., and BLANOT, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2):168-207.
- BIERBAUM, G., FUCHS, K., LENZ, W., SZEKAT, C., and SAHL, H. G. (1999). Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18(10):691-696.
- BIJLSMA, J. J., and GROISMAN, E. A. (2003). Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol*, 11(8):359-366.
- BISICCHIA, P., NOONE, D., LIOLIOU, E., HOWELL, A., QUIGLEY, S., JENSEN, T., JARMER, H., and DEVINE, K. M. (2007). The essential YycFG two-component system controls cell wall metabolism in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 65(1):180-200.
- BISWAS, I., DRAKE, L., ERKINA, D., and BISWAS, S. (2008). Involvement of sensor kinases in the stress tolerance response of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 190(1):68-77.
- BISWAS, R., VOGGU, L., SIMON, U. K., HENTSCHEL, P., THUMM, G., and GOTZ, F. (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol Lett*, 259(2):260-268.
- BOLES, B. R., and HORSWILL, A. R. (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*, 4(4):e1000052.
- BOUHSS, A., TRUNKFIELD, A. E., BUGG, T. D., and MENGIN-LECREULX, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2):208-233.
- BOYLE-VAVRA, S., and DAUM, R. S. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest*, 87(1):3-9.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- BUS, J. S., and GIBSON, J. E. (1984). Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect*, 55:37-46.
- CDC (1999). From the Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *JAMA*, 282(12):1123-1125.
- CHAMBERLAIN, N. R., MEHRTENS, B. G., XIONG, Z., KAPRAL, F. A., BOARDMAN, J. L., and REARICK, J. I. (1991). Correlation of carotenoid production, decreased membrane fluidity, and resistance to oleic acid killing in *Staphylococcus aureus* 18Z. *Infect Immun*, 59(12):4332-4337.
- CLAUDITZ, A., RESCH, A., WIELAND, K. P., PESCHEL, A., and GOTZ, F. (2006). Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Immun*, 74(8):4950-4953.
- COOKSON, B. D., ROBINSON, D. A., MONK, A. B., MURCHAN, S., DEPLANO, A., DE RYCK, R., STRUELENS, M. J., SCHEEL, C., FUSSING, V., SALMENLINNA, S., VUOPIO-VARKILA, J.,

- CUNY, C., WITTE, W., TASSIOS, P. T., LEGAKIS, N. J., VAN LEEUWEN, W., VAN BELKUM, A., VINDEL, A., GARAIZAR, J., HAEGGMAN, S., OLSSON-LILJEQUIST, B., RANSJO, U., MULLER-PREMRU, M., HRYNIEWICZ, W., ROSSNEY, A., O'CONNELL, B., SHORT, B. D., THOMAS, J., O'HANLON, S., and ENRIGHT, M. C. (2007). Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol*, 45(6):1830-1837.
- COTRONEO, N., HARRIS, R., PERLMUTTER, N., BEVERIDGE, T., and SILVERMAN, J. A. (2008). Daptomycin exerts bactericidal activity without lysis of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(6):2223-2225.
- CRAMTON, S. E., GERKE, C., SCHNELL, N. F., NICHOLS, W. W., and GOTZ, F. (1999). The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*, 67(10):5427-5433.
- DAIYASU, H., OSAKA, K., ISHINO, Y., and TOH, H. (2001). Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the beta-lactamase fold. *FEBS Lett*, 503(1):1-6.
- DENG, D. M., LIU, M. J., TEN CATE, J. M., and CRIELAARD, W. (2007). The VicRK system of *Streptococcus mutans* responds to oxidative stress. *J Dent Res*, 86(7):606-610.
- DUBRAC, S., BISICCHIA, P., DEVINE, K. M., and MSADEK, T. (2008). A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol Microbiol*, 70(6):1307-1322.
- DUBRAC, S., BONECA, I. G., POUPEL, O., and MSADEK, T. (2007). New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 189(22):8257-8269.
- DUBRAC, S., and MSADEK, T. (2004). Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 186(4):1175-1181.
- DÜNNWALD, P., M., E., BALDUS, M., and UNDEN, G. (2009). Poster PS26: The cytoplasmic PAS_c domain of the histidine kinase DcuS and its role in signal transduction, Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Bochum, 8-11 March.
- ECHENIQUE, J. R., and TROMBE, M. C. (2001). Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J Bacteriol*, 183(15):4599-4608.
- ETZKORN, M., KNEUPER, H., DUNNWALD, P., VIJAYAN, V., KRAMER, J., GRIESINGER, C., BECKER, S., UNDEN, G., and BALDUS, M. (2008). Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS. *Nat Struct Mol Biol*, 15(10):1031-1039.
- FABRET, C., and HOCH, J. A. (1998). A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J Bacteriol*, 180(23):6375-6383.
- FAILER, B. U. (2002). Molekulare und funktionelle Charakterisierung von Nukleotid-hydrolysierenden Enzymen des Endomembransystems und der Zelloberfläche. Dissertation, Fachbereich Biologie und Informatik, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Frankfurt am Main.
- FIRCZUK, M., and BOCHTLER, M. (2007). Folds and activities of peptidoglycan amidases. *FEMS Microbiol Rev*, 31(6):676-691.
- FRIEDMAN, L., ALDER, J. D., and SILVERMAN, J. A. (2006). Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(6):2137-2145.

- FRIEDRICH, A. W., DANIELS-HAARDT, I., KOCK, R., VERHOEVEN, F., MELLMANN, A., HARMSSEN, D., VAN GEMERT-PIJNEN, J. E., BECKER, K., and HENDRIX, M. G. (2008). EUREGIO MRSA-net Twente/Munsterland--a Dutch-German cross-border network for the prevention and control of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Euro Surveill*, 13(35).
- FUKUCHI, K., KASAHARA, Y., ASAI, K., KOBAYASHI, K., MORIYA, S., and OGASAWARA, N. (2000). The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 146 (Pt 7):1573-1583.
- FUKUSHIMA, T., SZURMANT, H., KIM, E. J., PEREGO, M., and HOCH, J. A. (2008). A sensor histidine kinase co-ordinates cell wall architecture with cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 69(3):621-632.
- GARDETE, S., AIRES-DE-SOUSA, M., FAUSTINO, A., LUDOVICE, A. M., and DE LENCASTRE, H. (2008a). Identification of the first vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) isolate from a hospital in Portugal. *Microb Drug Resist*, 14(1):1-6.
- GARDETE, S., ANTIGNAC, A., LUDOVICE, A. M., DE LENCASTRE, H., and TOMASZ, A. (2008b). Poster P 11: Identification of the first *Staphylococcus aureus* EMRSA-15 isolate expressing VISA-type resistance to vancomycin, Transregio 34 Workshop: „Pathophysiology of Staphylococci“ Kloster Banz, Bad Staffelstein, 28 – 31 October, 2008.
- GILLES-GONZALEZ, M. A., and GONZALEZ, G. (2004). Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *J Appl Physiol*, 96(2):774-783.
- GILLET, Y., ISSARTEL, B., VANHEMS, P., FOURNET, J. C., LINA, G., BES, M., VANDENESCH, F., PIEMONT, Y., BROUSSE, N., FLORET, D., and ETIENNE, J. (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*, 359(9308):753-759.
- GOERKE, C., KOLLER, J., and WOLZ, C. (2006). Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(1):171-177.
- GONG, W., HAO, B., MANSY, S. S., GONZALEZ, G., GILLES-GONZALEZ, M. A., and CHAN, M. K. (1998). Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(26):15177-15182.
- GÖTZ, F., BANNERMAN, T., and SCHLEIFER, K.-H. (2006). The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p. 5-75. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York.
- HANCOCK, L. E., and PEREGO, M. (2004). Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol*, 186(23):7951-7958.
- HEUBERGER, E. H., VEENHOFF, L. M., DUURKENS, R. H., FRIESEN, R. H., and POOLMAN, B. (2002). Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *J Mol Biol*, 317(4):591-600.
- HIRAMATSU, K., HANAKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGURI, T., and TENOVER, F. C. (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*, 40(1):135-136.
- HOCH, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol*, 3(2):165-170.
- HORSBURGH, M. J., AISH, J. L., WHITE, I. J., SHAW, L., LITHGOW, J. K., and FOSTER, S. J. (2002). sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional *rsbU* strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol*, 184(19):5457-5467.

- HOWELL, A., DUBRAC, S., ANDERSEN, K. K., NOONE, D., FERT, J., MSADEK, T., and DEVINE, K. (2003). Genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach. *Mol Microbiol*, 49(6):1639-1655.
- HOWELL, A., DUBRAC, S., NOONE, D., VARUGHESE, K. I., and DEVINE, K. (2006). Interactions between the YycFG and PhoPR two-component systems in *Bacillus subtilis*: the PhoR kinase phosphorylates the non-cognate YycF response regulator upon phosphate limitation. *Mol Microbiol*, 59(4):1199-1215.
- JANSEN, A., TÜRCK, M., SZEKAT, C., NAGEL, M., CLEVER, I., and BIERBAUM, G. (2007). Role of insertion elements and *yycFG* in the development of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 297(4):205-215.
- JAROSZEWSKI, L., RYCHLEWSKI, L., LI, Z., LI, W., and GODZIK, A. (2005). FFAS03: a server for profile-profile sequence alignments. *Nucleic Acids Res*, 33(Web Server issue):W284-288.
- JORDAN, S., HUTCHINGS, M. I., and MASCHER, T. (2008). Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 32(1):107-146.
- KADIOGLU, A., ECHENIQUE, J., MANCO, S., TROMBE, M. C., and ANDREW, P. W. (2003). The MicAB two-component signaling system is involved in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 71(11):6676-6679.
- KALLIPOLITIS, B. H., and INGMER, H. (2001). *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett*, 204(1):111-115.
- KATZIF, S., LEE, E. H., LAW, A. B., TZENG, Y. L., and SHAFER, W. M. (2005). CspA regulates pigment production in *Staphylococcus aureus* through a SigB-dependent mechanism. *J Bacteriol*, 187(23):8181-8184.
- KENNEDY, A. D., OTTO, M., BRAUGHTON, K. R., WHITNEY, A. R., CHEN, L., MATHEMA, B., MEDIAVILLA, J. R., BYRNE, K. A., PARKINS, L. D., TENOVER, F. C., KREISWIRTH, B. N., MUSSER, J. M., and DELEO, F. R. (2008). Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(4):1327-1332.
- KREISWIRTH, B. N., LOFDAHL, S., BETLEY, M. J., O'REILLY, M., SCHLIEVERT, P. M., BERGDOLL, M. S., and NOVICK, R. P. (1983). The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature*, 305(5936):709-712.
- KROGH, A., LARSSON, B., VON HEIJNE, G., and SONNHAMMER, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305(3):567-580.
- KULLIK, I., GIACHINO, P., and FUCHS, T. (1998). Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J Bacteriol*, 180(18):4814-4820.
- KUROKAWA, H., LEE, D. S., WATANABE, M., SAGAMI, I., MIKAMI, B., RAMAN, C. S., and SHIMIZU, T. (2004). A redox-controlled molecular switch revealed by the crystal structure of a bacterial heme PAS sensor. *J Biol Chem*, 279(19):20186-20193.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-685.
- LANG, S., LIVESLEY, M. A., LAMBERT, P. A., LITTLER, W. A., and ELLIOTT, T. S. (2000). Identification of a novel antigen from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 29(3):213-220.
- LANGE, R., WAGNER, C., DE SAIZIEU, A., FLINT, N., MOLNOS, J., STIEGER, M., CASPERS, P., KAMBER, M., KECK, W., and AMREIN, K. E. (1999). Domain organization and

- molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, 237(1):223-234.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., and HIGGINS, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947-2948.
- LAUDERDALE, K. J., BOLES, B. R., CHEUNG, A. L., and HORSWILL, A. R. (2009). Interconnections between Sigma B, *agr*, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun*, 77(4):1623-1635.
- LINDSAY, J. A. (2008). *Staphylococcus: Molecular Genetics*. In J. A. Lindsay (ed.). Caister Academic Press.
- LIU, C. I., LIU, G. Y., SONG, Y., YIN, F., HENSLER, M. E., JENG, W. Y., NIZET, V., WANG, A. H., and OLDFIELD, E. (2008). A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science*, 319(5868):1391-1394.
- LIU, G. Y., ESSEX, A., BUCHANAN, J. T., DATTA, V., HOFFMAN, H. M., BASTIAN, J. F., FIERER, J., and NIZET, V. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med*, 202(2):209-215.
- LIU, M., HANKS, T. S., ZHANG, J., MCCLURE, M. J., SIEMSEN, D. W., ELSER, J. L., QUINN, M. T., and LEI, B. (2006). Defects in *ex vivo* and *in vivo* growth and sensitivity to osmotic stress of group A *Streptococcus* caused by interruption of response regulator gene *vicR*. *Microbiology*, 152(Pt 4):967-978.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J., and BROCK, T. D. (2003). 3.7 Die Zellwand der Prokaryoten: Peptidoglykan und verwandte Moleküle, p. 78-79. In W. Goebel (ed.), Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg / Berlin.
- MAINARDI, J. L., VILLET, R., BUGG, T. D., MAYER, C., and ARTHUR, M. (2008). Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2):386-408.
- MAKI, H., MCCALLUM, N., BISCHOFF, M., WADA, A., and BERGER-BACHI, B. (2004). *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(6):1953-1959.
- MALTEZOU, H. C., and GIAMARELLOU, H. (2006). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents*, 27(2):87-96.
- MARCHLER-BAUER, A., ANDERSON, J. B., CHITSAZ, F., DERBYSHIRE, M. K., DEWEESE-SCOTT, C., FONG, J. H., GEER, L. Y., GEER, R. C., GONZALES, N. R., GWADZ, M., HE, S., HURWITZ, D. I., JACKSON, J. D., KE, Z., LANCZYCKI, C. J., LIEBERT, C. A., LIU, C., LU, F., LU, S., MARCHLER, G. H., MULLOKANDOV, M., SONG, J. S., TASNEEM, A., THANKI, N., YAMASHITA, R. A., ZHANG, D., ZHANG, N., and BRYANT, S. H. (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue):D205-210.
- MARCHLER-BAUER, A., and BRYANT, S. H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res*, 32(Web Server issue):W327-331.
- MARSHALL, J. H., and RODWELL, E. S. (1972). "First mention of staphyloxanthin", 3rd International Symposium on Carotenoids Other Than Vitamin A, September 4-7, 1972, pp. 56-57. International Union of Pure and Applied Chemistry, Cluj, Romania.
- MARSHALL, J. H., and WILMOTH, G. J. (1981a). Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *J Bacteriol*, 147(3):900-913.
- MARSHALL, J. H., and WILMOTH, G. J. (1981b). Proposed pathway of triterpenoid carotenoid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*: evidence from a study of mutants. *J Bacteriol*, 147(3):914-919.

- MARTIN, P. K., BAO, Y., BOYER, E., WINTERBERG, K. M., MCDOWELL, L., SCHMID, M. B., and BUYASSE, J. M. (2002). Novel locus required for expression of high-level macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 184(20):5810-5813.
- MARTIN, P. K., LI, T., SUN, D., BIEK, D. P., and SCHMID, M. B. (1999). Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 181(12):3666-3673.
- MASALHA, M., BOROVOK, I., SCHREIBER, R., AHARONOWITZ, Y., and COHEN, G. (2001). Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *J Bacteriol*, 183(24):7260-7272.
- MICEK, S. T. (2007). Alternatives to vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Infect Dis*, 45 Suppl 3:S184-190.
- MIROUX, B., and WALKER, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 260(3):289-298.
- MISHRA, N. N., YANG, S. J., SAWA, A., RUBIO, A., NAST, C. C., YEAMAN, M. R., and BAYER, A. S. (2009). Analysis of cell membrane characteristics of in vitro-selected daptomycin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(6):2312-2318.
- MOHEDANO, M. L., OVERWEG, K., DE LA FUENTE, A., REUTER, M., ALTABE, S., MULHOLLAND, F., DE MENDOZA, D., LOPEZ, P., and WELLS, J. M. (2005). Evidence that the essential response regulator YycF in *Streptococcus pneumoniae* modulates expression of fatty acid biosynthesis genes and alters membrane composition. *J Bacteriol*, 187(7):2357-2367.
- MÖKER, N., BROCKER, M., SCHAFFER, S., KRAMER, R., MORBACH, S., and BOTT, M. (2004). Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol Microbiol*, 54(2):420-438.
- MÖKER, N., REIHLEN, P., KRAMER, R., and MORBACH, S. (2007). Osmosensing properties of the histidine protein kinase MtrB from *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem*, 282(38):27666-27677.
- MUSTA, A. C., RIEDERER, K., SHEMES, S., CHASE, P., JOSE, J., JOHNSON, L. B., and KHATIB, R. (2009). Vancomycin MIC plus heteroresistance and outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: trends over 11 years. *J Clin Microbiol*, 47(6):1640-1644.
- MUTHAIYAN, A., SILVERMAN, J. A., JAYASWAL, R. K., and WILKINSON, B. J. (2008). Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(3):980-990.
- MWANGI, M. M., WU, S. W., ZHOU, Y., SIERADZKI, K., DE LENCASTRE, H., RICHARDSON, P., BRUCE, D., RUBIN, E., MYERS, E., SIGGIA, E. D., and TOMASZ, A. (2007). Tracking the in vivo evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(22):9451-9456.
- NADEAU, O. W., and CARLSON, G. M. (2005). Protein Interactions Captured by Chemical Cross-linking: One-Step Cross-linking with Formaldehyde. In E. A. Golemis and P. D. Adams (eds.), *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

- NG, W. L., KAZMIERCZAK, K. M., and WINKLER, M. E. (2004). Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Mol Microbiol*, 53(4):1161-1175.
- NG, W. L., ROBERTSON, G. T., KAZMIERCZAK, K. M., ZHAO, J., GILMOUR, R., and WINKLER, M. E. (2003). Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Mol Microbiol*, 50(5):1647-1663.
- NG, W. L., TSUI, H. C., and WINKLER, M. E. (2005). Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 187(21):7444-7459.
- NG, W. L., and WINKLER, M. E. (2004). Singular structures and operon organizations of essential two-component systems in species of *Streptococcus*. *Microbiology*, 150(Pt 10):3096-3098.
- NIRANJANAKUMARI, S., LASDA, E., BRAZAS, R., and GARCIA-BLANCO, M. A. (2002). Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions *in vivo*. *Methods*, 26(2):182-190.
- NOVICK, R. (1967). Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology*, 33(1):155-166.
- O'GARA, J. P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 270(2):179-188.
- PELZ, A., WIELAND, K. P., PUTZBACH, K., HENTSCHEL, P., ALBERT, K., and GOTZ, F. (2005). Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 280(37):32493-32498.
- PESCHEL, A., OTTENWALDER, B., and GOTZ, F. (1996). Inducible production and cellular location of the epidermin biosynthetic enzyme EpiB using an improved staphylococcal expression system. *FEMS Microbiol Lett*, 137(2-3):279-284.
- PETERS, G., and PULVERER, G. (2001). Die Familie der Micrococcaceae, p. 250 - 260. In W. Köhler, H. J. Eggers, B. Fleischer, R. Marre, H. Pfister, and P. Pulverer (eds.), *Medizinische Mikrobiologie*. Urban & Fischer Verlag, München.
- PILLAI, S. K., SAKOULAS, G., WENNERSTEN, C., ELIOPOULOS, G. M., MOELLERING, R. C., JR., FERRARO, M. J., and GOLD, H. S. (2002). Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *J Infect Dis*, 186(11):1603-1607.
- POLLACK, J. S., and SINGER, M. (2001). SdeK, a histidine kinase required for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol*, 183(12):3589-3596.
- QIN, Z., ZHANG, J., XU, B., CHEN, L., WU, Y., YANG, X., SHEN, X., MOLIN, S., DANCHIN, A., JIANG, H., and QU, D. (2006). Structure-based discovery of inhibitors of the YycG histidine kinase: new chemical leads to combat *Staphylococcus epidermidis* infections. *BMC Microbiol*, 6:96.
- REINHART, F., MÜLLNER, M., BILL, E., and UNDEN, G. (2009). Poster PS25: The O₂-sensor NreB of *Staphylococcus carnosus* contains a PAS domain with an oxygen sensitive [4Fe-4S]²⁺ cluster, Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Bochum, 8-11 March.
- REIPERT, A., EHLERT, K., KAST, T., and BIERBAUM, G. (2003). Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(2):568-576.
- RICE, K. C., MANN, E. E., ENDRES, J. L., WEISS, E. C., CASSAT, J. E., SMELTZER, M. S., and BAYLES, K. W. (2007). The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(19):8113-8118.

- RIGAUD, J. L., and LEVY, D. (2003). Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol*, 372:65-86.
- ROSENBERG, A. H., LADE, B. N., CHUI, D. S., LIN, S. W., DUNN, J. J., and STUDIER, F. W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, 56(1):125-135.
- ROUSER, G., FKEISCHER, S., and YAMAMOTO, A. (1970). Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5(5):494-496.
- SAKATA, N., and MUKAI, T. (2007). Production profile of the soluble lytic transglycosylase homologue in *Staphylococcus aureus* during bacterial proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 49(2):288-295.
- SALZBERG, L. I., and HELMANN, J. D. (2007). An antibiotic-inducible cell wall-associated protein that protects *Bacillus subtilis* from autolysis. *J Bacteriol*, 189(13):4671-4680.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., and MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463-5467.
- SANTELLI, E., LIDDINGTON, R. C., MOHAN, M. A., HOCH, J. A., and SZURMANT, H. (2007). The crystal structure of *Bacillus subtilis* YycI reveals a common fold for two members of an unusual class of sensor histidine kinase regulatory proteins. *J Bacteriol*, 189(8):3290-3295.
- SASKOVA, L., NOVAKOVA, L., BASLER, M., and BRANNY, P. (2007). Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 189(11):4168-4179.
- SASS, P. (2005). Klonierung, Expression und Aktivitätsanalyse von Endolysinen aus *Staphylococcus aureus* NCTC8325 mit Untersuchungen zu deren Wirkung auf Staphylokokken-Biofilme. Diplomarbeit, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- SASS, P., and BIERBAUM, G. (2007). Lytic activity of recombinant bacteriophage phi11 and phi12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*, 73(1):347-352.
- SCHÄGGER, H., CRAMER, W. A., and VON JAGOW, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem*, 217(2):220-230.
- SCHLEGEL, H. G. (1992). 2.2.4 Zellwand, p. 50-62. In H. G. Schlegel (ed.), Allgemeine Mikrobiologie.
- SENADHEERA, M. D., GUGGENHEIM, B., SPATAFORA, G. A., HUANG, Y. C., CHOI, J., HUNG, D. C., TREGLOWN, J. S., GOODMAN, S. D., ELLEN, R. P., and CVITKOVITCH, D. G. (2005). A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol*, 187(12):4064-4076.
- SENADHEERA, M. D., LEE, A. W., HUNG, D. C., SPATAFORA, G. A., GOODMAN, S. D., and CVITKOVITCH, D. G. (2007). The *Streptococcus mutans* *vicX* gene product modulates *gtfB/C* expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance. *J Bacteriol*, 189(4):1451-1458.
- SENN, M. M., GIACHINO, P., HOMEROVA, D., STEINHUBER, A., STRASSNER, J., KORMANEC, J., FLUCKIGER, U., BERGER-BACHI, B., and BISCHOFF, M. (2005). Molecular analysis and organization of the sigmaB operon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 187(23):8006-8019.

- SHEMESH, M., TAM, A., FELDMAN, M., and STEINBERG, D. (2006). Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *fff*, *gff* and *vicR* genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. *Carbohydr Res*, 341(12):2090-2097.
- SIEVERT, D. M., RUDRIK, J. T., PATEL, J. B., McDONALD, L. C., WILKINS, M. J., and HAGEMAN, J. C. (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis*, 46(5):668-674.
- SILVERMAN, J. A., PERLMUTTER, N. G., and SHAPIRO, H. M. (2003). Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(8):2538-2544.
- STACK, H. M., SLEATOR, R. D., BOWERS, M., HILL, C., and GAHAN, C. G. (2005). Role for HtrA in stress induction and virulence potential in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 71(8):4241-4247.
- STAPLETON, M. R., HORSBURGH, M. J., HAYHURST, E. J., WRIGHT, L., JONSSON, I. M., TARKOWSKI, A., KOKAI-KUN, J. F., MOND, J. J., and FOSTER, S. J. (2007). Characterization of IsaA and SceD, two putative lytic transglycosylases of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 189(20):7316-7325.
- STER, C., GILBERT, F. B., COCHARD, T., and POUTREL, B. (2005). Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. *Mol Cell Probes*, 19(4):227-235.
- STOCK, A. M., ROBINSON, V. L., and GOUDREAU, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 69:183-215.
- STUDIER, F. W., and MOFFATT, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189(1):113-130.
- STUDIER, F. W., ROSENBERG, A. H., DUNN, J. J., and DUBENDORFF, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 185:60-89.
- SUN, J., ZHENG, L., LANDWEHR, C., YANG, J., and JI, Y. (2005). Identification of a novel essential two-component signal transduction system, YhcSR, in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 187(22):7876-7880.
- SZURMANT, H., BU, L., BROOKS, C. L., 3RD, and HOCH, J. A. (2008). An essential sensor histidine kinase controlled by transmembrane helix interactions with its auxiliary proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(15):5891-5896.
- SZURMANT, H., MOHAN, M. A., IMUS, P. M., and HOCH, J. A. (2007a). YycH and YycI interact to regulate the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 189(8):3280-3289.
- SZURMANT, H., NELSON, K., KIM, E. J., PEREGO, M., and HOCH, J. A. (2005). YycH regulates the activity of the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 187(15):5419-5426.
- SZURMANT, H., WHITE, R. A., and HOCH, J. A. (2007b). Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr Opin Struct Biol*, 17(6):706-715.
- SZURMANT, H., ZHAO, H., MOHAN, M. A., HOCH, J. A., and VARUGHESE, K. I. (2006). The crystal structure of YycH involved in the regulation of the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis* reveals a novel tertiary structure. *Protein Sci*, 15(4):929-934.
- TAYLOR, B. L., and ZHULIN, I. B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(2):479-506.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., and GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22):4673-4680.

- THROUP, J. P., KORETKE, K. K., BRYANT, A. P., INGRAHAM, K. A., CHALKER, A. F., GE, Y., MARRA, A., WALLIS, N. G., BROWN, J. R., HOLMES, D. J., ROSENBERG, M., and BURNHAM, M. K. (2000). A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 35(3):566-576.
- TU QUOC, P. H., GENEVAUX, P., PAJUNEN, M., SAVILAHTI, H., GEORGOPOULOS, C., SCHRENZEL, J., and KELLEY, W. L. (2007). Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 75(3):1079-1088.
- TÜRCK, M. (2004). Untersuchungen zum Zweikomponenten-Regulationssystem VicRK von *Staphylococcus aureus* und dessen Einfluss auf die Vancomycin-Resistenz. Diplomarbeit, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- VALDERAS, M. W., and HART, M. E. (2001). Identification and characterization of a second superoxide dismutase gene (*sodM*) from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 183(11):3399-3407.
- VAN HEIJENOORT, J. (2007). Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(4):620-635.
- VANDENESCH, F., NAIMI, T., ENRIGHT, M. C., LINA, G., NIMMO, G. R., HEFFERNAN, H., LIASSINE, N., BES, M., GREENLAND, T., REVERDY, M. E., and ETIENNE, J. (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*, 9(8):978-984.
- VOLLMER, W., BLANOT, D., and DE PEDRO, M. A. (2008a). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2):149-167.
- VOLLMER, W., JORIS, B., CHARLIER, P., and FOSTER, S. (2008b). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2):259-286.
- WAGNER, C., SAIZIEU AD, A., SCHONFELD, H. J., KAMBER, M., LANGE, R., THOMPSON, C. J., and PAGE, M. G. (2002). Genetic analysis and functional characterization of the *Streptococcus pneumoniae* vic operon. *Infect Immun*, 70(11):6121-6128.
- WANG, L., TRAWICK, J. D., YAMAMOTO, R., and ZAMUDIO, C. (2004). Genome-wide operon prediction in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res*, 32(12):3689-3702.
- WIEGAND, I., HILPERT, K., and HANCOCK, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*, 3(2):163-175.
- WIELAND, B., FEIL, C., GLORIA-MAERCKER, E., THUMM, G., LECHNER, M., BRAVO, J. M., PORALLA, K., and GÖTZ, F. (1994). Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 176(24):7719-7726.
- WIELAND, K. P., WIELAND, B., and GOTZ, F. (1995). A promoter-screening plasmid and xylose-inducible, glucose-repressible expression vectors for *Staphylococcus carnosus*. *Gene*, 158(1):91-96.
- WINKLER, M. E., and HOCH, J. A. (2008). Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, 190(8):2645-2648.
- XIONG, Z., GE, S., CHAMBERLAIN, N. R., and KAPRAL, F. A. (1993). Growth cycle-induced changes in sensitivity of *Staphylococcus aureus* to bactericidal lipids from abscesses. *J Med Microbiol*, 39(1):58-63.
- YAMAMOTO, K., KITAYAMA, T., MINAGAWA, S., WATANABE, T., SAWADA, S., OKAMOTO, T., and UTSUMI, R. (2001). Antibacterial agents that inhibit histidine protein kinase YycG of *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 65(10):2306-2310.

-
- YAN, M., YU, C., YANG, J., and JI, Y. (2009). Development of shuttle vectors for evaluation of essential regulator regulated gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*, 61(3):188-192.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., and MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1):103-119.
- ZAHRT, T. C., and DERETIC, V. (2000). An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 182(13):3832-3838.
- ZAPUN, A., VERNET, T., and PINHO, M. G. (2008). The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2):345-360.

7. Anhang

7.1 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

7.1.1 Berechnung der Kopienzahl für die Standards

Mit der nachstehenden Formel wurde die Kopienzahl der Standards berechnet. Für die Verwendung der Standards in der qRT-PCR wurden diese nachfolgend durch Verdünnung mit PCR-Wasser (Ampuwa®-Wasser, Fa. Fresenius Kabi) auf $2,5 \times 10^{10}$ Kopien/5 μl in einem Zielvolumen von 60 μl eingestellt. Die Standards wurden à 5 μl aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

$$c = \left(\frac{(\text{Plasmid})\text{DNA [g}/\mu\text{l}]}{(\text{Plasmid od. Fragmentgröße [bp]} \times 660 \text{ g/mol})} \right) \times \text{Avogadrozahl } (N_A)$$

Avogadrozahl; $N_A = 6,0221415 \times 10^{23}/\text{mol}$

7.1.2 Kopienstandards in der qRT-PCR

Für die Quantifizierung der Gesamt-Kopienzahl von *yycG* (*vicK*) wurde für das direkt bestimmte Nachweisprodukt (*yycG*-Fragment) das Plasmid pTvicRK (aus *S. aureus* 8325-4 SH1000) als Kopienstandard verwendet. Im Rahmen der qRT-PCRs zur Überprüfung, ob die Expression der *yycFG*-Gene durch das Zwei-Komponentenregulationssystem YycFG autoreguliert ist (Abschnitt 3.5.2), wurde für das indirekte Nachweisprodukt der vektorialen *yycG*-Transkripte (*lip*-Fragment) das Plasmid pTvicRK (aus *S. aureus* 8325-4 SH1000) und für das indirekte Nachweisprodukt der chromosomalen *yycG*-Transkripte (*yycH*-Fragment) das Plasmid pET22b Δ pelByycH (aus *E. coli* BL21(DE3)) als Kopienstandard verwendet. Für die parallele Quantifizierung des endogenen Standards, dem Housekeeping-Gen *gyrB*, wurde in allen Läufen das Plasmid pUC19gyrB (aus *E. coli* K12 JM109) als Kopienstandard verwendet.

7.1.3 Programm-Parameter der Läufe mit dem LightCycler®-Instrument

In Tabelle 7.1 sind die verwendeten Programm-Parameter aufgeführt, die in den Real-Time-PCRs mit dem LightCycler®-Instrument (Fa. Roche) für die Quantifizierungsläufe verwendet wurden.

Tabelle 7.1: Programm-Parameter für die Quantifizierungsläufe der mit dem LightCycler®-Instrument (Fa. Roche) durchgeführten Real-Time-PCRs.

Program:	Denaturation		Type:	None		Cycles:	1
Segment Number	Temp. Target (°C)	Hold Time (s)	Slope (C°/s)	2° Target Temp. (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Aquisition Mode
1	95	600	20	0	0	0	None

Program:	PCR		Type:	Melting Curves		Cycles:	45
Segment Number	Temp. Target (°C)	Hold Time (s)	Slope (C°/s)	2° Target Temp. (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Aquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	51	15	20	0	0	0	None
3	72	15	20	0	0	0	Single

Program:	Melting		Type:	Melting Curves		Cycles:	1
Segment Number	Temp. Target (°C)	Hold Time (s)	Slope (C°/s)	2° Target Temp. (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Aquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	45	15	20	0	0	0	None
3	95	0	0.2	0	0	0	Continuous

Program:	Cooling		Type:	None		Cycles:	1
Segment Number	Temp. Target (°C)	Hold Time (s)	Slope (C°/s)	2° Target Temp. (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Aquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

7.2 Sequenz der *yycFG*-Gene auf pTvicRK / pTvicRK(Y306N)

Für die Konstruktion der Plasmide pTvicRK und pTvicRK(Y306N) sei auf Abschnitt 3.4 dieser Arbeit verwiesen. Als Template für die Klonierungen bei pTvicRK wurde genomische DNA von *S. aureus*-Stamm SA137/93A verwendet.

yycFG (*vicRK*) (2547 bp)

Sequenzabschnitt auf pTvicRK / pTvicRK(Y306N):

```

ATGCAAATGGCTAGAAAAGTTGTTGTAGTTGATGATGAAAAACCGATTGCTGATATTTTAGAATTTAACTTAAA
AAAGAAGGATACGATGTGTACTGTGCATACGATGGTAATGATGCAGTCGACTTAATTTATGAAGAAGAACCAGAC
ATCGTATTACTAGATATCATGTTACCTGGTCGTGATGGTATGGAAGTATGTCGTGAAGTGCACAAAAAATACGAA
ATGCCAATAATAATGCTTACTGCTAAAGATTTCAGAAATTGATAAAGTGCTTGGTTTTAGAACTAGGTGCAGATGAC
TATGTAACGAAACCGTTTTAGTACGCGTGAATTAATCGCACGTGTGAAAGCGAACTTACGTCGTCATTACTCACA
CCAGCACAAGACACTGGAAATGTAACGAATGAAATCACAATTAAGATATTGTGATTTATCCAGACGCATATTCT
ATTAACAAACGTTGGCGAAGATATTGAATTAACACATCGTGAATTTGAATTGTTCCATTATTTATCAAAACATATG
GGACAAGTAATGACACGTGAACATTTATTACAAACAGTATGGGGCTATGATTACTTTGGCGATGTACGTACGGTG
GATGTAACGATTTCGTGTTTTACGTGAAAAGATTGAAGATGATCCGTCACATCCTGAATATATTGTGACGCGTAGA
GGCGTTGGATATTTTCTCCAACAACATGAGTAGAGGTCGAAACGAATGAAGTGGCTAAAAACAACACTCAATCCCTT
CATACTAAACTTGTAAATTGTTTATGTATTACTGATTATCATTGGTATGCAAATTAATCGGGTTATATTTTACAAAT
AACCTTGAAAAAGAGCTGCTTGATAATTTTAAAGAAGAATATTACGCAGTACGCGAAACAATTAGAAATTAGTATT
GAAAAAGTATATGACGAAAAGGGCTCCGTAAATGCACAAAAAGATATTCAAAATTTATTAAGTGAGTATGCCAAC
CGTCAAGAAATTGGAGAAATTCGTTTTATAGATAAAGACCAAATTATTTATGCGACGACGAAAGCAGTCTAACCGT
AGTCTAATCAATCAAAAAGCGAATGATAGTTCTGTCCAAAAAGCACTATCACTAGGACAATCAAAACGATCATTTA
ATTTTAAAAGATTATGGCGGTGGTAAGGACCGTGTCTGGGTATATAATATCCAGTTAAAGTCGATAAAAAAGGTA
ATTGGTAATATTTTATATCGAATCAAAAATTAATGACGTTTTATAACCAATTAATAATAATAAATCAAATATTCATT
GTTGGTACAGCTATTTTATTATTAATCACAGTCATCCTAGGATTTCTTTATAGCGGAACGATTACCAAACCAATC
ACCGATATGCGTAACCAGACGGTCGAAATGTCCAGAGGTAACATAACGCAACGTGTGAAGATTTATGGTAATGAT
GAAATTGGCGAATTAGCTTTAGCATTTAATAAATTGTCTAAACGTGTACAAGAAGCGCAGGCTAATACTGAAAGT
GAGAAACGTAGACTGGACTCAGTTATCACCCATATGAGTGATGGTATTATTGCAACAGACCCCGTGGACGTATT
CGTATCGTCAATGATATGGCACTCAAGATGCTTGGTATGGCGAAAAGAAGACATCATCGGATATTACATGTTAAGT
GTATTAAGTCTTGAAGATGAATTTAAACTGGAAGAAATTCAAGAGAATAATGATAGTTTCTTATTAGATTTAAAT
GAAGAAGAAGGTCTAATCGCACGTGTTAACTTTAGTACGATTGTGCAGGAAAACAGGATTTGTAACCTGGTTATATC
GCTGTGTTACATGACGTAACGAACAACAAGTTGAACGTGAGCGTCGTGAATTTGTTGCCAATGTATCACAT
GAGTTACGTACACCTTTAACTTCTATGAATAGTTACATTGAAGCACTTGAAGAAGGTGCATGGAAAGATGAGGAA
CTTGCGCCACAATTTTTATCTGTTACCCGTGAAGAAACAGAACGAATGATTCGACTGGTCAATGACTTGCTACAG
TTATCTAAAATGGATAATGAGTCTGATCAAATCAACAAAGAAATTTATCGACTTTAACATGTTTCAATTAATAAAT
ATTAATCGACATGAAATGTCTGCGAAAAGATAACAACATTTATTTCGAGATATTCCGAAAAAGACGATTTTCACAGAA
TTTGATCCTGATAAAATGACGCAAGTATTTGATAATGTCATTACAAATGCGATGAAATATTCTAGAGCGGATAAAA
CGTGTGAGTTCCACGTGAAACAAAATCCACTTTATAATCGAATGACGATTTCGTATTTAAAGATAATGGCATTGGT
ATTCCATCAATAAAGTCGATAAGATATTTCGACCGATTCTATCGTGTAGATAAGGCACGTACGCGTAAAAATGGGT
GGTACTGGATTAGGACTAGCCATTTTCGAAAGAGATTGTGGAAGCGCACAAATGGTTCGTATTTGGGCAAAACAGTGTA
GAAGGTCAAGGTACATCTATCTTTATCACACTTCCATGTGAAGTCATTGAAGACGGTGATTTGGGATGAATAA

```

XXX = *yycF* (*vicR*)

XXX = *yycG* (*vicK*)

■ = nicht-stille Mutation auf pTvicRK(Y306N); T → A

7.3 Sequenz der konstitutiv exprimierten Gene *groESL* auf pREP4*groESL*(MT)

Für die Konstruktion des Plasmids pREP4*groESL*(MT) wurde genomische DNA von *E. coli* K12 JM109 als Template und das Plasmid pREP4 aus *E. coli* M15 (Fa. Qiagen) verwendet (Abschnitt 3.7). Das resultierende Plasmid diente der konstitutiven Expression der Chaperoncodierenden Gene *groES* und *groEL* in den *E. coli*-Proteinexpressionsstämmen BL21(DE3), C41(DE3) und C43(DE3).

groESL (1997 bp)

Sequenzabschnitt auf pREP4*groESL*(MT) (aus *E. coli* K12 JM109 Klon 9):

```

AGGAGAGTTATCAATGAATATTCGTCCATTGCATGATCGCGTGATCGTCAAGCGTAAAGAAGTTGAACTAAATC
TGCTGGCGGCATCGTTCTGACCGGCTCTGCAGCGGCTAAATCCACCCGCGCGAAGTGCTGGCTGTCGGCAATGG
CCGTATCCTTGAAAATGGCGAAGTGAAGCCGCTGGATGTGAAAGTTGGCGACATCGTTATTTCAACGATGGCTA
CGGTGTGAAATCTGAGAAGATCGACAATGAAGAAGTGTGATCATGTCCGAAAAGCGACATTCTGGCAATTGTTGA
AGCGTAATCCGCGCACGACACTGAACATACGAATTTAAGGAATAAAGATAATGGCAGCTAAAAGACGTAAAAATTCG
GTAACGACGCTCGTGTGAAAATGCTGCGCGGCGTAAACGTACTGGCAGATGCAGTGAAAGTTACCCCTCGGTCCAA
AAGGCCGTAACGTAGTTCTGGATAAAATCTTTTCGGTGCACCGACCATCACCAAAGATGGTGTTCGGTTGCTCGTG
AAATCGAACTGGAAGACAAGTTCGAAAATATGGGTGCGCAGATGGTGAAAGAAGTTGCCTCTAAAGCAAACGACG
CTGCAGGCGACGGTACCACCACTGCAACCGTACTGGCTCAGGCTATCATCACTGAAGGTCTGAAAGCTGTTGCTG
CGGGCATGAACCCGATGGACCTGAAACGTGGTATCGACAAAGCGGTTACCGTTGCAGTTGAAGAAGCTGAAAGCGC
TGTCCTGATCCATGCTCTGACTCTAAAGCGATTGCTCAGGTTGGTACCATCTCCGCTAACTCCGACGAAACCGTAG
GTAAACTGATCGCTGAAGCGATGGACAAAGTCGGTAAAGAAGGCGTTATCACCGTTGAAGACGGTACCGGTCTGC
AGGACGAACTGGACGTGGTTGAAGGTATGCAGTTCGACCGTGGCTACCTGTCTCCTTACTTTCATCAACAAGCCGG
AAACTGGCGCAGTAGAACTGGAAAGCCCGTTTCATCCTGCTGGCTGACAAGAAAATCTCCAACATCCGCGAAATGC
TGCCGGTTCTGGAAGCTGTTGCCAAAGCAGGCAAACCGCTGCTGATCATCGCTGAAGATGTAGAAGGCGAAGCGC
TGGCAACTCTGGTTGTTAACACCATGCGTGGCATCGTGAAAGTTCGCTGCGGTTAAAGCACCGGGCTTCGGCGATC
GTCGTAAGCTATGCTGCAGGATATCGCAACCGTACTGGCGGTACCGTGATCTCTGAAGAGATCGGTATGGAGC
TGGAAAAAGCAACCCCTGGAAGACCTGGGTGAGGCTAAACGTGTTGTGATCAACAAAGACACCACCTATCATCG
ATGGCGTGGGTGAAGAAGCTGCAATCCAGGGCCGTGTTGCTCAGATCCGTCAGCAGATTGAAGAAGCAACTTCTG
ACTACGACCGTGAAAACTGCAGGAACGCGTAGCGAAACTGGCAGGCGGCGTTGCAGTTATCAAAGTGGGTGCTG
CTACCGAAGTTGAAATGAAAGAGAAAAAAGCACGCGTTGAAGATGCCCTGCACGCGACCCGTTGCTGCGGTAGAAG
AAGGCGTGGTTGCTGGTGGTGGTGTTCGCTGATCCGCGTAGCGTCTAAACTGGCTGACCTGCGTGGTTCAGAACG
AAGACCAGAACGTGGGTATCAAAGTTGCACTGCGTGCAATGGAAGCTCCGCTGCGTCAGATCGTATTGAACTGCG
GCGAAGAACCCTGTTGTTGCTAACACCGTTAAAGGCGGCGACGGCAACTACGGTTACAACGCAGCAACCGAAG
AATACGGCAACATGATCGACATGGGTATCCTGGATCCAACCAAAGTAACTCGTCTGCTCTGCAGTACGCAGCTT
CTGTGGCTGGCCTGATGATCACCACCGAATGCATGGTTACCGACCTGCCGAAAAACGATGCAGCTGACTTAGGCG
CTGCTGGCGGTATGGGCGGCATGGGTGGCATGGGCGGCATGATGTAA

```

XXX = Ribosomenbindestelle (rbs)

XXX = *groES* (294 bp)

XXX = *groEL* (1647 bp)

7.4 Gensequenzen der rekombinant exprimierten Yyc-C-His₆-Proteine

Im Rahmen der Klonierung wurden genomische DNA von *S. aureus* SA137/93A (BIERBAUM et al., 1999; REIPERT et al., 2003) bzw. das Plasmid pTvicRK(Y306N) als Template und das Plasmid pET22bΔ*pelB* als Ausgangsbasis für die anschließende rekombinante Expression der C-terminal His₆-getaggten Proteine YycF, YycG, Yyc(Y308N), YycH und YycI in *E. coli*

verwendet. Für Details sei an dieser Stelle auf die Abschnitte 2.9.1.1, 2.9.1.2 und 3.8 dieser Arbeit verwiesen. Zur Kontrolle der Plasmidintegrität erfolgte nach der Etablierung der Expressionsplasmide in dem *E. coli*-Zwischenwirt K12 JM109 die Sequenzierung der Plasmid-DNA durch die Fa. Sequiserve (Vaterstetten). Nachfolgend sind die DNA-Sequenzen der auf den Expressionsplasmiden codierten Gene aufgeführt. Die Aminosäuresequenzen finden sich unter Punkt 7.6.

***yycF*-C-His₆ (738 bp)**

Sequenzabschnitt auf pET22bΔpelBvicR (aus *E. coli* K12 JM109 Klon 1):

```
ATGGGTATGCAAATGGCTAGAAAAGTTGTTGTAGTTGATGATGAAAAACCGATTGCTGATATTTTAGAATTTAAC
TTAAAAAAGAAGGATACGATGTGTACTGTGCATACGATGGTAATGATGCAGTCGACTTAATTTATGAAGAAGAA
CCAGACATCGTATTACTAGATATCATGTTACCTGGTCGTGATGGTATGGAAGTATGTCGTGAAGTGCACAAAAA
TACGAAATGCCAATAATAATGCTTACTGCTAAAGATTTCAGAAATTGATAAAGTGCTTGGTTTAGAACTAGGTGCA
GATGACTATGTAACGAAACCGTTTGTAGTACGCGTGAATTAATCGCACGTGTGAAAGCGAACTTACGTCGTCATTAC
TCACAACCAGCACAAAGACACTGGAAATGTAACGAATGAAATCACAATTAAGATATTGTGATTTATCCAGACGCA
TATTCTATTAACAAACGTTGGCGAAGATATTGAATTAACACATCGTGAATTTGAATTGTTCCATTATTTATCAAAA
CATATGGGACAAGTAATGACACGTGAACATTTATTACAAACAGTATGGGGCTATGATTACTTTGGCGATGTACGT
ACGGTTCGATGTAACGATTCGTCGTTTACGTGAAAAGATTGAAGATGATCCGTCACATCCTGAATATATTTGTGACC
CGTAGAGGCGTTGGATATTTCTCCAACAACATGAGCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA
```

***yycG*-C-His₆ (1857 bp)**

Sequenzabschnitt auf pET22bΔpelBvicK (aus *E. coli* K12 JM109 Klon 5):

```
ATGGGAATGAAGTGGCTAAAACAACACTACAATCCCTTCATACTAAACTTGTAATTGTTTATGTATTACTGATTATC
ATTGGTATGCAAATTATCGGGTTATATTTTACAAATAACCTTGAAAAAGAGCTGCTTGATAATTTTAAGAAGAAT
ATTACGCAGTACGCGAAACAATTAGAAATTAGTATTGAAAAAGTATATGACGAAAAGGGCTCCGTAATGCACAA
AAAGATATTTCAAATTTTATTAAGTGAGTATGCCAACCGTCAAGAAATTGGAGAAATTCGTTTTATAGATAAAGAC
CAAATTATTATTGCGACGACGAAGCAGTCTAACCGTAGTCTAATCAATCAAAAAAGCGAATGATAGTTCTGTCCAA
AAAGCACTATCACTAGGACAATCAAACGATCATTTAATTTTAAAAAGATTATGGCGGTGGTAAGGACCGTGTCTGG
GTATATAATATCCCAGTTAAAGTGCATAAAAAGGTAATTTGGTAATATTTATATCGAATCAAAAAATTAATGACGTT
TATAACCAATTAATAATATAAATCAAATATTCATTGTTGGTACAGCTATTTCAATTAATCACAGTCATCCTA
GGATTCTTTATAGCGCGAACGATTACCAAACCAATCACCGATATGCGTAACCAGACGGTTCGAAATGTCCAGAGGT
AACTATACGCAACGTGTGAAGATTTATGGTAATGATGAAATTTGGCGAATTAGCTTTAGCATTTAATAACTTGTCT
AAACGTGTACAAGAAGCGCAGGCTAATACTGAAAGTGAGAAACGTAGACTGGACTCAGTTATCACCCATATGAGT
GATGGTATTATTGCAACAGACCCGCGTGGACGTATTCGTATCGTCAATGATATGGCACTCAAGATGCTTGGTATG
GCGAAAGAAGACATCATCGGATATTACATGTTAAGTGTATTAAGTCTTGAAGATGAATTTAAACTGGAAGAAAT
CAAGAGAATAATGATAGTTTTCTTATTAGATTTAAATGAAGAAGAAGGTCTAATCGCACGTGTTAACTTTAGTACG
ATTGTGCAGGAAACAGGATTTGTAACCTGGTTATATCGCTGTGTTACATGACGTAACCTGAACAACAACAAGTTGAA
CGTGAGCGTCTGTAATTTGTTGCCAATGTATCACATGAGTTACGTACACCTTTAACTTCTATGAATAGTTACATT
GAAGCACTTGAAGAAGGTGCATGGAAAGATGAGGAACCTTGCGCCACAATTTTTATCTGTTACCCGTGAAGAAACA
GAACGAATGATTCGACTGGTCAATGACTTGTCTACAGTTATCTAAAATGGATAATGAGTCTGATCAAATCAACAAA
GAAATTATCGACTTTAACATGTTTCATTAATAAAATTTAATCGACATGAAATGTCTGCGAAAGATACAACATTT
ATTCGAGATATTCGAAAAAGACGATTTTTCACAGAATTTGATCCTGATAAAAATGACGCAAGTATTTGATAATGTC
ATTACAAATGCGATGAAATATTCTAGAGGCGATAAACGTGTGCGAGTTCCACGTGAAACAAAATCCACTTTATAAT
CGAATGACGATTCGTATTAAGATAATGGCATTGGTATTCTATCAATAAAGTGCATAAGATATTCGACCGATTTC
TATCGTGTAGATAAGGCACGTACGCGTAAAATGGGTGGTACTGGATTAGGACTAGCCATTTTCGAAAAGAGATTGTG
GAAGCGACAATGGTTCGATTTTGGGCAAAACAGTGTAGAAGGTCAAGGTACATCTATCTTTATCACACTTCCATGT
GAAGTCATTGAAGACGGTATTGGGATGAACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA
```

***yycG*(Y308N)-C-His₆ (1857 bp)**

Sequenzabschnitt auf pET22bΔpelBvicK(Y308N) (aus *E. coli* K12 JM109 Klon 18):

ATGGGAATGAAGTGGCTAAAACAACACTACAATCCCTTCATACTAAACTTGTAAATTGTTTATGTATTACTGATTATC
 ATTGGTATGCAAATTATCGGGTTATATTTTTACAAATAACCTTGAAAAAGAGCTGCTTGATAATTTTAAAGAAAT
 ATTACGCAGTACGCGAAACAATTAGAAATTAGTATTGAAAAAGTATATGACGAAAAAGGCTCCGTAAATGCACAA
 AAAGATATTCAAATTTTATTAAGTGAGTATGCCAACCGTCAAGAAATTTGGAGAAATTCGTTTTATAGATAAAGAC
 CAAATTATTATTGCGACGACGAAGCAGTCTAACCGTAGTCTAATCAATCAAAAAAGCGAATGATAGTTCTGTCCAA
 AAAGCACTATCACTAGGACAATCAAACGATCATTTAATTTTTAAAAGATTATGGCGGTGGTAAGGACCGTGTCTGG
 GTATATAATATCCCAGTTAAAGTCGATAAAAAGGTAATTTGGTAATATTTTATATCGAATCAAAAAATTAATGACGTT
 TATAACCAATTAATAATATAAATCAAATATTCATTGTTGGTACAGCTATTTCAATTATTAATCACAGTCATCCTA
 GGATTCTTTATAGCGCGAACGATTACCAAACCAATCACCGATATGCGTAACCAGACGGTCGAAATGTCCAGAGGT
 AACTATACGCAACGTGTGAAGATTTATGGTAATGATGAAATTTGGCGAATTAGCTTTAGCATTTAATAACTTGTCT
 AAACGTGTACAAGAAGCGCAGGCTAATACTGAAAAGTGAGAAACGTAGACTGGACTCAGTTATCACCCATATGAGT
 GATGGTATTATTGCAACAGACCGCCGTGGACGTTATTCGTATCGTCAATGATATGGCACTCAAGATGCTTGGTATG
 GCGAAAGAAGACATCATCGGAATTACATGTTAAGTGTATTAAGTCTTGAAGATGAATTTAAACTGGAAAGAAAT
 CAAGAGAATAATGATAGTTTCTTATTAGATTTAAATGAAGAAGAAGGTCTAATCGCACGTGTTAACTTTAGTACG
 ATTGTGCAGGAAACAGGATTTGTAACCTGGTTATATCGCTGTGTTACATGACGTAACGAACAACAAGTTGAA
 CGTGAGCGTCTGTAATTTGTTGCCAATGTATCACATGAGTTACGTACACCTTTAACTTCTATGAATAGTTACATT
 GAACGAATGAAGAAGGTGCATGGAAAGATGAGGAACCTTGCGCCACAATTTTTATCTGTTACCCGTGAAGAAACA
 GAACGAATGATTGACTGGTCAATGACTTGCTACAGTTATCTAAAATGGATAAATGAGTCTGATCAAATCAACAAA
 GAAATTATCGACTTTAACATGTTTCATTAATAAAAATTATTAATCGACATGAAATGTCTGCGAAAAGATACAACATTT
 ATTCGAGATATTCGAAAAAGACGATTTTTACAGAATTTGATCCTGATAAAAATGACGCAAGTATTTGATAATGTC
 ATTACAAATGCGATGAAATATTCTAGAGGCGATAAACGTGTGAGTTCCACGTGAAAACAAAATCCACTTTATAAT
 CGAATGACGATTTCGTATTAAGATAATGGCATTGGTATTCTATCAATAAAGTCGATAAGATATTCGACCGATTTC
 TATCGTGTAGATAAGGCACGTACGCGTAAAATGGGTGGTACTGGATTAGGACTAGCCATTTGAAAAGAGATTGTG
 GAAGCGCACAAATGGTTCGTATTTGGGCAAACAGTGTAGAAGGTCAAGGTACATCTATCTTTATCACACTTCCATGT
 GAAGTCATTGAAGACGGTGTATTGGGATGAACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

***yycH*-C-His₆ (1392 bp)**

Sequenzabschnitt auf pET22bΔpelByyH (aus *E. coli* K12 JM109 Klon 15):

ATGGGTGTGAAGTCATTGAAGACGGTGATTGGGATGAATAATAAGGAGCATATTTAAATCTGTCAATTTTAGCACTA
 CTCGTCTTGATGAGTGTGCTATTGACATATATGGTATGGAACTTTTCTCCTGATATTGCAAAATGTCGACAATACA
 GATAGTAAGAAGAGTGAACGAAACCTTTAACGACACCTATGACAGCCAAAATGGATACAACATATTACGCCATTT
 CAGATTATTCATTGAAAAATGATCATCCAGAAGGAACGATTGCGACGGTATCTAATGTGAATAAACTGACGAAA
 CCTTTGAAAAATAAAGAAGTGAAGTCCGTGGAACATGTTTCGTGATCATAACTTGATGATTCCTGATTTGAAC
 AGTGATTTTTATATTATTTCGATTTTACGTATGATTTACCGTTATCAACATATCTTGGTCAAGTACTGAACATGAAT
 GCGAAAGTACCAAATCATTTCAATTTCAATCGTTTGGTCATAGATCATGATGCTGATGATAAATATCGTCTTTAT
 GCTATAAGCAAAGATCGCCACGATTACGTAAAATTAACAACACTACAACGAAAAATGATCATTTTTTTAGATGCATTA
 GCAGCAGTGA AAAAAGATATGCAACCATAACAGATATCATCACAAAACAAAAGATAACAATTTGATCGTACGACGCAT
 GTTTTTGCACCAAGTAAACCTGAAAAGTTAAAAACATATCGCATGGTATTTAACACGATTAGTGTGAGAAAAATG
 AATGCTATACTATTTGACGATTCAACCATCGTTTCGTAGTTCAAAGAGTGGTGTACAACTACAACAATAATACA
 GGTGTGCAAACTATAACGATAAAAATGAAAAATATCATTATAAAAACTGTCCGAAGATGAAGCGAGTTCCAGC
 AAAATGGAAGAAACGATTCCAGGAACCTTTGATTTTATTAATGGTCATGGTGGTTTCTTAAACGAAGACTTTAGA
 TTGTTTAGTACGAATAATCAGTCAGGCGAGTTAACATATCAACGTTTCTTAAATGGTTATCCAACGTTTAAATAAA
 GAAGTTCTAATCAAATTCAGTCACTTGGGGTGAAAAGGCGTCTTTGACTATCGTCTGTTATTACGCACC
 GACGTTGTTTTAAATAGTGAGGATAATAAATCGTTGCCGAAATTAGAGTCTGTACGTTCAAGCTTAGCGAACAAAT
 AGTGATATTAATTTGAAAAAGTAACAACATCGCTATCGGTTACGAAATGCAGGATAATTCAGATCATAATCAC
 ATTTGAAGTGCAGATTAACAGTGAACCTCGTACCGGTTGGTATGTAGAATATGATGGCGAATGGTATGTTTATAAC
 GATGGGAGGCTTGAACCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

yycI-C-His₆ (819 bp)

Sequenzabschnitt auf pET22bΔpelByycI (aus *E. coli* K12 JM109 Klon 1):

```
ATGGGAATGAACTGAAACTGACAAAGACACTTTTCATTTTCGTGTTTATTCTTGTCAACATCGTGTTAGTATCG
ATTTATGTTAATAAAGTCAATCGCTCACACATTAATGAAGTCGAGAGTAACAATGAAGTTAATTTTCAGCAAGAA
GAAATTAAGTACCGACTAGTATATTGAATAAATCAGTTAAAGGTATAAAAATTAGAGCAAATTACAGGGCGATCA
AAAGACTTTAGTTCTAAAGCTAAAGGCGATTTCGGATTTGACCACATCAGATGGTGGAAAAATTATTGAATGCGAAC
ATTAGTCAATCGGTAAAGGTCAGTGACAATAACTTAAAAGATTTGAAAAGATTATGTTAACAAGCGCGTATTTAAA
GGTGCTGAATATCAATTAAGCGAGATTAGTTTCAGATTCTGTAAAATATGAACAAACGTATGATGATTTTCCGATT
TTAAATAACAGTAAAGCGATGTTGAACTTTAATATAGAAGATAACAAAGCGACTAGTTATAAACAATCAATGATG
GATGACATTAAGCCACAGATGGTGCAGATAAGAAGCATCAAGTGATTGGTGTGAGAAAAGCAATCGAGGCATTA
TATTATAATCGTTACTTGAAGAAAAGGTGATGAAGTCATTAATGCTAGACTCGGTTACTACTCAGTCGTGAATGAA
ACGAATGTTCAATTGTTACAACCAAACCTGGGAAATTAAGTGAAGCATGACGGTAAGGATAAAAACGAATACTTAC
TATGTCGAAGCGACAAATAAACCCTAAAATTATTAATCATCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
```

7.5 Vektorkarten

Alle Vektorkarten wurden unter Verwendung der Freeware „pDRAW32 DNA Analysis Software“ (<http://www.acaclone.com/>) erstellt. Einfache Restriktase-Schnittstellen sind in „schwarz“ und doppelte Restriktase-Schnittstellen sind in „grau“ eingezeichnet.

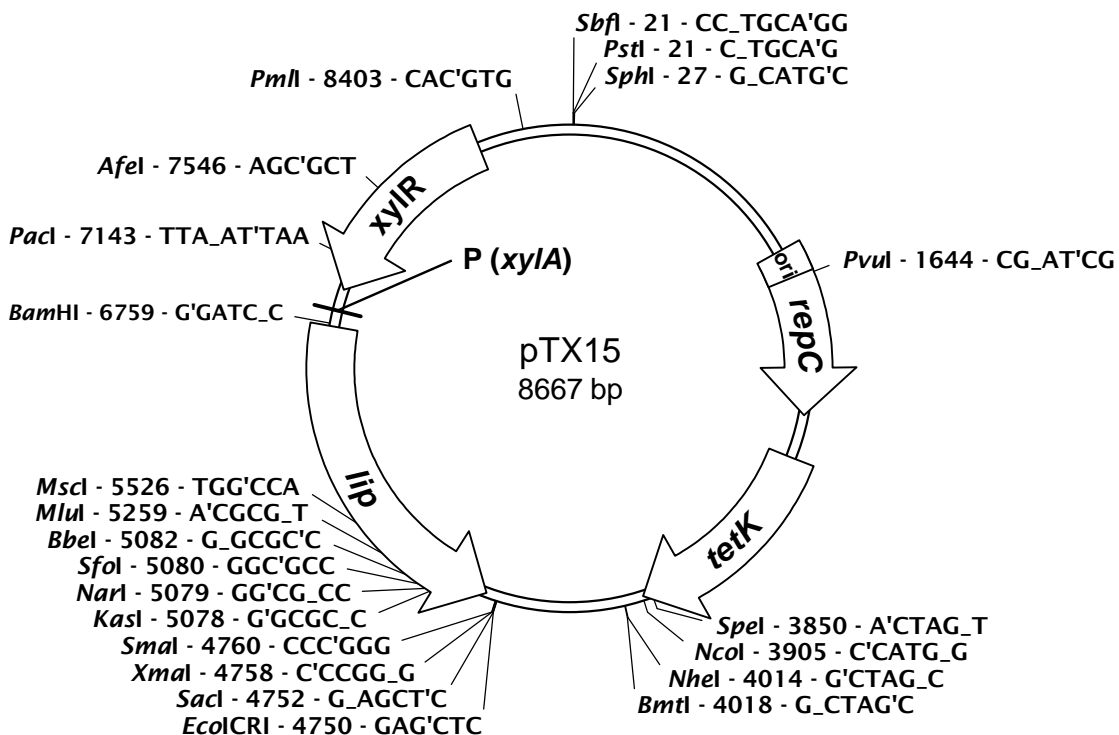
7.5.1 pTX15

Abbildung 7.1: Vektorkarte von pTX15.

7.5.2 pTvicRK / pTvicRK(Y306N)

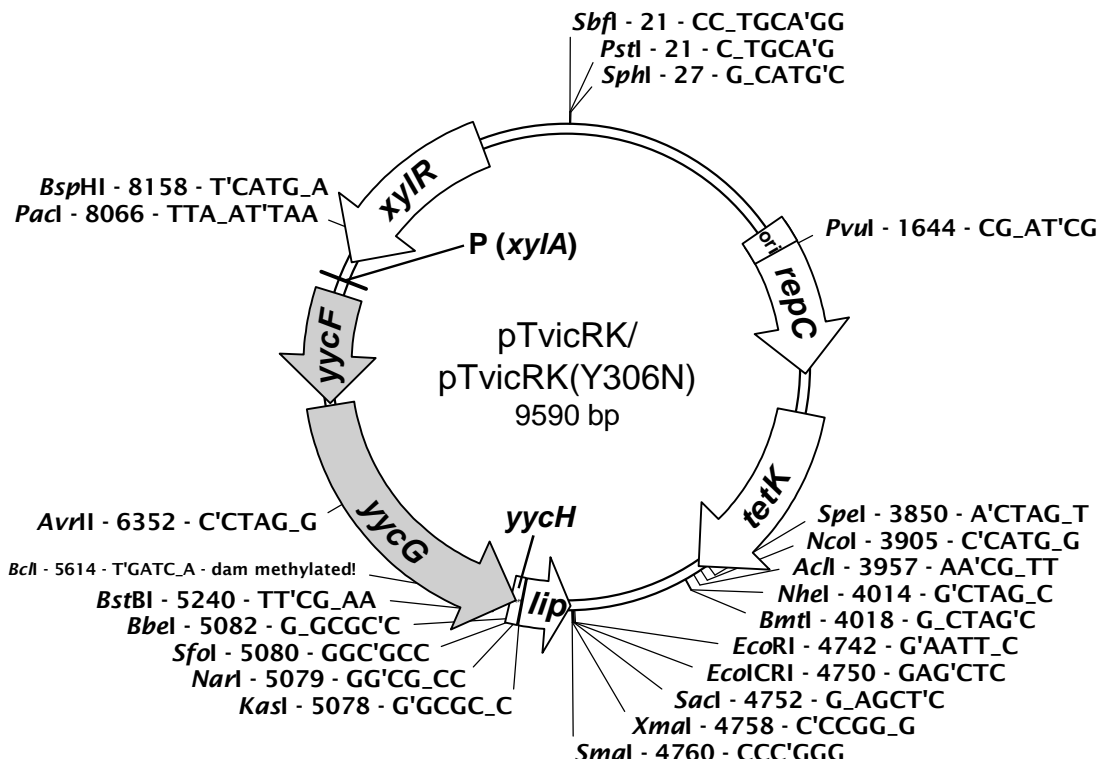


Abbildung 7.2: Vektorkarte von pTvicRK bzw. pTvicRK(Y306N)

7.5.3 pREP4

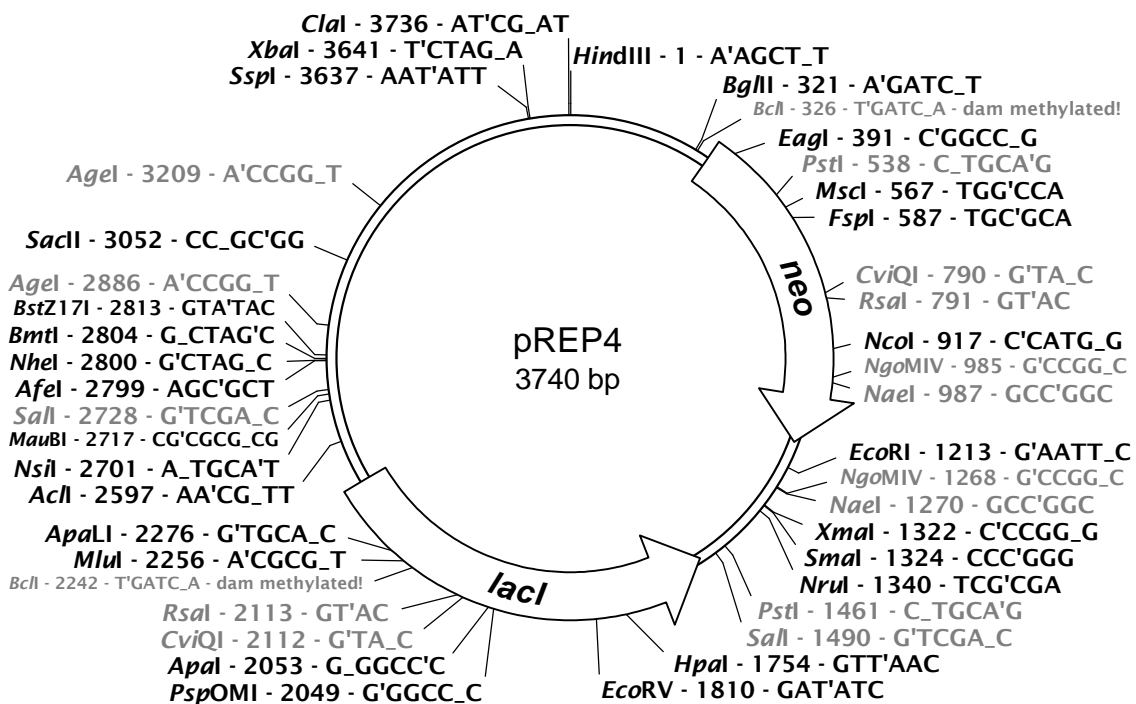


Abbildung 7.3: Vektorkarte von pREP4. Sequenz (A25856) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

7.5.4 pREP4groESL(MT)

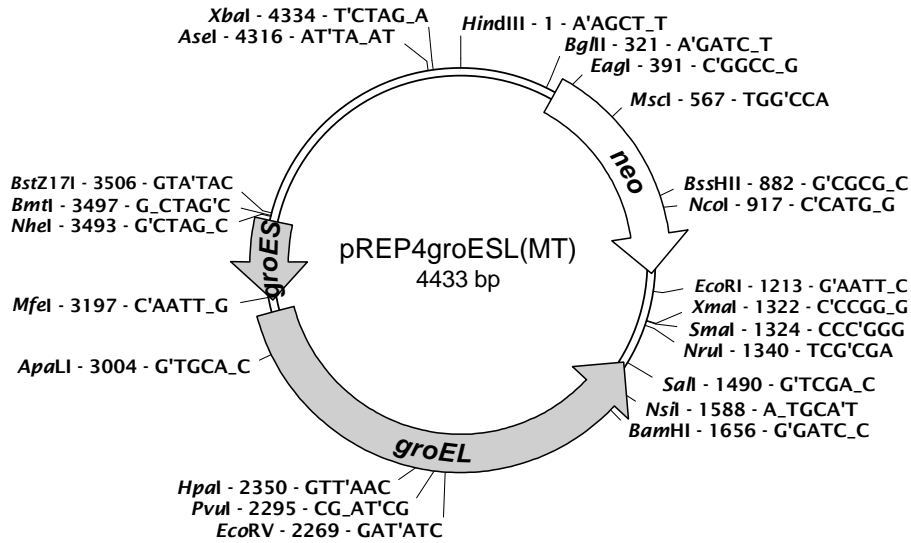


Abbildung 7.4: Vektorkarte von pREP4groESL(MT).

7.5.5 pET22b

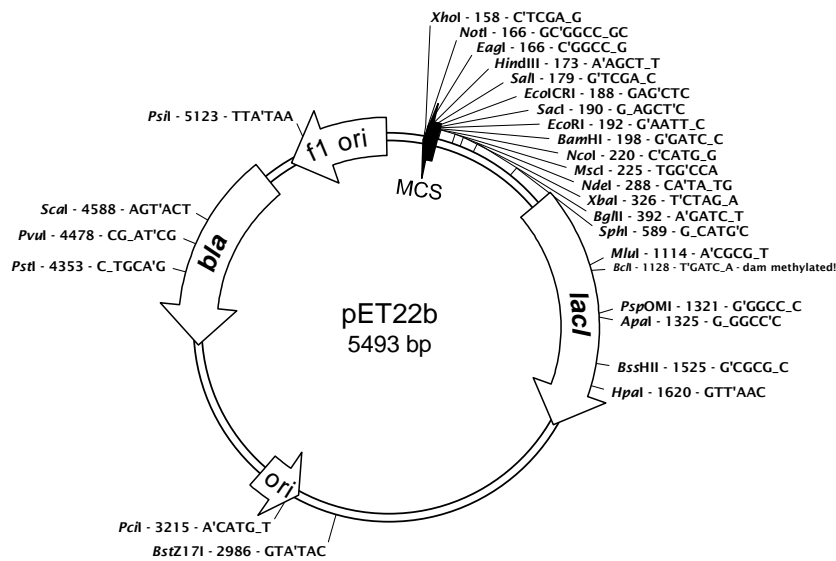


Abbildung 7.5: Vektorkarte und Übersicht der Klonierungs- und Überexpressionsregion von pET22b.

7.5.6 pET22bΔpelB

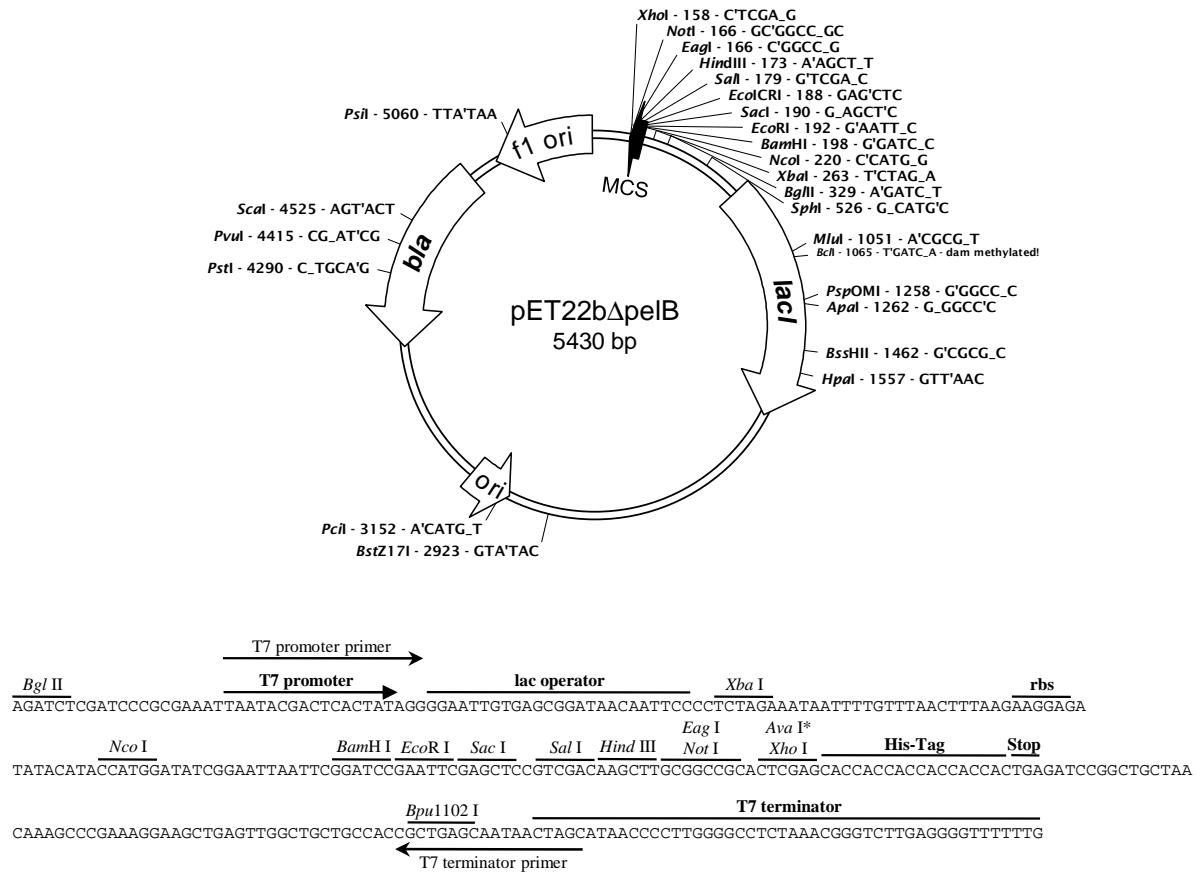


Abbildung 7.6: Vektorkarte und Übersicht der Klonierungs- und Überexpressionsregion von pET22bΔpelB.

7.5.7 pET22bΔpelBvicR

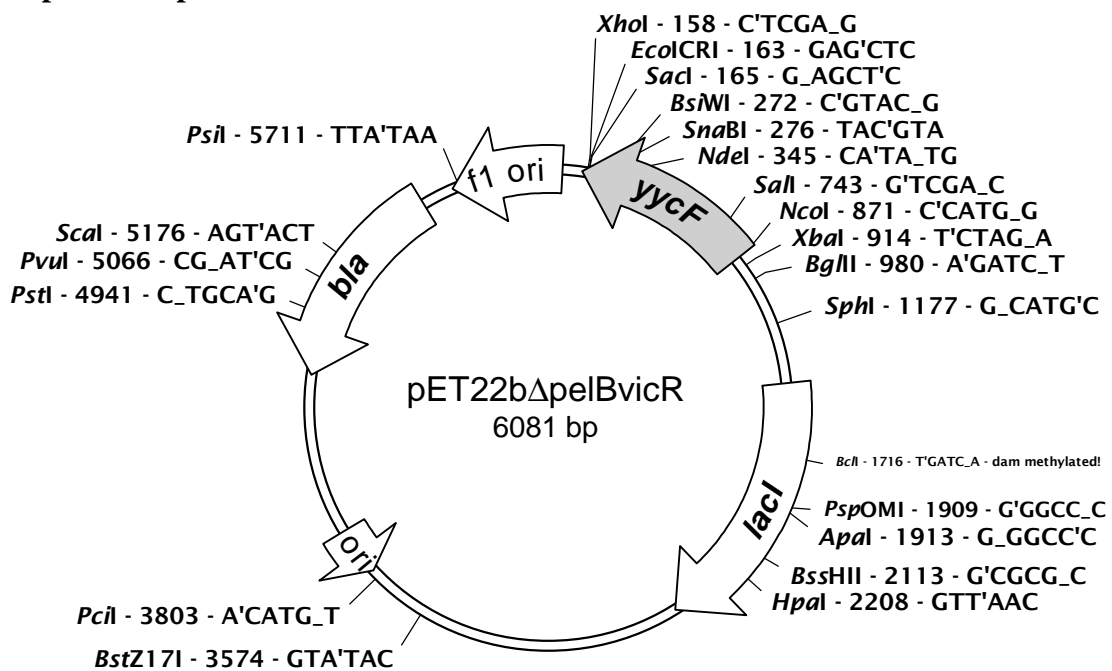


Abbildung 7.7: Vektorkarte von pET22bΔpelBvicR.

7.5.8 pET22bΔpelBvicK

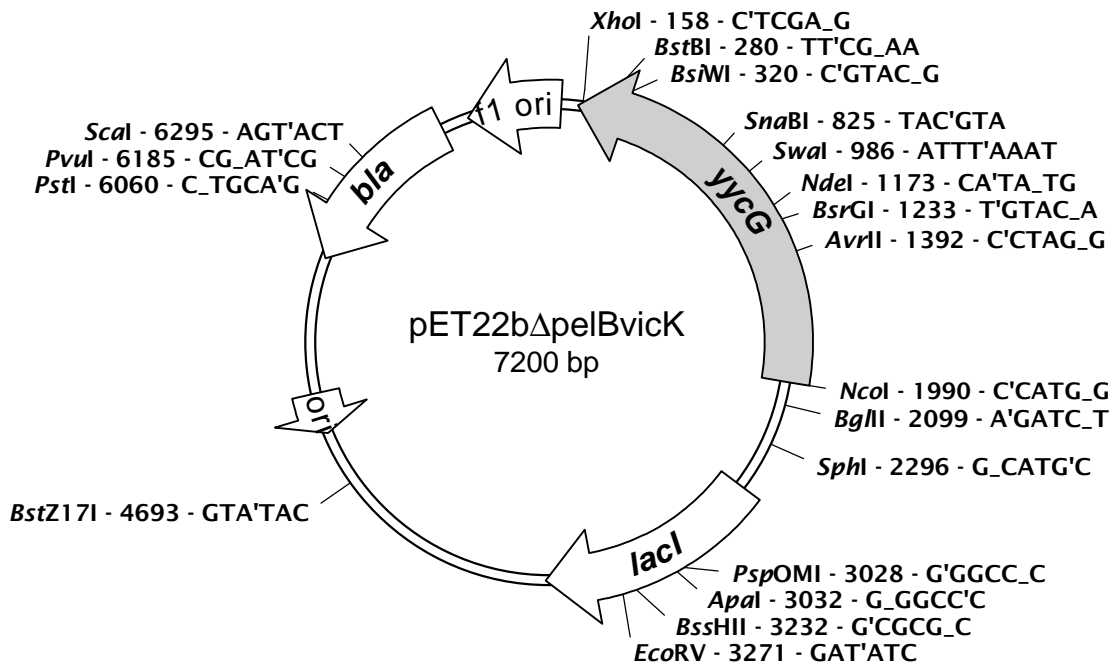


Abbildung 7.8: Vektorkarte von pET22bΔpelBvicK.

7.5.9 pET22bΔpelBvicK(Y308N)

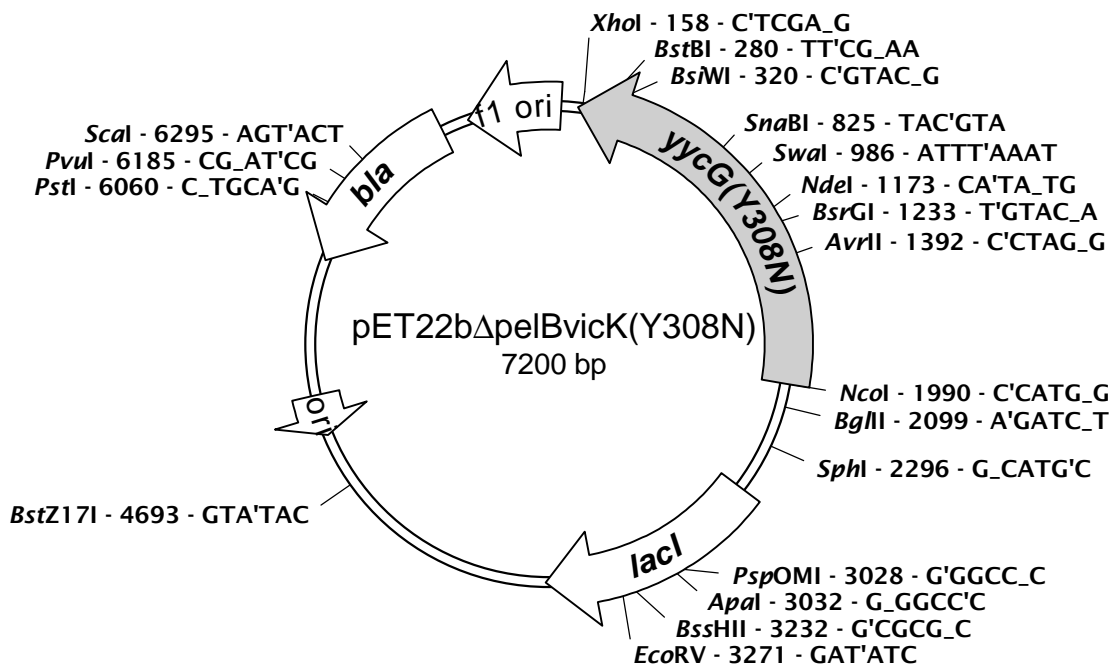


Abbildung 7.9: Vektorkarte von pET22bΔpelBvicK(Y308N).

7.5.10 pET22b Δ pelByychH

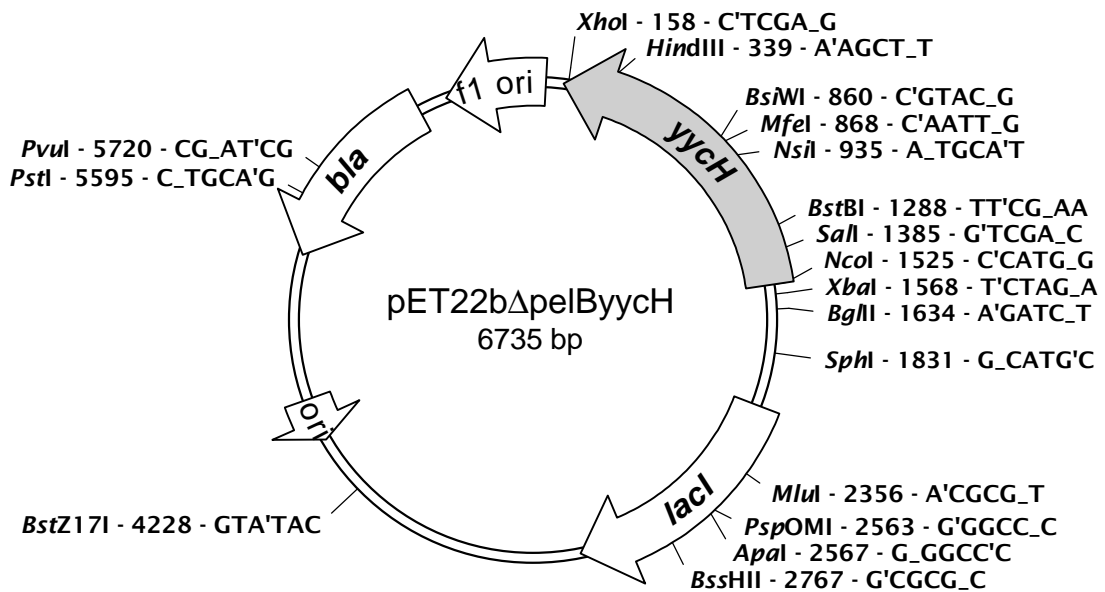


Abbildung 7.10: Vektorkarte von pET22b Δ pelByychH.

7.5.11 pET22b Δ pelByycl

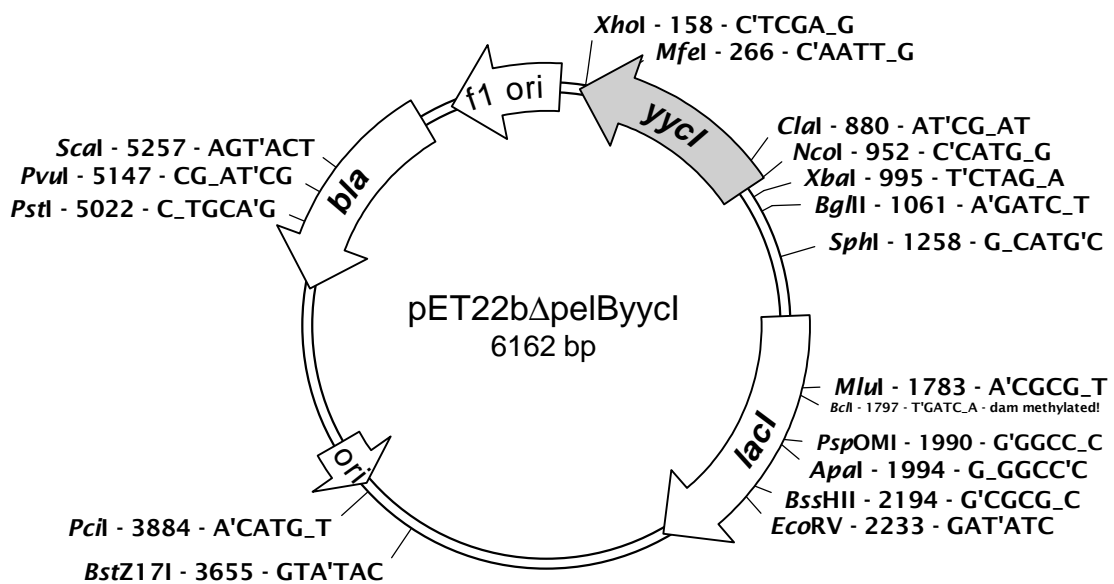


Abbildung 7.11: Vektorkarte von pET22b Δ pelByycl.

7.6 Theoretische Betrachtung der Yyc-C-His₆-Proteinparameter

Die Ermittlung der Parameter für die C-His₆-getaggen *S. aureus*-Proteine YycFGHI und YycG(Y308N), die in *E. coli* rekombinant exprimiert wurden, erfolgte *in silico*. Die durch Sequenzierung (Fa. Sequiserve, Vaterstetten) der Expressionsvektoren ermittelten DNA-Sequenzen (Abschnitt 7.4) wurden dazu verwendet, um mit Online-Analyse-Tools (siehe Abschnittsende) erst die Aminosäuresequenzen und nachfolgend die Proteineigenschaften zu bestimmen. Nachfolgend sind einige der so ermittelten Parameter aufgeführt.

YycF-C-His₆

Amino acid sequence (<http://au.expasy.org/tools/> → Translate tool):

MGMQMARKVVVVVDEKPIADILEFNLKKEGYDVYCAYDGNDAVDLIYEEEPDIVLLDIMLPGRDGMVCREVRRK
YEMPIIMLTAKDSEIDKVLGLELGADDYVTKPFSTRELIARVKANLRRHYSQPAQDTGNVTNEITIKDIVIYPDA
YSIKKRGEDIELTHREFELFHLYLSKHMGMQVMTREHLLQTVWGYDYFGDVRTVDVTIRRLREKIEDDP SHPEYIVT
RRGVGYFLQQHELEHHHHHH-

Protein parameters (<http://au.expasy.org/tools/> → ProtParam):

Number of amino acids: 245

Molecular weight: 28704.6

Theoretical pI: 5.37

Amino acid composition:

Ala (A)	10	4.1%
Arg (R)	17	6.9%
Asn (N)	5	2.0%
Asp (D)	23	9.4%
Cys (C)	2	0.8%
Gln (Q)	7	2.9%
Glu (E)	23	9.4%
Gly (G)	14	5.7%
His (H)	13	5.3%
Ile (I)	18	7.3%
Leu (L)	20	8.2%
Lys (K)	15	6.1%
Met (M)	9	3.7%
Phe (F)	6	2.4%
Pro (P)	9	3.7%
Ser (S)	6	2.4%
Thr (T)	12	4.9%
Trp (W)	1	0.4%
Tyr (Y)	14	5.7%
Val (V)	21	8.6%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 46

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 32

YycG-C-His₆**Amino acid sequence** (<http://au.expasy.org/tools/> → Translate tool):

MGMKWLKQLQSLHTKLVIVYVLLIIIGMQIIIGLYFTNNLEKELLDNFKKNITQYAKQLEISIEKVYDEKGSVNAQ
 KDIQNLLSEYANRQEIGEIRFIDKDQII IATTKQSNRSLINQKANDSSVQKALSLGQSNLHLILKDYGGGKDRVW
 VYNIPVKVDKKVIGNIYIESKINDVYNQLNINQIFIVGTAISLLITVILGFFIARTITKPIITDMRNQTVEMSRG
 NYTQRVKIYGNDIEGELALAFNNLSKRVQEAQANTESEKRRLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGM
 AKEDIIGYYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNDSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIVQETGFVTGYIAVLHDVTEQQQVE
 RERREFVANVSHELRTPLTSMNSYIEALEEGAWKDEELAPQFLSVTREETERMIRLVNDLLQLSKMDNESDQINK
 EIIDFNMFINKI INRHEMSAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVITNAMKYSRGDKRVEFHVKQNPLYN
 RMTIRIKDNGIGIPINKVDKIFDRFYRVDKARTRKMGGTGLGLAISKEIVEAHNGRIWANSVEGQGTSIFITLPC
 EVIEDGDWDELEHHHHHH-

Protein parameters (<http://au.expasy.org/tools/> → ProtParam):

Number of amino acids: 618

Molecular weight: 71177.3

Theoretical pI: 5.75

Amino acid composition:

Ala (A)	27	4.4%
Arg (R)	34	5.5%
Asn (N)	45	7.3%
Asp (D)	40	6.5%
Cys (C)	1	0.2%
Gln (Q)	30	4.9%
Glu (E)	50	8.1%
Gly (G)	34	5.5%
His (H)	14	2.3%
Ile (I)	69	11.2%
Leu (L)	51	8.3%
Lys (K)	44	7.1%
Met (M)	19	3.1%
Phe (F)	23	3.7%
Pro (P)	9	1.5%
Ser (S)	32	5.2%
Thr (T)	34	5.5%
Trp (W)	5	0.8%
Tyr (Y)	18	2.9%
Val (V)	39	6.3%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 90

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 78

YycG(Y308N)-C-His₆**Amino acid sequence** (<http://au.expasy.org/tools/> → Translate tool):

MGMKWLKQLQSLHTKLVIVYVLLIIIGMQIIIGLYFTNNLEKELLDNFKKNITQYAKQLEISIEKVYDEKGSVNAQ
 KDIQNLLSEYANRQEIGEIRFIDKDQII IATTKQSNRSLINQKANDSSVQKALSLGQSNLHLILKDYGGGKDRVW
 VYNIPVKVDKKVIGNIYIESKINDVYNQLNINQIFIVGTAISLLITVILGFFIARTITKPIITDMRNQTVEMSRG
 NYTQRVKIYGNDIEGELALAFNNLSKRVQEAQANTESEKRRLDSVITHMSDGI IATDRRGRIRIVNDMALKMLGM
 AKEDIIGNYMLSVLSLEDEFKLEEIQENNSFLLDLNEEEGLIARVNFSTIVQETGFVTGYIAVLHDVTEQQQVE
 RERREFVANVSHELRTPLTSMNSYIEALEEGAWKDEELAPQFLSVTREETERMIRLVNDLLQLSKMDNESDQINK
 EIIDFNMFINKI INRHEMSAKDTTFIRDIPKKTIFTEFDPDKMTQVFDNVITNAMKYSRGDKRVEFHVKQNPLYN
 RMTIRIKDNGIGIPINKVDKIFDRFYRVDKARTRKMGGTGLGLAISKEIVEAHNGRIWANSVEGQGTSIFITLPC
 EVIEDGDWDELEHHHHHH-

Protein parameters (<http://au.expasy.org/tools/> → ProtParam):

Number of amino acids: 618

Molecular weight: 71128.2

Theoretical pI: 5.75

Amino acid composition:

Ala (A)	27	4.4%
Arg (R)	34	5.5%
Asn (N)	46	7.4%
Asp (D)	40	6.5%
Cys (C)	1	0.2%
Gln (Q)	30	4.9%
Glu (E)	50	8.1%
Gly (G)	34	5.5%
His (H)	14	2.3%
Ile (I)	69	11.2%
Leu (L)	51	8.3%
Lys (K)	44	7.1%
Met (M)	19	3.1%
Phe (F)	23	3.7%
Pro (P)	9	1.5%
Ser (S)	32	5.2%
Thr (T)	34	5.5%
Trp (W)	5	0.8%
Tyr (Y)	17	2.8%
Val (V)	39	6.3%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 90

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 78

YycH-C-His₆**Amino acid sequence** (<http://au.expasy.org/tools/> → Translate tool):

MGVKS LKTVIGMNNKEHIKSVILALLV LMSVVLTYMVWNFSPDIANVDNTDSKKSETKPLTTPMTAKMDTTITPF
 QIIH SKNDHPEGTIATVSNV NKLTKPLKNKEVK SVEHVRRDHNLMI PDLNSDFILFDFTYDLPLSTYLGQVLNMN
 AKVPNHFNRLVIDHDADDNIVLYAISKDRHDYVKLT'TT'KN DHFLDALAAVKKDMQPYTDIITNKDTIDRTH
 VFAPSKPEK LKTYRMVFNTISVEKMNA I LFD DSTIVR SSKSGVTTYNNTGVANYNDKNEKYHYKNLSEDEASS
 KMEETIPGTFDFINGHGGFLNEDFRLFSTNNQSGELTYQRFLNGYPTFNKEGSNQIQVTWGEKGVFDYRRSLLRT
 DVVLNSEDNKSLPKLESVRSSLANNSDINFEKVTNIAIGYEMQDNSDHNHIEVQINSELVPRWYVEYDGEWYVYN
 DGRLELEHHHHHH-

Protein parameters (<http://au.expasy.org/tools/> → ProtParam):

Number of amino acids: 463

Molecular weight: 53104.5

Theoretical pI: 5.92

Amino acid composition:

Ala (A)	16	3.5%
Arg (R)	15	3.2%
Asn (N)	45	9.7%
Asp (D)	36	7.8%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	9	1.9%
Glu (E)	26	5.6%
Gly (G)	18	3.9%
His (H)	20	4.3%
Ile (I)	27	5.8%
Leu (L)	37	8.0%
Lys (K)	35	7.6%
Met (M)	13	2.8%
Phe (F)	20	4.3%
Pro (P)	16	3.5%
Ser (S)	34	7.3%
Thr (T)	38	8.2%
Trp (W)	4	0.9%
Tyr (Y)	19	4.1%
Val (V)	35	7.6%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 62

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 50

YycI-C-His₆**Amino acid sequence** (<http://au.expasy.org/tools/> → Translate tool):

MGMNWKLTKTLLFIFVFIILVNIIVLVSIIYVNVNRSHINEVESNNEVNFQQEEIKVPTSILNKSIVKGIKLEQITGRS
KDFSSKAKGSDSLTTSDDGGKLLNANISQSVKVSDDNLLKDLKDYVNRVFKGAEYQLSEISSDSVKYEQTYDDFPI
LNNSKAMLNFNIEDNKATSYKQSMDDIKPTDGADKKHQVIGVRKAIEALYYNRYLKKGDEVINARLGYYSVVNE
TNVQLLQPWEIKVKHDGKDKTNTYYVEATNNPKIINHLEHHHHHHH-

Protein parameters (<http://au.expasy.org/tools/> → ProtParam):

Number of amino acids: 272

Molecular weight: 31185.2

Theoretical pI: 8.69

Amino acid composition:

Ala (A)	10	3.7%
Arg (R)	6	2.2%
Asn (N)	29	10.7%
Asp (D)	18	6.6%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	10	3.7%
Glu (E)	16	5.9%
Gly (G)	12	4.4%
His (H)	10	3.7%
Ile (I)	20	7.4%
Leu (L)	20	7.4%
Lys (K)	31	11.4%
Met (M)	5	1.8%
Phe (F)	8	2.9%
Pro (P)	5	1.8%
Ser (S)	21	7.7%
Thr (T)	13	4.8%
Trp (W)	2	0.7%
Tyr (Y)	13	4.8%
Val (V)	23	8.5%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 34

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 37

Informationen und Weblinks zu den für die Berechnungen verwendeten Online-Tools:

ExPASy (<http://www.expasy.org/>):

“The ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Geneva, is dedicated to the analysis of protein sequences and structures as well as 2-D PAGE.”

Translate tool (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>):

“Translate is a tool which allows the translation of a nucleotide (DNA/RNA) sequence to a protein sequence.”

ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>):

“ProtParam is a tool which allows the computation of various physical and chemical parameters for a given protein stored in Swiss-Prot*¹ or TrEMBL*² or for a user entered sequence. The computed parameters include the molecular weight, theoretical pI, amino acid composition, atomic composition, extinction coefficient, estimated half-life, instability index, aliphatic index and grand average of hydropathicity (GRAVY).”

*¹**Swiss-Prot** (Protein knowledgebase): “a curated protein sequence database which strives to provide a high level of annotation (such as the description of the function of a protein, its domains structure, post-translational modifications, variants, etc.), a minimal level of redundancy and high level of integration with other databases”.

*²**TrEMBL** (Computer-annotated supplement to Swiss-Prot): “a computer-annotated supplement of Swiss-Prot that contains all the translations of EMBL (European Molecular Biology Laboratory; <http://www.embl-heidelberg.de/>) nucleotide sequence entries not yet integrated in Swiss-Prot.”

7.7 Laufhöhe der Markerproteine in der BN-PAGE

Das Molekulargewicht und der oligomere Status der löslichen Markerproteine beziehen sich auf die Herstellerangaben, experimentelle Arbeiten in der Literatur bzw. wurden selbst unter den in der BN-PAGE vorherrschenden Bedingungen ermittelt (Tabelle 7.2).

Tabelle 7.2: Markerproteine in der BN-PAGE.

Protein	Laufhöhe [kDa]	Quelle
Conalbumin (Dimer)	154	diese Arbeit
BSA (Dimer)	132	(SCHÄGGER et al., 1994)
Conalbumin	77	Fa. Sigma-Aldrich
BSA	66	(SCHÄGGER et al., 1994)
Ovalbumin	45	(FAILER, 2002)
β-Lactoglobulin B	18	Fa. Sigma-Aldrich

8. Publikationen

Veröffentlichungen:

TÜRCK, M. and BIERBAUM, G. (*in submission*). Purification of the full-length YycFGHI proteins of *Staphylococcus aureus*, development of *in vitro* phosphorylation model systems and oligomeric state analysis.

TÜRCK, M. and BIERBAUM, G. (*in preparation*). Influence of the *yycFG* overexpression in *Staphylococcus aureus* on autoregulation, colony pigmentation and oxidative stress conditions.

JANSEN, A., **TÜRCK, M.***, SZEKAT, C., NAGEL, M., CLEVER, I., and BIERBAUM, G. (2007). Role of insertion elements and *yycFG* in the development of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 297(4):205-215.

*The first two authors contributed equally to this work.

Vortrag:

TÜRCK, M. and BIERBAUM, G. (2008). Influence of *yycFG* (*vicRK/walRK*) overexpression on autoregulation, colony pigmentation, biofilm formation and daptomycin susceptibility. European Staphylococcal Cell Wall Workshop, Bonn, 2008.

Poster-Präsentationen:

TÜRCK, M. and BIERBAUM, G. (2009). The essential YycFGHI system of *Staphylococcus aureus*: Establishment of an *in vitro* test system. VAAM, Bochum, 2009

TÜRCK, M. and BIERBAUM, G. (2008). Establishment of *in vitro* phosphorylation and interaction assays employing the entire YycFG (VicRK/WalRK), YycH and YycI proteins of *Staphylococcus aureus*. Workshop "Pathophysiology of Staphylococci" of the Transregional

Collaborative Research Center 34 (Greifswald, Tübingen and Würzburg) at Kloster Banz in Bad Staffelstein, 2008.

NAGEL, M., JANSEN, A., **TÜRCK, M.** and BIERBAUM, G. (2008). Influence of antibiotic stress on transposition in *Staphylococcus aureus*. DGHM, Dresden, 2008.

NAGEL, M., JANSEN, A., **TÜRCK, M.** and BIERBAUM, G. (2008). Influence of the SOS response on the development of intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. DECHEMA, Frankfurt am Main, 2008.

TÜRCK, M., JANSEN, A., SZEKAT, C. and BIERBAUM, G. (2008). Overexpression of *yycFG* (*vicRK*) in *Staphylococcus aureus* leads to changes in daptomycin susceptibility, biofilm formation and pigmentation. VAAM/GBM, Frankfurt am Main, 2008.

NAGEL, M., JANSEN, A., **TÜRCK, M.** and BIERBAUM, G. (2007). Localisation of IS-elements in a clinical *Staphylococcus aureus* strain with decreased sensitivity to vancomycin. Competence Network PathoGenoMik-Plus, Göttingen, 2007.

NAGEL, M., JANSEN, A., **TÜRCK, M.** and BIERBAUM, G. (2007). Characterization of the role of IS256 in the development of intermediate vancomycin resistance in a clinical *Staphylococcus aureus* isolate. DGHM, Göttingen, 2007.

TÜRCK, M. and BIERBAUM, G. (2007). Evidence that the Genes *yycFG* (*vicRK*) of the essential Two-Component System YycFG (VicRK) are not Autoregulated in *Staphylococcus aureus*. VAAM, Osnabrück, 2007.

TÜRCK, M., JANSEN, A., and BIERBAUM, G. (2005). The two-component regulatory system VicRK of *Staphylococcus aureus* and its influence on intermediate Vancomycin resistance. VAAM/DGHM, Göttingen, 2005

TÜRCK, M., JANSEN, A., and BIERBAUM, G. (2005). Transcriptome analysis of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) strains. PROKAGEN, 2nd European Conference on Prokaryotic Genomes, Göttingen, 2005.

JANSEN, A., **TÜRCK, M.**, SZEKAT, C., RUMPEL, I., SASS, P. und BIERBAUM, G. (2004). Untersuchungen zur Evolution von Antibiotika-Resistenzen bei *Staphylococcus aureus*. BMBF Pathogenomics Network Meeting, Würzburg, 2004.

TÜRCK, M., REIPERT, A., SZEKAT, C. and BIERBAUM, G. (2004). Identification of genetic events involved in the development of glycopeptide resistance. 11th International Symposium of Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI), Charleston (USA), 2004.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders herzlich bei Frau Prof. Dr. Gabriele Bierbaum für die Überlassung des spannenden Themas, die exzellente Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft, das in mich gesetzte Vertrauen und die vielen Freiheiten, die ich mir bei der Umsetzung meiner Ideen nehmen durfte, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Sahl danke ich ganz herzlich für das Interesse an meiner Arbeit, für seine Unterstützung, die Bereitschaft als Zweitbetreuer tätig zu sein und für die Übernahme des Korreferats.

Frau Prof. Dr. Anna Maria Eis-Hübinger und Herrn Prof. Dr. Dieter Volkmann danke ich sehr für ihre Bereitschaft, sich als Mitglieder der Prüfungskommission zur Verfügung zu stellen, und für das Interesse, das sie meiner Arbeit entgegengebracht haben.

Frau Dr. Tanja Schneider gilt mein Dank für die Bereitstellung der Komponenten der Zellwandbiosynthese Lipid II und C₅₅-P (Bactoprenol), die ich für einige Versuche verwendet habe.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bierbaum und der Arbeitsgruppe Sahl bedanke ich mich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Vera Saß und Herrn Dr. Peter Saß für ihre stete Ansprechbarkeit bzw. Hilfsbereitschaft, zahlreiche anregende Diskussionen und für die gute Zeit insgesamt. Bei Frau Jasmin Dischinger und Herrn Michael Nagel bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und dafür, dass sie dazu beigetragen haben, den Laboralltag höchst angenehm zu gestalten. Bei Frau Michaelaele Josten, Frau Marion Oedenkoven, Frau Monika Pinkwart und Frau Christiane Szekat bedanke ich mich für die theoretischen und praktischen Hilfestellungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung.

Frau Dr. Ulrike Pag danke ich ganz herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes zu dieser Dissertation und ihre konstruktive Kritik. Bei Frau Julia Engel möchte ich mich herzlichst für das Austreiben der Fehler teufel bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden bedanken, die mir ihre Liebe und Unterstützung über all die Jahre gewährt und so einen entscheidenden Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich für die Anfertigung der vorliegenden Dissertationsschrift nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe und dass die Stellen und Zitate, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht sind.

Diese Dissertation ist weder identisch noch teildentisch mit einer Arbeit, die an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn oder einer anderen Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades oder als Prüfungsleistung vorlegt wurde.

Bonn, im Juli 2009

Michael Türck

